Saffron Agronomy & Technology
Homepage: http://saffron.torbath.ac.ir
Vol. 11, No. 4, Winter 2024, p. 393-412

Investigation into the Prevalence of Fusarium Corm Rot Disease in Saffron Fields of Iran

Nima Khaledi[1*], Mahdi Rezaei[2] and Mojtaba Alizadeh Farddarabad[3]

Article type:
Research Article
Article history:
Submitted: 12 August 2023
Revised: 19 November 2023
Accepted: 7 December 2023
Available Online: 17 January 2024

How to cite this article:
Khaledi, N., Rezaei, M., and Alizadeh Farddarabad, M. (2024). Investigation into the Prevalence of Fusarium Corm Rot Disease in Saffron Fields of Iran. Saffron Agronomy & Technology, 11(4), 393-412
DOI: 10.22048/jsat.2024.410910.1501

Abstract

Fusarium rot disease is one of the most important fungal diseases of saffron corms worldwide, which can lead to a decrease in product yield and the quality of daughter corms produced. The objective of this study was to isolate and identify agents responsible for Fusarium corm rot in saffron, as well as to assess their pathogenicity. In order to determine the *Fusarium* species from saffron corms with rotting symptoms were sampled from the different fields in provinces of Hamadan, Golestan, Kerman, Kurdistan, Semnan, Kermanshah, Ardabil, East Azerbaijan, North Khorasan, Razavi Khorasan, Isfahan, and South Khorasan. After isolation and purification, fungal isolates were identified and confirmed based on morphological characteristics and species-specific primers. Also, the pathogenicity of the isolates was artificially tested in the greenhouse on saffron corms according to Koch's principles. The results indicated that approximately 38.6% of the saffron corms were infected with fusarium rot disease in the 1 to 5% range. 33 isolates were identified based on morphological and molecular characteristics belonging to *F. oxysporum* (26 isolates, 78.8%) and *F. solani sensu lato* (7 isolates, 21.2%). The pathogenicity tests revealed that all Fusarium isolates were pathogenic, displaying varying levels of disease index.The result of the host range test of *F. oxysporum* on different plants revealed that all isolates caused wilting and yellowing of aerial organs, necrosis and rotting of underground organs on Gladiolus (*Gladiolus communis* L.), Irises (*Iris germanica* L.) and Crocus (*Crocus vernus* L.) and was called as *F. oxysporum* f. sp. *gladioli*. This is the first report on identification of *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* from saffron fields in Malayer, Bijar, Kangavar, Parsabad, Marand, Natanz, Najafabad and f *F. solani* sensu lato from saffron fields in Azadshahr, Shirvan, Esfarayen, Kashmar, Najafabad, Boshruyeh on saffron corms. The findings of this research provide new insights into the health status of saffron corm against fusarium rot disease, which can be

1 - Assistant professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
2 - Assistant professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
3 - MSc., Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.
Corresponding author: n_khaledi@areeo.ac.ir

© 2022, University of Torbat Heydarieh. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (CC BY NC 4.0)
(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0).

used for the revision of the national standard for saffron corms and determining suitable areas for certified corm production of saffron.

Keywords: Pathogenicity, Morphological, Identification, Molecular.

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد۱۱، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲ ص. ۴۱۲-۳۹۳
Homepage: http://saffron.torbath.ac.ir

مقاله پژوهشی

بررسی وضعیت آلودگی به بیماری پوسیدگی فوزاریومی بنه در مزارع زعفران ایران

نیما خالدی[1*]، مهدی رضائی[2] و مجتبی علیزاده فرد درآباد[3]

تاریخ دریافت: ۲۱ مرداد ۱۴۰۲
تاریخ بازنگری: ۲۸ آبان ۱۴۰۲
تاریخ پذیرش: ۱۶ آذر ۱۴۰۲

خالدی، ن.، رضائی، م.، و علیزاده فرد درآباد، م. ۱۴۰۲. بررسی وضعیت آلودگی به بیماری پوسیدگی فوزاریومی بنه در مزارع زعفران ایران. زراعت و فناوری زعفران، ۱۱(۴)، ۴۱۲-۳۹۳.

چکیده

بیماری پوسیدگی فوزاریومی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی بنه زعفران در سراسر جهان است که می‌تواند منجر به کاهش عملکرد محصول و کیفیت بنه‌های دختری تولید شده شود. هدف از این پژوهش، جداسازی و شناسایی عوامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی بنه زعفران و بررسی میزان بیماریزایی آن‌ها می‌باشد. به‌منظور شناسایی گونه‌های *Fusarium* عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی از بنه‌های زعفران دارای علایم پوسیدگی از مزارع مختلف استان‌های همدان، گلستان، کرمان، کردستان، سمنان، کرمانشاه، اردبیل، آذربایجان‌شرقی، خراسان‌شمالی، خراسان‌رضوی، اصفهان و خراسان‌جنوبی نمونه‌برداری شد. جدایه‌های قارچی پس از جداسازی و خالص‌سازی، بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و آغازگرهای اختصاصی گونه شناسایی و تأیید شدند. همچنین میزان بیماریزایی جدایه‌ها با آزمون بیماریزایی به‌صورت مصنوعی در گلخانه مطابق اصول کخ، روی بنه‌های زعفران بررسی شد. نتایج نشان داد که حدود ۳۸/۶ درصد از نمونه‌ها، در دامنه ۱ تا ۵ درصد، آلوده به بیماری پوسیدگی فوزاریومی بودند. در مجموع، بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی ۳۳ جدایه متعلق به گونه‌های *Fusarium oxysporum* (۲۶ جدایه، ۷۸/۸ درصد) و *F. solani sensu lato* (۷ جدایه، ۲۱/۲ درصد) شناسایی شدند. نتایج آزمون بیماریزایی نشان داد که تمامی جدایه‌های *Fusarium* spp. بیماریزا بوده و درجات مختلفی از شاخص بیماری را نشان می‌دهند. نتایج تعیین آزمون فرم اختصاصی گونه *F. oxysporum* روی گیاهان مختلف نشان داد که تمامی جدایه‌ها روی گلایول، زنبق و زعفران زینتی ایجاد پژمردگی و زردی اندام‌های هوایی، بافت‌مردگی و پوسیدگی اندام زیرزمینی نموده و تحت عنوان *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* نام گرفتند. این اولین گزارش در مورد شناسایی گونه *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* از مزارع زعفران در شهرستان‌های ملایر، بیجار، کنگاور، پارس آباد، مرند، نطنز، نجف‌آباد و گونه *F. solani sensu lato* از مزارع زعفران در شهرستان‌های آزادشهر، شیروان، اسفراین، کاشمر، نجف آباد، بشرویه از روی بنه زعفران می‌باشد. یافته‌های این پژوهش، دیدگاه‌های جدیدی را درباره وضعیت سلامت بنه‌های زعفران به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ارائه می‌دهد که می‌تواند در بازنگری استاندارد ملی سلامت بنه‌های زعفران و تعیین مناطق مستعد برای کشت بنه گواهی شده در ایران، مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: بیماریزایی، ریخت‌شناختی، شناسایی، مولکولی.

۱- استادیار، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۲- استادیار، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
۳- کارشناسی ارشد، مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران
(*-نویسندهٔ مسئول: n_khaledi@areeo.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2024.410910.1501

مقدمه

زعفران زراعی با نام علمی *Crocus sativus* L. گیاهی تک لپه، روز کوتاه، نیمه گرمسیری، سرمادوست و دارای بنه از خانواده زنبقیان است (Koocheki & Seyedi, 2015; Saeidi Aboueshaghi et al., 2022). زعفران در بین محصولات صادراتی به عنوان با ارزش‌ترین محصول کشاورزی و دارویی می‌باشد که به دلیل کارکردهای بوم‌شناختی، اقتصادی و اجتماعی خاص خود، گیاهی راهبردی به‌شمار می‌رود که می‌تواند به رشد اقتصادی کشور کمک شایانی نماید (Fallahi et al., 2021; Kour et al., 2022). با توجه به نیاز آبی پایین و ارزش اقتصادی بالا، کشت این گیاه در مناطق مختلف کشور برای تولید پایدار توصیه می‌شود (Dastranj & Sepaskhah, 2019). ارزش کیفی زعفران به علت وجود متابولیت‌های ثانویه و مشتقات آن از جمله آپوکاروتنوئیدهای کروسین، پیکروکروسین و سافرانال بوده که از نظر غذایی و دارویی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشند (Naseri et al., 2023). زعفران زراعی به علت ماهیت تریپلوئیدی آن عقیم بوده و به روش غیرجنسی تکثیر می‌شود، در نتیجه ویژگی‌های ژنتیکی آن ثابت مانده که این مسئله امکان انتقال عوامل بیماری‌زا را توسط بنه افزایش می‌دهد (Baba et al., 2022). امروزه ایران با بیش از ۶۰ درصد از تولید کل تولید سالانه زعفران در دنیا به عنوان بزرگترین و مهمترین کشور تولیدکننده این محصول ارزشمند به شمار می‌آید (Amiri-Jami, 2023). بر اساس آمارنامه کشاورزی در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ میزان سطح بارور کشت، تولید کل و متوسط عملکرد آبی این محصول در ایران به ترتیب حدود ۱۰۱ هزار هکتار، ۲۷۷ تن و ۲/۷۲ کیلوگرم در هکتار برآورد شده است (Ahmadi et al., 2021). بیشترین عملکرد متعلق به استان کردستان به میزان ۸/۸۴ کیلوگرم در هکتار و کمترین آن متعلق به استان زنجان با ۱/۴۹ کیلوگرم در هکتار گزارش شده است (Ahmadi et al., 2021). بیش از ۹۰ درصد از سطح زیر کشت و تولید کل زعفران کشور مربوط به استان‌های خراسان رضوی، خراسان جنوبی و خراسان شمالی می‌باشد (Ahmadi et al., 2021). میزان سطح زیر کشت و تولید کل زعفران در سال‌های اخیر روند کاهشی داشته است، به نحوی که میزان عملکرد این محصول به ازای هر واحد سطح زیر کشت از ۳/۲۸ کیلوگرم در سال ۱۳۹۵ به ۲/۷۲ کیلوگرم در سال ۱۴۰۰ رسیده است. بنابراین، توجه به مسائل مربوط به مدیریت زراعی و تأمین مواد غذایی مورد نیاز این گیاه، استفاده از بنه‌های بذری سالم و گواهی شده به عنوان بنه‌ی مادری و همچنین مدیریت آفات و بیماری‌ها نقش مؤثری در افزایش کیفیت و کمیت محصول تولیدی دارد (Nehvi & Yasmin, 2017). بنه زعفران به عنوان بخشی از اندام زیرزمینی که پایه تولید و تکثیر این گیاه می‌باشد، به دلیل محتوای بالای آب و تماس مداوم با خاک و همچنین قرار گرفتن در دمای و رطوبت مناسب به شدت مستعد بیماری‌های ناشی از قارچ‌ها، باکتری‌ها، نماتدها و ویروس‌ها هستند (López & Gómez-Gómez, 2009; Ahrazem et al., 2010). عوامل بیماریزای *Aspergillus niger*، *A. terreus*، *A. flavus*، *A. flavipes*، *Bacillus croci*، *Burkholderia gladioli*، *Fusarium* spp.، *Macrophomina phaseolina*، *Mucor* sp.، *Penicillium solitum*، *P. cyclopium*، *P. corymbiferum*، *Phoma crocophila*، *Pythium* spp.، *Rhizoctonia crocorum*، *R. violacea*، *Rhizopus nigricans*، *Sclerotium rolfsii*، *Stromatinia gladioli* و *Uromyces croci* به‌عنوان مهمترین عوامل تأثیرگذار بر روی بنه زعفران گزارش شده است (Palmero et al., 2014; Najari et al., 2018; Gupta et al., 2021; Mirghasempour et al., 2022a; Mirghasempour et

al., 2022b). بر اساس پژوهش‌های انجام شده، پوسیدگی فوزاریومی بنه زعفران به عنوان مخرب‌ترین بیماری زعفران گزارش شده است که نه تنها موجب کاهش عملکرد می‌شود بلکه بر روی کیفیت و کمیت بنه‌های دختری تولیدی تأثیر می‌گذارد (Di Primo & Cappelli, 2000; Nehvi et al., 2007; Husaini et al., 2010; Fiori et al., 2011). بیماری پوسیدگی فوزاریومی بنه می‌تواند منجر به کاهش ۵۰ درصد عملکرد محصول (Di Primo et al., 2002; Husaini et al., 2010) و تا ۷۰ درصد کاهش کیفیت بنه‌های دختری تولید شده شود (Hu et al., 2021). تاکنون، گونه‌های *F. oxysporum*، *F. solani*، *F. nirenbergiae*، *F. equiseti*، *F. pallidoroseum*، *F. commune* و *F. annulatum* به‌عنوان مهمترین عوامل پوسیدگی فوزاریومی بنه زعفران در جهان گزارش شده است (Najari et al., 2018; Mirghasempour et al., 2022b; Mansotra et al., 2023). قارچ *Fusarium* spp. ساختاری تخصصی برای نفوذ در سلول‌های گیاهی ندارد، اما به طور مستقیم توسط هیف کوتاه آلوده کننده در دیواره سلول‌های اپیدرمی و یا از طریق زخم‌ها به درون بنه نفوذ می‌کند (Husaini et al., 2010; Ahrazem et al., 2010; Bhagat, 2021). این عوامل بیماریزای قارچی به صورت خاکزاد و یا همراه بنه منتقل شده و موجب کاهش یا از بین بردن جوانه زنی و بنیه، مرگ گیاهچه، زردی و پژمردگی اندام‌های هوایی و پوسیدگی بنه و اندام زیرزمینی می‌شوند (Di Primo et al., 2002; Palmero et al., 2014). در صورت استفاده از بنه‌های آلوده در کشت بعدی علایمی همچون مرگ گیاهچه در مراحل اولیه جوانه زنی و رشد گیاه مشاهده شده و در نتیجه عملکرد و کیفیت گل و بنه‌های دختری تولیدی کاهش می‌یابد (Palmero et al., 2014). بنابراین انجام مطالعات دقیق برای شناسایی مناطق آلوده، تعیین تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری و شناسایی کانون‌های آلودگی برای جلوگیری از انتشار این بیماری به دیگر مناطق زعفران کاری کشور امری بسیار ضروری است (McDonald, 1997). در نتیجه، بهترین راه مقابله با این بیماری استفاده از بنه‌های بذری سالم و گواهی شده همراه با تیمار بنه با قارچ‌کش‌های شیمیایی است. با وجود اهمیت اقتصادی بنه‌های بذری زعفران، اطلاعات ما در مورد عوامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی بنه در مزارع زعفران در ایران بسیار محدود است. کیفیت پایین بنه‌های تولیدی به روش‌های سنتی، محدودیت سطح زیر کشت از نظر شرایط اقلیمی و اراضی و همچنین عدم توجه کافی به تأثیر بیماری پوسیدگی بنه از مهمترین عوامل محدودکننده تولید بنه‌های گواهی شده زعفران محسوب می‌شود و عملکرد و کیفیت بنه‌های تولیدی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین، اهداف این پژوهش عبارتند از (الف) شناسایی گونه‌های عامل پوسیدگی فوزاریومی بنه‌های زعفران، (ب) بررسی وضعیت سلامت نمونه‌های بنه‌های جمع آوری شده از مزارع زعفران به عوامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی و (ج) ارزیابی میزان بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی جداسازی شده می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

از بنه گیاهان دارای علایم پوسیدگی در اواخر اسفند ماه فصل زراعی ۰۱-۱۴۰۰ از مزارع مختلف استان‌های همدان (شهرستان‌های ملایر و نهاوند)، گلستان (آزادشهر)، کرمان (شهرستان‌های سیرجان، شهر بابک و زرند)، کردستان (شهرستان‌های بیجار و قروه)، سمنان (شهرستان‌های گرمسار و سمنان)، کرمانشاه (شهرستان‌های کنگاور و کرمانشاه)، اردبیل (شهرستان پارس آباد)، آذربایجان شرقی (شهرستان مرند)، خراسان شمالی (شهرستان‌های فاروج، شیروان و اسفراین)،

خراسان رضوی (شهرستان‌های تربت‌حیدریه، کاشمر، گناباد، تایباد و تربت‌جام)، اصفهان (شهرستان‌های تیران و کرون، نطنز، نجف آباد) و خراسان جنوبی (شهرستان‌های قائنات، بیرجند، فردوس و بشرویه) نمونه‌برداری و پس از ثبت مشخصات به آزمایشگاه سلامت بذر موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال منتقل شد.

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی

پس از شستشوی اولیه نمونه‌ها و خشک کردن آنها، برای جداسازی عوامل قارچی، از حدفاصل بافت سالم و بیمار قطعاتی به ابعاد ۲×۲ میلی‌متر مربع بریده و با الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس محلول رقیق‌شده هیپوکلریت سدیم (حاوی یک درصد کلر فعال) به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شدند (Najari et al., 2018). قطعات در تشتکهای پتری (به قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت عمومی سیب زمینی دکستروز – آگار (Potato dextrose agar, Merck, Germany) و محیط کشت اختصاصی *Fusarium*، پنتاکلرو نیتروبنزن پپتون–آگار (PPA: Penta chloro nitrobenzene peptone agar) حاوی ۰/۰۱ گرم در لیتر آنتی بیوتیک کلرامفنیکل کشت شدند (Booth, 1977) و در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و دوره نوری متناوب، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفتند. جدایه‌های قارچی با استفاده از روش تک اسپور کردن و یا نوک ریسه روی محیط کشت آب آگار دو درصد خالص‌سازی شدند (Booth, 1977; Nelson et al., 1983). جدایه‌های خالص شده برای شناسایی در سطح گونه به محیط کشت‌های برگ میخک – آگار (CLA: Carnation leaf aga) و آگار مصنوعی فقیر از مواد غذایی (SNA: Synthetic nutrient-poor agar) منتقل شدند. شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی بر اساس ویژگی‌های ظاهری آن‌ها مانند رنگ و نحوه رشد پرگنه، و همچنین ویژگی‌های میکروسکوپی مانند طول و عرض ۳۰ عدد ماکروکنیدیوم به طور تصادفی انتخاب و سپس اندازه و شکل ماکروکنیدیوم، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم و شکل آن و وجود یا عدم وجود کلامیدوسپورها با توجه به ویژگی‌های ظاهری ذکر شده در منابع معتبر (Burgess et al., 1994; Leslie & Summerell, 2006; Crous et al., 2021) و کلیدهای شناسایی معتبر (Booth, 1971; Nelson et al., 1983) انجام گرفت.

شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی

برای استخراج DNA، از کیت Genomic DNA isolation kit ساخت شرکت Pishgam Biotech ایران با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. برای تأیید جدایه‌های *Fusarium solani sensu lato* از آغازگرهای اختصاصی TEF-Fs4f/TEF-Fs4r (Forward: 5’ ATC GGC CAC GTC GAC TCT 3’ و Reverse: 5’ GGC GTC TGT TGA TTG TTA GC 3’) که تولید قطعه‌ای به طول ۶۵۸ جفت باز می‌کند (Hussein et al., 2020)، برای *F. oxysporum* از آغازگرهای اختصاصی CLOX1/CLOX2 (Forward: 5’ CAG CAA AGC ATC AGA CCA CTA TAA CTC 3’ و Reverse: 5’ CTT GTC AGT AAC TGG ACG TTG GTA CT 3’) که تولید قطعه‌ای به طول ۵۳۴ جفت باز می‌کند (Mulè et al., 2003)، استفاده شد. اختصاصی بودن هر آغازگر به وسیله انجام تجزیه و تحلیل BLAST در NCBI مورد تأیید قرار گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل مرحله واسرشت‌سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در ۹۵ درجه سلسیوس، سپس ۳۵ چرخه در مرحله واسرشت به مدت ۶۰ ثانیه در ۹۵ درجه سلسیوس، مرحله اتصال (برای *F. solani sensu lato*: ۶۰ ثانیه در دمای ۵۷ درجه سلسیوس، برای *F.*

oxysporum: ۶۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سلسیوس) و مرحله گسترش به مدت ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس بود. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۱۲/۵ میکرولیتر 2X PCR Master Mix (Pishgam, Iran)، ۳ میکرولیتر DNA الگو با غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم و یک میکرولیتر از هر آغازگر که در نهایت با افزودن آب دیونیزه سترون به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Biometra (آلمان) انجام شد. هر آزمایش شامل شاهد مثبت (DNA یک جدایه شناخته‌شده) و شاهدهای منفی (یک واکنش PCR بدون DNA) بود. در نهایت محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۲ درصد و از طریق الکتروفورز به مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت عبور داده شد. ردیابی نوارهای DNA با استفاده از رنگ‌آمیزی با رنگ فلورسنت سایبرگرین (SYBR® Green) و سپس عکس‌برداری از ژل با استفاده از دستگاه Gel Documentation مدل Syngene Gene Flash Bio (USA) انجام شد.

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی

برای ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها از بنه‌های سالم زعفران که فاقد هر گونه آلودگی طبیعی بودند از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال تهیه و استفاده شد. بنه‌های زعفران پس از حذف لایه سطحی، با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه ضدعفونی سطحی شده و سپس با آب مقطر سترون سه بار شستشو شدند (Wani et al., 2016). مایه تلقیح جدایه‌های *Fusarium* با استفاده از روش شرح داده شده توسط مولر و همکاران (Müller et al., 2012) تهیه شد. سوسپانسیون اسپور جدایه‌های قارچ در غلظت ۱×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ تهیه شد و برای مایه‌زنی مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور ارزیابی بیماریزایی، جدایه‌های قارچی روی بنه زعفران بر اساس روش شرح داده‌شده توسط مانسوترا و همکاران (Mansotra et al., 2023) مایه‌زنی شدند. برای مایه‌زنی و جذب بهتر زادمایه قارچ، در انتهای بنه حفره‌ای با یک سوزن سترون به عمق ۱۰ میلی‌متر و پهنای ۲ میلی‌متر ایجاد و در نهایت بنه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در سوسپانسیون اسپور غوطه‌ور شدند (Bhagat et al., 2021). برای بنه‌های شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. بستر کشت مورد استفاده در این آزمایش، ترکیبی از پیت ماس، پرلیت و کوکوپیت با نسبت حجمی ۲:۱:۲ بود. سپس در هر گلدان پلاستیکی (قطر ۱۵ سانتی‌متر) یک بنه‌ی زعفران کشت و در شرایط دمایی ۳±۲۵ درجه سلسیوس با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی و رطوبت نسبی ۷۰ درصد به مدت ۴۰ روز در گلخانه قرار گرفتند. در پایان این مدت، بنه‌ها از خاک خارج و ضمن بررسی وضعیت آلودگی و علایم بیماری، به منظور اثبات اصول کخ، از آنها کشت مجدد انجام گرفت. برای ارزیابی میزان پوسیدگی، بنه‌ها در امتداد حفره‌ی ایجاد شده به دو قسمت تقسیم شدند. شدت پوسیدگی بنه‌ها بر اساس درصد بافت آسیب دیده توسط جدایه‌های قارچ در ۵ سطح (۰ = بدون علایم بیماری، ۱ = پوسیدگی خفیف بافت در نزدیکی حفره ایجاد شده، ۲ = تغییر رنگ بافت در داخل بنه، ۳ = پوسیدگی و تغییر رنگ بافت در داخل و خارج بنه، ۴ = پوسیدگی کامل بنه) به روش شرح داده‌شده توسط وانی و همکاران (Wani et al., 2016) درجه‌بندی و شاخص بیماری‌زایی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Avan et al., 2021):

$$\text{درصد شاخص بیماری} = \frac{0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4}{4N} \times 100$$

n_0: تعداد بنه‌ها با درجه صفر آلودگی، n_1: تعداد بنه‌ها با درجه ۱ آلودگی، n_2: تعداد بنه‌ها با درجه ۲ آلودگی؛ n_3: تعداد بنه‌ها با درجه ۳ آلودگی؛ n_4: تعداد بنه‌ها با درجه ۴ آلودگی؛ N: تعداد کل

بنه‌ها

آزمون شامل چهار تکرار (هر تکرار شامل یک بنه) برای هر جدایه بود و آزمایش دو بار تکرار شد.

آزمون تعیین دامنه میزبانی و فرم‌های اختصاصی

به‌منظور تعیین دامنه‌ی میزبانی قارچ *F. solani* و *F. oxysporum*، چهار جنس مهم از خانواده زنبقیان و نرگسیان شامل گلایول (*Gladiolus communis* L.) رقم Roma، زنبق (*Iris germanica* L.) رقم Emily McKenzie، نرگس (*Narcissus tazetta* L.) رقم Daffodil Queens Day، کروکوس یا زعفران زینتی (*Crocus vernus* L.) رقم Pickwick و زعفران زراعی انتخاب شدند. انتخاب محصول بر اساس فرم‌های اختصاصی گزارش شده در پژوهش پالمرو و همکاران (Palmero et al., 2014) بود. مراحل آماده‌سازی و انجام آزمون بیماری‌زایی بر اساس روشی که پیش‌تر به آن اشاره شد، انجام گرفت. سپس علایم بیماری بررسی و مجدداً قارچ عامل بیماری، از نمونه‌های دارای علایم جداسازی شد.

محاسبات آماری

واکاوی آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.4) انجام و مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 استفاده گردید.

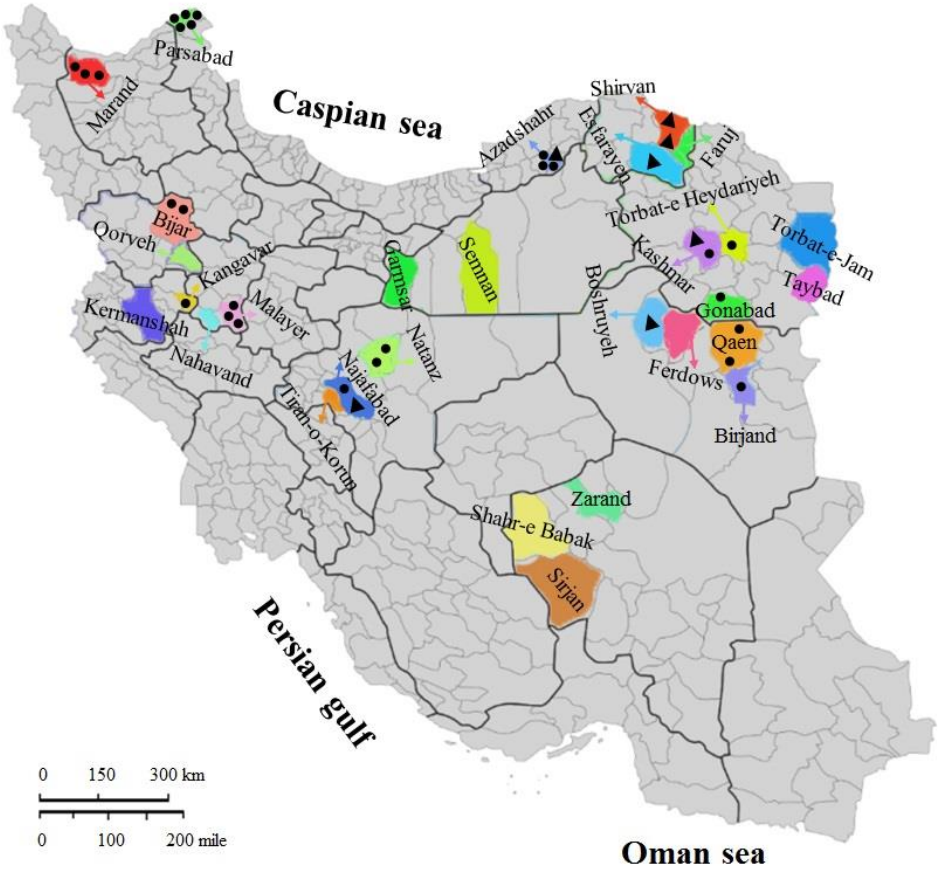
نتایج و بحث

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی جدایه‌های گونه‌های *Fusarium*

براساس مطالعات میکروسکوپی و بررسی خصوصیات ریخت‌شناختی و در مجموع ۳۳ جدایه از نمونه‌های بنه‌ی زعفران جمع آوری شده از شهرستان ملایر (۳ جدایه)، آزادشهر (۴ جدایه)، بیجار (۲ جدایه)، کنگاور (۱ جدایه)، پارس‌آباد (۵ جدایه)، مرند (۳ جدایه)، شیروان (۲ جدایه)، اسفراین (۱ جدایه)، تربت‌حیدریه (۱ جدایه)، کاشمر (۲ جدایه)، گناباد (۱ جدایه)، نطنز (۲ جدایه)، نجف آباد (۲ جدایه)، قائنات (۲ جدایه)، بیرجند (۱ جدایه) و بشرویه (۱ جدایه) جداسازی شدند که متعلق به جنس *Fusarium* بودند (شکل ۱، جدول ۱).

در نمونه‌های بنه‌ی نمونه‌برداری شده از شهرستان نهاوند متعلق به استان همدان، شهرستان‌های سیرجان، شهر بابک و زرند متعلق به استان کرمان، قروه متعلق به استان کردستان، شهرستان‌های گرمسار و سمنان متعلق به استان سمنان، شهرستان کرمانشاه متعلق به استان کرمانشاه، شهرستان فاروج متعلق به استان خراسان‌شمالی، شهرستان‌های تایباد و تربت‌جام متعلق به استان خراسان‌رضوی، شهرستان تیران و کرون متعلق به استان اصفهان و شهرستان فردوس متعلق به استان خراسان جنوبی آلودگی مشاهده نشده است (جدول ۱).

در مجموع، ۲۶ جدایه متعلق به *F. oxysporum* و ۷ جدایه متعلق به *F. solani sensu lato* بودند. مشخصات گونه *F. oxysporum* جداسازی شده به شرح زیر است: رنگ پرگنه قارچ از سفید تا بنفش کمرنگ متغیر بوده و اسپوردوکیوم‌ها به رنگ نارنجی کم رنگ به فراوانی تشکیل گردیدند. ماکروکنیدیوم معمولاً با ۳ دیواره عرضی بوده که سلول انتهایی به‌صورت خمیده تا مخلوطی و سلول پایه به شکل پا با پاشنه بود (شکل ۲a).



شکل ۱- مناطق جغرافیایی نمونه‌برداری شده از مزارع زعفران نزدیک شهرهای ایران. مناطق نمونه‌برداری روی نقشه با زمینه رنگی و تعداد جدایه‌های شناسایی شده با *Fusarium oxysporum* (●) و *F. solani sensu lato* (▲) مشخص شده است.

Figure 1- Geographic areas sampled from saffron fields near the cities of Iran. Sampling areas are marked on the map with color backgrounds and the number of isolates is identified by (●) *Fusarium oxysporum* and (▲) *F. solani sensu lato*.

کلامیدوسپورها به فراوانی در ریسه‌ها معمولاً به صورت تکی یا جفتی اما گاهی زنجیری و توده‌ای تشکیل شدند (شکل ۲b) و میکروکنیدیوم معمولاً یک سلولی و تخم مرغی بودند (شکل ۲c). واکاوی مولکولی با استفاده از آغازگرهای CLOX1/CLOX2، ۲۶ جدایه‌ی شناسایی‌شده بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی را به عنوان گونه‌ی *F. oxysporum*، تأیید نمود (شکل ۳). این گونه از نمونه‌ی بنه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان ملایر متعلق به استان همدان، شهرستان آزادشهر متعلق به استان گلستان، شهرستان بیجار متعلق به استان کردستان، شهرستان کنگاور متعلق به استان کرمانشاه، شهرستان پارس آباد متعلق به استان اردبیل، شهرستان مرند متعلق به استان آذربایجان شرقی، شهرستان گناباد متعلق به استان خراسان‌رضوی، شهرستان‌های نطنز و نجف‌آباد متعلق به استان اصفهان و شهرستان قائنات متعلق به استان خراسان جنوبی جداسازی و شناسایی شد.

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های بنه‌ی زعفران بر اساس محل نمونه‌برداری، نوع و میزان آلودگی به جدایه‌های *Fusarium* شناسایی شده براساس مشخصات ریخت‌شناختی

Table 1- Characteristics of saffron corm samples based on sampling site, type and level of infected with *Fusarium* isolates identified based on morphological characteristics

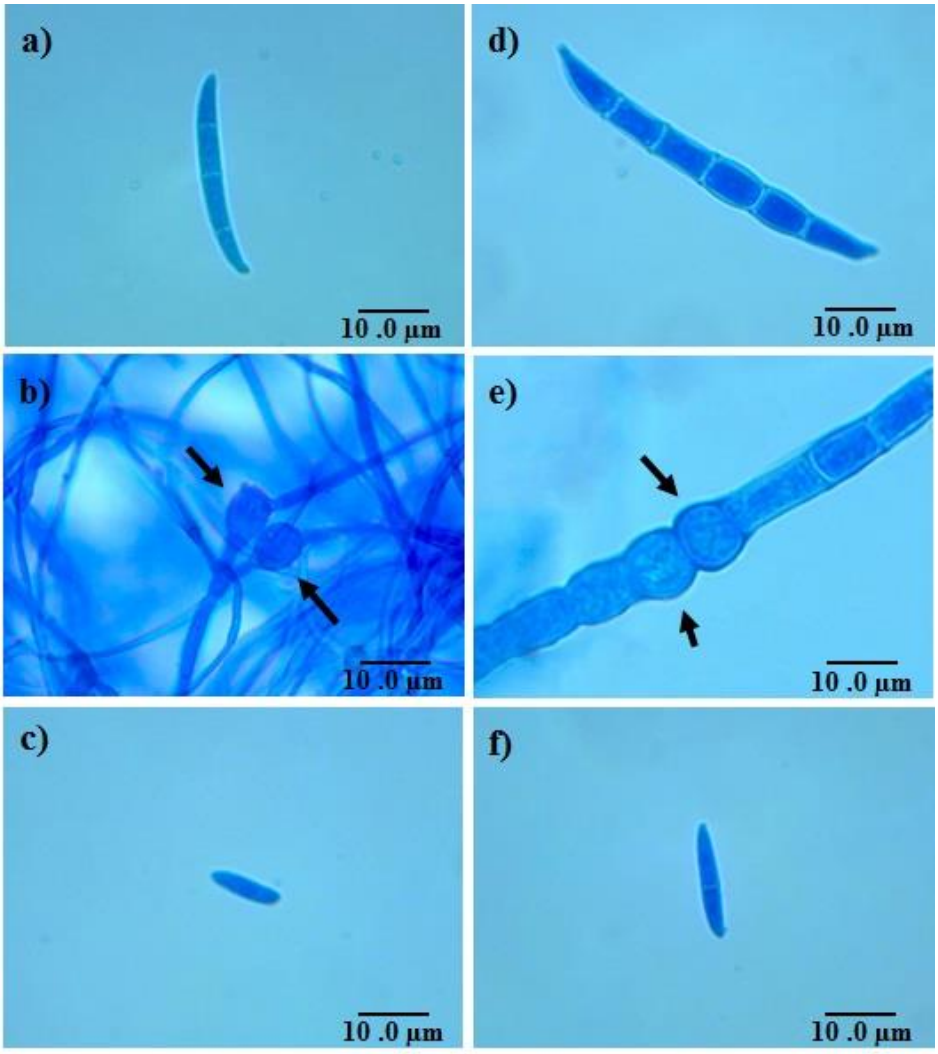
کد نمونه Sample code	محل نمونه‌برداری Sample site	NFI*	FO#	FSΔ
HM281	همدان-ملایر Hamadan - Malayer	3	3	ND
HM282	همدان-نهاوند Hamadan - Nahavand	ND*	ND	ND
GA591	گلستان-آزادشهر Golestan - Azadshahr	4	3	1
KS451	کرمان-سیرجان Kerman - Sirjan	ND	ND	ND
KS452	کرمان-سیرجان Kerman - Sirjan	ND	ND	ND
KS453	کرمان- شهربابک Kerman - Shahr-e Babak	ND	ND	ND
KS454	کرمان-زرند Kerman - Zarand	ND	ND	ND
DB511	کردستان-بیجار Kurdistan - Bijar	2	2	ND
DB512	کردستان- قروه Kurdistan - Qorveh	ND	ND	ND
SG861	سمنان- گرمسار Semnan - Garmsar	ND	ND	ND
SS962	سمنان-سمنان Semnan - Semnan	ND	ND	ND
SS963	سمنان-سمنان Semnan - Semnan	ND	ND	ND
HK191	کرمانشاه-کنگاور Kermanshah - Kangavar	1	1	ND
HK192	کرمانشاه-کرمانشاه Kermanshah - Kermanshah	ND	ND	ND
AP911	اردبیل- پارس آباد Ardabil - Parsabad	5	5	ND
ZM351	آذربایجان شرقی- مرند East Azerbaijan - Marand	3	3	ND
NF261	خراسان شمالی- فاروج North Khorasan - Faruj	ND	ND	ND
NF262	خراسان شمالی- فاروج North Khorasan - Faruj	ND	ND	ND
NF263	خراسان شمالی- فاروج North Khorasan - Faruj	ND	ND	ND
NS264	خراسان شمالی- شیروان North Khorasan - Shirvan	ND	ND	ND
NS265	خراسان شمالی- شیروان North Khorasan - Shirvan	2	0	2
NE266	خراسان شمالی- اسفراین North Khorasan - Esfarayen	ND	ND	ND
NE267	خراسان شمالی- اسفراین North Khorasan - Esfarayen	ND	ND	ND
NE268	خراسان شمالی- اسفراین North Khorasan - Esfarayen	1	ND	1
RH321	خراسان رضوی-تربت حیدریه Razavi Khorasan - Torbat-e Heydariyeh	ND	ND	ND
RH322	خراسان رضوی- تربت حیدریه Razavi Khorasan - Torbat-e Heydariyeh	1	1	ND
RK313	خراسان رضوی- کاشمر Razavi Khorasan - Kashmar	2	1	1
RK314	خراسان رضوی- کاشمر Razavi Khorasan - Kashmar	ND	ND	ND
RG314	خراسان رضوی- گناباد Razavi Khorasan - Gonabad	1	1	ND
RT315	خراسان رضوی- تایباد Razavi Khorasan - Taybad	ND	ND	ND
RJ316	خراسان رضوی- تربت جام Razavi Khorasan - Torbat-e-Jam	ND	ND	ND
IT131	اصفهان- تیران و کورون Isfahan - Tiran-o-Korun	ND	ND	ND
IJ132	اصفهان-نطنز Isfahan - Natanz	2	2	ND
IJ133	اصفهان- نجف آباد Isfahan - Najafabad	2	1	1
IK134	اصفهان- نجف آباد Isfahan - Najafabad	ND	ND	ND
BQ421	خراسان جنوبی- قاین South Khorasan - Qaen	ND	ND	ND
BQ422	خراسان جنوبی- قاین South Khorasan - Qaen	1	1	ND
BQ423	خراسان جنوبی- قاین South Khorasan - Qaen	1	1	ND
BB424	خراسان جنوبی- بیرجند South Khorasan - Birjand	ND	ND	ND
BB425	خراسان جنوبی-بیرجند South Khorasan - Birjand	ND	ND	ND
BB426	خراسان جنوبی- بیرجند South Khorasan - Birjand	1	1	ND
BF427	خراسان جنوبی- فردوس South Khorasan - Ferdows	ND	ND	ND
BB428	خراسان جنوبی- بشرویه South Khorasan - Boshruyeh	1	ND	1
BB429	خراسان جنوبی- بشرویه South Khorasan - Boshruyeh	ND	ND	ND

*NFI: تعداد جدایه‌های *Fusarium*، #FO: *Fusarium oxysporum*، ΔFS: *F. solani*، ND: تشخیص داده نشد.

*NFI = number of *Fusarium* isolates, #FO: *Fusarium oxysporum*, ΔFS: *F. solani*, *ND: Not detected.

قارچ *F. oxysporum* به عنوان عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران از استان خراسان‌جنوبی شهرستان‌های قائنات، بیرجند و درمیان (Khaledi, 2020)، استان لرستان شهرستان خرم‌آباد (Vafaei & Darvishian, 2022)، استان خراسان‌رضوی شهرستان‌های گناباد، قوچان، درگز، تربت‌حیدریه و تربت‌جام (Amiri-Jami, 2023) گزارش شده است که با مشاهدات پژوهش حاضر مطابقت دارد. این قارچ به عنوان عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران وحشی در استان ایلام شهرستان‌های ایوان و مهران (Najari et al., 2018) گزارش شده است. تاکنون بیش از ۱۵۰ فرم اختصاصی از قارچ *F. oxysporum* گزارش شده است (Rana et al., 2017). با توجه به مطالعات قبلی، پوسیدگی بنه زعفران توسط فرم مختلف اختصاصی *gladioli*، *iridiacearum*، *saffrani* و *croci* قارچ *F. oxysporum* ایجاد می‌شود (Palmero et al., 2014; Gupta et al., 2021). نتایج آزمون تعیین فرم اختصاصی گونه *F. oxysporum* روی گیاهان مختلف نشان داد که تمامی جدایه‌های جداسازی‌شده از بنه زعفران بر روی هر سه جنس گلایول، زنبق و زعفران زینتی ایجاد علایم بیماری از جمله پژمردگی و زردی اندام‌های هوایی، بافت‌مردگی و پوسیدگی اندام زیرزمینی می‌کنند و بنابراین عامل بیماری تحت عنوان *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* معرفی شد. بنابراین جدایه‌های *F. oxysporum* که باعث بیماری در زعفران می‌شوند، متعلق به فرم‌های اختصاصی *gladioli* بود (Nelson et al., 1981; Boerema & Hamers, 1989; Brayford, 1996; Di Primo & Cappelli, 2000; Di Primo et al., 2002). عامل پوسیدگی کورم زعفران در اسپانیا گونه *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* می‌باشد (Di Primo & Cappelli, 2000). گونه *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* برای اولین بار از مزارع زعفران در شهرستان‌های ملایر (استان همدان)، بیجار (استان کردستان)، کنگاور (استان کرمانشاه)، پارس‌آباد (استان اردبیل)، مرند (استان آذربایجان شرقی)، نطنز و نجف آباد (استان اصفهان) از روی بنه زعفران گزارش شد.

مشخصات گونه *F. solani* جداسازی‌شده به شرح زیر است: رنگ پرگنه قارچ از سفید تا کرم مایل به قهوه‌ای بوده، اسپوردوکیوم‌ها به رنگ کرم تشکیل شدند. ماکروکنیدیوم نسبتاً کشیده، معمولاً دارای ۵ تا ۷ دیواره عرضی بوده که سلول انتهایی به صورت گرد و سلول پایه ممکن به شکل پا مشخص تا ضعیف بود (شکل ۲d). کلامیدوسپور به صورت جفتی و یا تکی در وسط ریسه یا انتها با دارای دیواره صاف یا ناصاف بوده تشکیل شدند (شکل ۲e) و میکروکنیدیوم تخم مرغی بدون دیواره تا یک و گاهی ۲ دیواره عرضی بودند (شکل ۲f). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از واکاوی مولکولی با استفاده از آغازگرهای TEF-Fs4f/TEF-Fs4r نشان داد که ۷ جدایه‌ی شناسایی‌شده به روش ریخت‌شناسی به عنوان *F. solani sensu lato* مورد تأیید است (شکل ۳). گونه *F. solani sensu lato* از نمونه بنه‌های جمع‌آوری شده از شهرستان آزادشهر متعلق به استان گلستان، شهرستان‌های شیروان و اسفراین متعلق به استان خراسان‌شمالی، شهرستان‌های تربت‌حیدریه و کاشمر متعلق به استان خراسان‌رضوی، نجف‌آباد متعلق به استان اصفهان و شهرستان‌های قائنات، بیرجند و بشرویه متعلق به استان خراسان جنوبی جداسازی و شناسایی شد. قارچ *F. solani* به عنوان عامل بیماری پوسیدگی بنه زعفران از استان لرستان شهرستان خرم‌آباد (Vafaei & Darvishian, 2022) و استان گلستان (Shamli, 2019) گزارش شده است که با مشاهدات پژوهش حاضر مطابقت دارد.

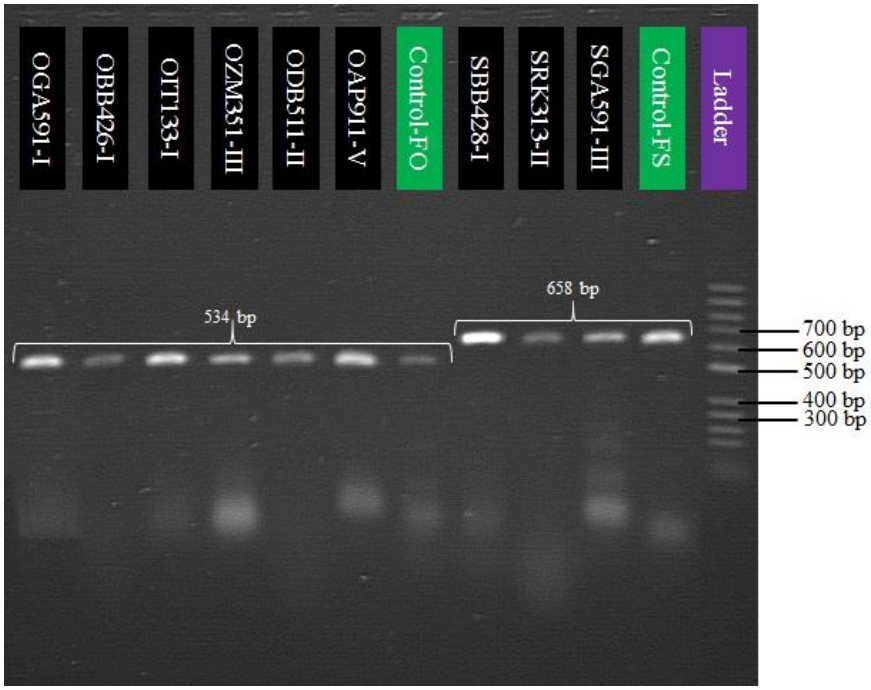


شکل ۲- ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه‌های *Fusarium* جداسازی‌شده از بنه‌های زعفران. (a) ماکروکنیدیوم، (b) میکروکنیدیوم و (c) کلامیدوسپور جدایه‌ی ODB511-II قارچ *F. oxysporum*؛ (d) ماکروکنیدیوم، (e) میکروکنیدیوم و (f) کلامیدوسپور جدایه‌ی SNS265-II قارچ *F. solani*، رنگ‌آمیزی با لاکتوفنل کاتن بلو. خط مقیاس= ۲۰ میکرومتر.

Figure 2- Images of morphological characteristics conidia of *Fusarium* species isolated from saffron corms. Macroconidium (a), microconidia (b) and chlamydospores (c) isolate ODB511-II of *F. oxysporum*; macroconidium (d), microconidia (e) and chlamydospores (f) isolate SNS265-II of *F. solani*; Staining with lactophenol cotton blue. Scale bars= 10 µm.

گونه‌های *F. oxysporum* و *F. solani* به‌عنوان عوامل اصلی بیماری پوسیدگی بنه زعفران از کشمیر (Gupta & Vakhlu, 2015) و سرینگر (Mansotra et al., 2023) هند گزارش شده است که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. نتایج آزمون تعیین فرم اختصاصی گونه *F. solani* روی گیاهان مختلف نشان داد که تمامی جدایه‌های جداسازی شده فقط بر روی بنه زعفران ایجاد علایم بیماری از جمله بافت‌مردگی و پوسیدگی اندام زیرزمینی می‌کنند. گونه *F. solani sensu lato* برای اولین بار از مزارع زعفران در شهرستان‌های آزادشهر (استان گلستان)، شیروان و اسفراین (استان خراسان‌شمالی)، کاشمر (استان خراسان‌رضوی)، نجف‌آباد (استان اصفهان)، بشرویه (استان خراسان‌جنوبی) از روی بنه

زعفران گزارش شد.

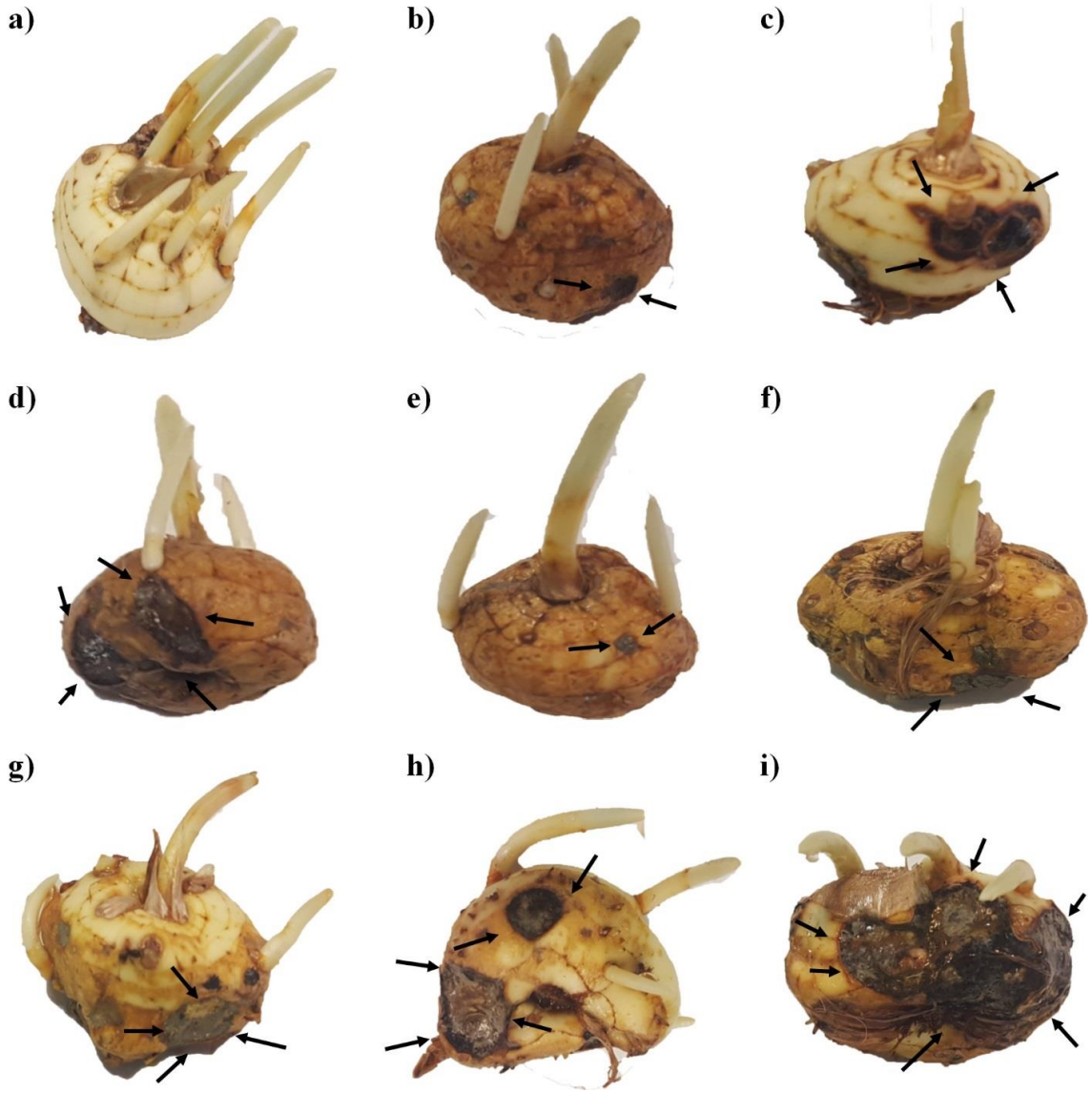


شکل ۳- شناسایی مولکولی جدایه‌های گونه‌های مختلف *Fusarium* جداسازی شده از بنه‌های زعفران. نوارها به ترتیب Control-FS (شاهد مثبت *F. solani sensu lato*)، SGA591-III، SRK313-II و SBB428-I متعلق به *F. solani sensu lato* با آغازگر TEF-Fs4f/TEF-Fs4r؛ Control-FO (شاهد مثبت *F. oxysporum*)، OAP911-V، ODB511-II، OZM351-III، OIT133-I، OBB426-I و OGA591-I متعلق به *F. oxysporum* با آغازگر CLOX1/CLOX2؛ (نشانگر ۱۰۰ جفت بازی).

Figure 3- Molecular identification of different isolates of *Fusarium* species isolated from saffron corms. The bands Control-FS (positive control of *F. solani sensu lato*), SGA591-III, SRK313-II and SBB428-I belonging to *F. solani sensu lato* with TEF-Fs4f / TEF-Fs4r primers; Control-FO (positive control of *F. oxysporum*), OAP911-V, ODB511-II, OZM351-III, OIT133-I, OBB426-I and OGA591-I belonging to *F. oxysporum* with CLOX1/CLOX2 primers respectively; (Ladder 100 bp Fermentas).

نتایج این پژوهش نشان داد که ۶۱/۴ درصد از نمونه‌های بنه‌ی جمع‌آوری شده از مزارع زعفران، به هیچ‌یک از عوامل پوسیدگی فوزاریومی بنه آلوده نبودند. نتایج ارزیابی نوع آلودگی نمونه‌های بنه‌ی زعفران جمع‌آوری شده در مزارع مختلف نشان داد که ۳۱/۸ درصد نمونه‌ها آلوده به قارچ *F. oxysporum* و ۱۳/۶ درصد نمونه‌ها آلوده به قارچ *F. solani sensu lato* می‌باشند. کد نمونه‌های GA591 (شهرستان آزادشهر)، RK313 (شهرستان کاشمر) و IJ133 (شهرستان نجف آباد) به صورت همزمان به قارچ‌های *F. oxysporum* و *F. solani sensu lato* آلوده بودند. همچنین بیشترین میزان فراوانی جدایه‌های قارچی جداسازی شده به‌ترتیب مربوط به نمونه‌های جمع‌آوری شده از استان‌های اردبیل (۵ جدایه)، گلستان (۴ جدایه)، اصفهان (۴ جدایه)، خراسان‌رضوی (۴ جدایه)، خراسان جنوبی (۴ جدایه)، خراسان‌شمالی (۳ جدایه)، آذربایجان‌شرقی (۳ جدایه)، کردستان (۲ جدایه) و کرمانشاه (۱ جدایه) بود. در نمونه‌های بنه‌ی استان‌های کرمان (شهرستان‌های سیرجان، شهر بابک و زرند) و سمنان (شهرستان‌های گرمسار و سمنان) هیچ‌گونه آلودگی به بیماری پوسیدگی فوزاریومی بنه زعفران مشاهده نشد. براساس مشاهدات ریخت‌شناختی و بررسی‌های مولکولی جدایه‌های شناسایی شده متعلق به گونه‌های *F. oxysporum* و *F. solani sensu lato* بودند این نتایج با گزارش‌های سایر محققان در ایتالیا (Di Primo & Cappelli,

2000; Di Primo et al., 2002; Fiori et al., 2011; Husaini et al., 2010;) هنـد ،(Belfiori et al., 2021 Gupta & Vakhlu, 2015; Mansotra et al., 2023; Mirghasempour et al.,) چـین ،(Gupta et al., 2021 2022a; Mirghasempour et al., 2022b; Ren et al., 2023)، مراکش (Aymani et al., 2019)، اسپانیا (Ahrazem et al., 2010; Rubio-Moraga et al., 2013) و آرژانتـین (Caligiore-Gei et al., 2023) مطابقت دارند.

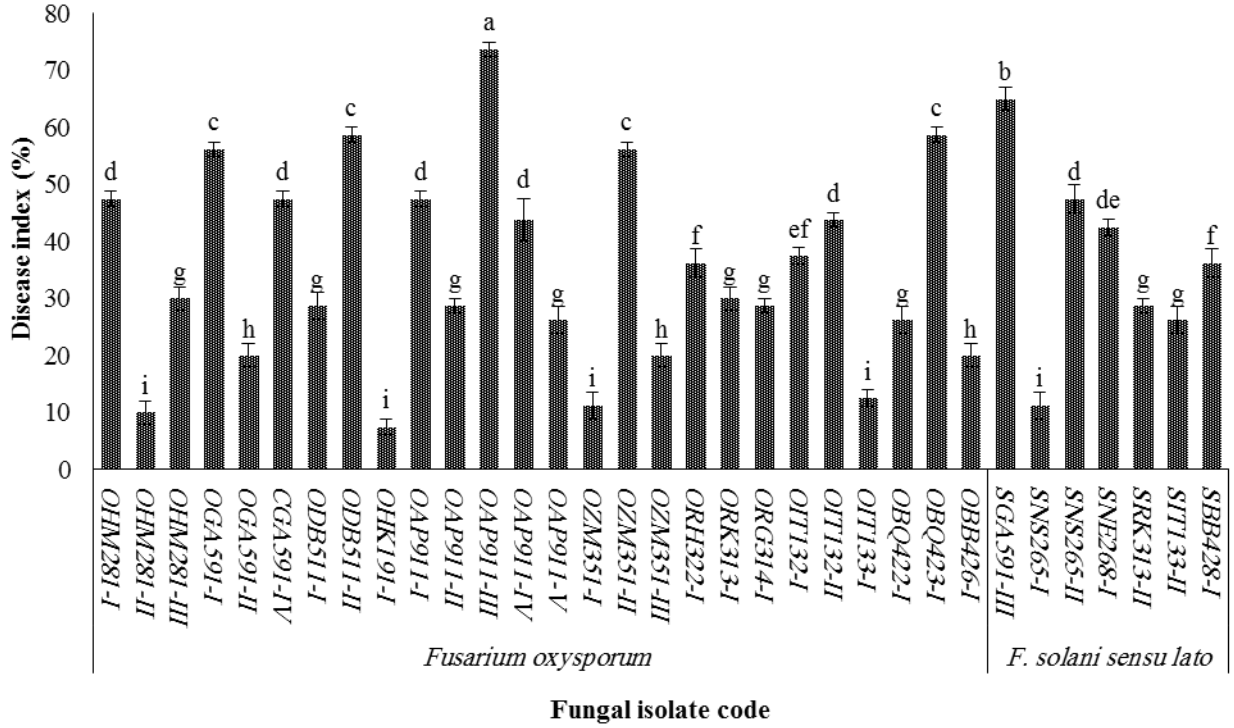


شکل ٤- حجم پوسیدگی ناشی از جدایه‌های مختلف *Fusarium* spp. روی بنه‌های زعفران. شاهد (a)؛ بنه‌های زعفران آلوده شده با قارچ *F. solani sensu lato* جدایه‌های SNS265-I (b)، SBB428-I (c) و SNS265-II (d)؛ آلوده شده با قارچ *F. oxysporum* جدایه‌های OZM351-I (e)، ODB511-I (f)، OAP911-IV (g)، OGA591-I (h) و OAP911-III (i).

Figure 4- The dry rot volume caused by different isolates of *Fusarium* spp. on saffron corms. Control (a); saffron corms inoculated by *F. solani sensu lato* isolates SNS265-I (b), SBB428-I (c) and SNS265-II (d); inoculated by *F. oxysporum* isolates OZM351-I (e), ODB511-I (f), OAP911-IV (g), OGA591-I (h) and OAP911-III (i).

بر اساس نتایج این پژوهش، بیشترین فراوانی جدایه‌های قارچی شناسایی شده به ترتیب متعلق به گونه‌های *F. oxysporum* (۲۶ جدایه، ۷۸/۸ درصد) و *F. solani sensu lato* (۷ جدایه، ۲۱/۲ درصد) بود. گونه *F. oxysporum* شایع‌ترین گونه شناسایی‌شده در این پژوهش است که با گزارش‌های سایر محققان (Gupta et al., 2020; Khaledi, 2020; Gupta et al., 2021; Caligiore-Gei et al., 2023) که این گونه را به‌عنوان گونه غالب معرفی کرده‌اند، مطابقت دارد.

مقایسه داده‌های به‌دست آمده از بررسی بیماریزایی جدایه‌های مختلف *Fusarium* روی بنه زعفران نشان داد که میان جدایه‌های گونه‌های مختلف *Fusarium* و همچنین جدایه‌های متفاوت از یک گونه تفاوت‌هایی معنی‌داری در میزان بیماریزایی وجود دارد (شکل ۴). بر اساس نتایج به‌دست آمده، تفاوت معنی‌داری در شاخص بیماری در بنه زعفران در بین نمونه‌های مورد آزمایش مشاهده شد (شکل ۵). نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌ها روی بنه زعفران بیماریزا بودند. نتایج این پژوهش، با مشاهدات مانسوترا و همکاران (Mansotra et al., 2023) مطابقت داد. آن‌ها گزارش کردند که تمامی جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium* spp. جداسازی شده بر روی بنه‌های زعفران بیماری زا بودند و درجات مختلفی از شاخص بیماری را نشان می‌دادند.



شکل ۵- مقایسه‌ی شاخص بیماری‌زایی (میانگین ± خطای استاندارد) جدایه‌های مختلف *Fusarium* spp. بر روی بنه‌های زعفران، (LSD 0.05 = 5.43)

Figure 5- A comparison of disease index (mean ± standard error) of different isolates of *Fusarium* spp. on saffron corms, (LSD 0.05 = 5.43).

نتایج آزمون بیماری‌زایی روی بنه‌ها نشان داد که میزان شاخص بیماری‌زایی ناشی از جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* از ۱/۴۴ ± ۷/۵ تا ۱/۲۵ ± ۷۳/۷ درصد و ناشی از جدایه‌های قارچ *F. solani sensu lato* از ۲/۳۹ ± ۱۱/۲ تا ۲/۰۴ ± ۶۵ درصد متغیر بود (شکل ۵). نتایج آزمون بیماریزایی روی بنه‌های زعفران نشان داد که کمترین شاخص بیماری مربوط به جدایه *F. oxysporum* OHK191-I به میزان ۱/۴۴ ± ۷/۵ درصد و بیشترین میزان آن مربوط به جدایه *F. oxysporum* OAP911-III به میزان ۱/۲۵ ± ۷۳/۷ درصد بود (شکل ۵).

میزان بیماریزایی جدایه‌های مختلف *Fusarium* روی بنه‌های زعفران نشان داد که تمامی جدایه‌های جداسازی شده از بنه‌های زعفران، بیماریزا و یا کم بیماریزا بودند. بر اساس نتایج واکاوی‌های آماری این پژوهش مشخص شد که جدایه‌های مربوط به این گونه‌های مختلف *Fusarium* از نظر شاخص بیماری‌زایی روی بنه‌های زعفران دارای اختلاف معنی‌داری هستند (شکل ۵) که با نتایج پژوهش‌های پیشین در تطابق بود (Palmero et al., 2014; Hussein et al., 2020; Belfiori et al., 2021; Mirghasempour et al., 2022a). بنه‌های آلوده منبع اصلی آلودگی بیماری پوسیدگی بنه زعفران می‌باشند نه خاک آلوده (Ren et al., 2023)، بنابراین قارچ بیمارگر *F. oxysporum* می‌تواند به صورت نهفته در بنه زعفران قرار داشته و در شرایط مزرعه موجب بروز بیماری در سطوح مختلف شود (Wani et al., 2016). بنابراین استفاده از بنه‌های سالم و گواهی شده و ضدعفونی آن‌ها قبل از کشت با قارچکش‌های توصیه شده، راهی عملی و اقتصادی برای پیشگیری و مدیریت این بیماری می‌باشد.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج این پژوهش نشان داد که قارچ‌های *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* و *F. solani sensu lato* به عنوان عوامل اصلی بیماری پوسیدگی فوزاریومی بنه زعفران در ایران می‌باشد. برای اولین بار گونه *F. oxysporum* f. sp. *gladioli* از مزارع زعفران در شهرستان‌های ملایر، بیجار، کنگاور، پارس آباد، مرند، نطنز، نجف‌آباد و گونه *F. solani sensu lato* از مزارع زعفران در شهرستان‌های آزادشهر، شیروان، اسفراین، کاشمر، نجف‌آباد، بشرویه از روی بنه زعفران گزارش شد. گونه‌های عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی روی بنه‌های زعفران بسته به مکان و شرایط آب و هوایی متفاوت هستند، اما ممکن است در طول زمان، به‌ویژه با تغییر شرایط آب و هوایی، تغییر کنند. باتوجه به دامنه میزبانی وسیع گونه‌های مختلف *Fusarium* و بقای طولانی‌مدت عامل بیماری در خاک و انتقال آن توسط بنه و خاک آلوده، ارزیابی وضعیت بنه‌های زعفران از نظر آلودگی به پوسیدگی فوزاریومی حائز اهمیت است. شناسایی عوامل پوسیدگی فوزاریومی بنه‌ی زعفران و ارزیابی میزان بیماریزایی آن‌ها می‌تواند در انتخاب راهکارهای مؤثر مدیریتی برای کاهش اثرات مخرب بیماری و افزایش میزان تولید محصول و بهبود سطح کیفیت و سلامت بنه‌های دختری تولیدی مؤثر باشد. اگرچه وضعیت مزارع مورد بررسی در کشور از نظر میزان آلودگی به عوامل پوسیدگی فوزاریومی در سطح قابل قبولی قرار دارد اما توجه به حفظ و حتی کاهش این میزان آلودگی با مدیریت مناسب مزرعه امکان پذیر است. استفاده از بنه‌های بذری سالم و گواهی شده به عنوان یکی از مهمترین اقدامات مدیریتی پیش از کاشت، ضمن حفظ ارزش زراعی و همچنین تمایز، یکنواختی و پایداری صفات، موجب جلوگیری از گسترش بیماری‌ها و کمک به دستیابی به پتانسیل واقعی عملکرد و بهبود کیفیت محصول می‌شود. یافته‌های این پژوهش دیدگاه‌های جدیدی را درباره وضعیت سلامت مزارع زعفران از نظر آلودگی به بیماری پوسیدگی فوزاریومی و پراکنش عوامل

فوزاریومی پوسیدگی بنه در ایران ارائه می‌دهد که می‌تواند به متخصصین و بهره برداران در تعیین مناطق مستعد برای کشت بنه گواهی‌شده زعفران کمک شایانی نماید.

سپاس‌گزاری

نگارندگان از مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال برای حمایت مالی از این پژوهش با شماره پروژه ۹۸۱۰۵۳-۰۲۸-۰۸۱۰۱۶۱۰-۰۸-۰۳ تشکر و قدرانی می‌نمایند.

منابع

Ahmadi, K., Ebadzadeh, H.R., Hatami, F., Mohammadnia-Afrozi, S., Esfandiarpour, E., & Abbasi Taleghani, R. (2021). Agricultural Statistics. Ministry of Agriculture-Jihad. Available at Web site https://maj.ir/Dorsapax/userfiles/Sub65/amarbaghi1400.pdf.

Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Castillo-Lopez, R., Trapero-Mozos, A., & Gómez-Gómez, L. (2010). Crocus sativus pathogens and defence responses. In A.M. Husaini (ed). Functional Plant Science and Biotechnology. Special Issue: Saffron. Global Science Book Isleworth, UK. p. 81-90. Available at Web site http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FPSB_4(SI2)/FPSB_4(SI2)81-90o.pdf.

Amiri-Jami, A. (2023). On the role of saffron bulb infection to soil born fungi on biology, behavior and damage of bulb Mite Rhizoglyphus robini Claparede (Acari: Astigmata). *Journal of Iranian Plant Protection Research*, *37*, 33-43. https://doi.org/10.22067/jpp.2023.79914.1118.

Aymani, I.E., Qostal, S., Mouden, N., Selmaoui, K., Touhami, A.O., Benkirane, R., & Douira, A. (2019). Fungi associated with saffron (*Crocus sativus*) in Morocco. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology*, *20*, 1180-1188. Available at Web site https://www.ikprress.org/index.php/PCBMB/article/view/4840/4479.

Avan, M., Palacıoğlu, G., Aksoy, C., Kaya, R., Bayraktar, H., Katırcıoğlu, Y.Z., & Maden, S. (2021). Characterization and pathogenicity of Rhizoctonia species causing root rot and damping-off on sugar beet in Turkey. *Current Microbiology, 78*, 1939-1948. https://doi.org/10.1007/s00284-021-02470-4.

Baba, S.A., Mohiuddin, T., Basu, S., Swarnkar, M. K., Malik, A.H., Wani, Z.A., Abbas, N., Singh, A.K., & Ashraf, N. (2015). Comprehensive transcriptome analysis of *Crocus sativus* for discovery and expression of genes involved in apocarotenoid biosynthesis. BMC *Genomics*, *16*, 698-712. https://doi.org/10.1186/s12864-015-1894-5.

Belfiori, B., Rubini, A., & Riccioni, C. (2021). Diversity of endophytic and pathogenic fungi of saffron (*Crocus sativus*) plants from cultivation sites in Italy. *Diversity, 13*, 535. https://doi.org/10.3390/d13110535.

Bhagat, N., Sharma, S., Ambardar, S., Raj, S., Trakroo, D., Horacek, M., Zouagui, R., Sbabou, L., & Vakhlu1, J. (2021). Microbiome fingerprint as biomarker for geographical origin and heredity in *Crocus sativus*: A feasibility study. *Frontiers in Sustainable Food Systems, 5*. https://doi.org/10.3389/fsufs.2021.688393

Boerema, G.H., & Hamers, M.E.C. (1989). Checklist for scientific names of common parasitic fungi, Amaryllidaceae and Iridaceae. *Netherlands Journal of Plant Pathology, 95*, 1-29. https://doi.org/10.1007/BF01981520.

Booth, C. (1971). The Genus Fusarium. Commonwealth Mycological Institute. CAB International; Kew, Surrey, England, 237 pp.

Booth, C. (1977). Fusarium laboratory guide to identification of major species. Common wealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 55 pp.

Brayford, D. (1996). IMI descriptions of fungi and bacteria set 127. *Mycopathologia, 133*, 47-48. https://doi.org/10.1007/BF00437097.

Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., & Backhouse, D. (1994). Laboratory manual for fusarium research (3nd ed). Fusarium Research Laboratory, Dept. of Crop Science, University of Sydney and Roayal Botanic Gardens, Sydney, Australia.

Caligiore-Gei, P.F., Moratalla-López, N., Poggi,

L.M., & Alonso, G.L. (2023). Isolation, identification, and determination of the virulence of the causal agents of corm rot of saffron (*Crocus sativus* L.) in Valle de Uco, Argentina. *Plants, 12*, 2717. https://doi.org/10.3390/plants12142717.

Crous, P., Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Seifert, K., Schroers, H., Chaverri, P., Gené, J., Guarro, J., Hirooka, Y., Bensch, K., Kema, G., Lamprecht, S., Cai, L., Rossman, A., Stadler, M., Summerbell, R., Taylor, J., Ploch, S., Visagie, C., Yilmaz, N., & Thines M. (2021). Fusarium: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology, 98*, 1-184. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116.

Dastranj, M., & Sepaskhah, A.R. (2019). Saffron response to irrigation regime, salinity, and planting method. *Scientia Horticulturae, 251*, 215-224. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.027.

Di Primo, P., & 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).

Di Primo, P.D., Cappelli, C., & Katan, T. (2002). Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. gladioli from saffron. *European Journal of Plant Pathology, 108*, 869-875. https://doi.org/10.1023/A:1021204022787.

Fallahi, H.R., Abbasi Avval Bohlooli, S., Pahlavan, Z., Hosseini, S.M., Hosseini, S.A.H., & Ghohestani-Bojd, P. (2021). Saffron vegetative growth as affected by transplanting and direct corm planting under field conditions. *Journal of Horticulture and Postharvest Research, 13*, 1-10. https://doi.org/10.22077/jhpr.2020.3635.1160.

Fiori M., Ligios V., & Schiaffino A. (2011). Identification and characterization of Burkholderia isolates obtained rom bacterial rot of saffron (*Crocus sativus* L.) grown in Italy. *Phytopathologia Mediterranea, 50*, 450-461. https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-8730.

Gupta, R., & Vakhlu, J. (2015). Native bacillus amyloliquefaciens W2 as a potential biocontrol for *Fusarium oxysporum* R1 causing corm rot of *Crocus sativus*. *European Journal of Plant Pathology, 143*, 123-131. https://doi.org/10.1007/s10658-015-0670-3.

Gupta, V., Kumar, K., Fatima, K., Razdan, V.K., Sharma, B.C., Mahajan, V., Rai, P.K., Sharma, A., Gupta, V., Hassan, M., & Hussain, R. (2020). Role of biocontrol agents in management of corm rot of saffron caused by Fusarium oxysporum. *Agronomy, 10*, 1398. https://doi.org/10.3390/agronomy10091398.

Gupta, V., Sharma, A., Rai, P. K., Gupta, S. K., Singh, B., Sharma, S. K., Singh, S. K., Hussain, R., Razdan, V. K., Kumar, D., Paswal, S., Pandit, V., & Shrama, R. (2021). Corm rot of saffron: epidemiology and management. *Agronomy, 11*, 339. https://doi.org/10.3390/agronomy11020339.

Hu, S., Wang, X.X., Sun, W.J., Wang, L.L., & Li, W.K. (2021). Investigation on main disease types of Crocus sativus in Chongming. *Chinese Society of Plant Pathology, 1*, 148-178. https://doi.org/10.26914/c.cnkihy.2021.063781.

Husaini, A.M., Hassan, B., & Ghani, M.Y. (2010). Saffron (*Crocus sativus* L. Kashmirianus) cultivation in Kashmir: practices and problems. *Functional Plant Sciences Biotechnology, 4*, 108-115. Available at Web site: http://www.globalsciencebooks.info/Online/GSBOnline/images/2010/FPSB_4(SI2)/FPSB_4(SI2)108-115o.pdf.

Hussein, M.A., Gherbawy, Y., & El-Dawy, E.G. A. (2020). Characterization, pathogenicity and enzymatic profile of Fusarium solani associated with potato tubers in Upper Egypt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection, 53*, 495-508. https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1761223.

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 and Technology, 8*, 243-259. https://doi.org/10.22048/jsat.2020.184121.1349.

Koocheki, A., & 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. https://doi.org/10.22077/jsr.2015.290.

Kour, K., Gupta, D., Gupta, K., Dhiman, G., Juneja, S., Viriyasitavat, W., & Islam, M.A.

(2022). Smart-hydroponic-based framework for saffron cultivation: a precision smart agriculture perspective. *Sustainability, 14*, 1120. https://doi.org/10.3390/su14031120.

Leslie, J.F., & Summerell, A.B. (2006). The Fusarium Laboratory Manual. Ames: Blackwell Publishing Professional. 388 pp. https://doi.org/10.1002/9780470278376.

López, R. C., & Gómez-Gómez, L. (2009). Isolation of a new fungi and wound-inducedchitinase class in corms of *Crocus sativus*. *Plant Physiology and Biochemistry, 47*, 426-434. https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.01.007.

Mansotra, R., Ali, T., Bhagat, N., & Vakhlu, J. (2023). Injury and not the pathogen is the primary cause of corm rot in *Crocus sativus* (saffron). *Frontiers in Plant Science, 14*, 1074185. https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1074185.

McDonald, B.A. (1997). The population genetics of fungi: tools and techniques. *Phytopathology, 87*, 448-453. https://doi.org/10.1094/PHYTO.1997.87.4.448.

Mirghasempour, S.A., Studholme, D.J., Chen, W., Cui, D., & Mao, B. (2022a). Identification and characterization of *Fusarium nirenbergiae* associated with saffron corm rot disease. *Plant Disease, 106*, 486-495. https://doi.org/10.1094/PDIS-04-21-0871-RE.

Mirghasempour, S.A., Studholme, D.J., Chen, W., Zhu, W., & Mao, B. (2022b). Molecular and pathogenic characterization of Fusarium species associated with corm rot disease in saffron from China. *Journal of Fungi, 8*, 515. https://doi.org/10.3390/jof8050515.

Mulè, G., Susca, A., Stea, G., & Moretti, A. (2003). Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from Asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiology Letters, 230*, 235-240. https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00926-1.

Müller, M.E.H., Steier, I., Köppen, R., Siegel, D., Proske, M., Korn, U., & Koch, M. (2012). Cocultivation of phytopathogenic Fusarium and Alternaria strains affects fungal growth and mycotoxin production. *Journal of Applied Microbiology, 113*, 874-887. https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05388.x.

Najari, G., Nourollahi, K., & 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. https://doi.org/10.22048/jsat.2017.59518.1185.

Naseri, M., Ramandi, A., & Mohammadi tazehabadi, M. (2023). Effect of saffron corm aqueous extract on blood glucose level enzymes of liver tissue in streptozotocin-induced diabetic Rats. *Saffron Agronomy and Technology, 11*, 87-97. https://doi.org/10.22048/jsat.2023.365486.1471.

Nehvi, F.A., & Yasmin, S. (2017). Advance in saffron research for integrated development of saffron in Kashmir, India. *Acta Horticulturae, 1184*, 6368. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1184.9.

Nehvi, F.A., Wani, S.A., Dar, S.A., Makhdoomi, M.I., Allie, B.A., & Mir, Z.A. (2007). New emerging trends on production technology of saffron. *Acta Horticulturae, 739*, 375-382. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2007.739.49.

Nelson, P.E., Horst, R.K., & Woltz, S.S. (1981). Fusarium diseases of ornamentalplants. In Nelson, P. E., Toussoun, T. A., Cook, R. J. (eds.). Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy. Pennsylvania State University Press, Pennsylvania, p. 121-128.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A., & Marasas, W.F.O. (1983). Fusarium species, An Illustrated Mannual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park. 193 pp.

Palmero, D., Rubiomoraga, A., Galvezpaton, L., Nogueras, J., Abato, C., Gomezgomez, L., & Ahrazem, O. (2014). Pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from corms of *Crocus sativus*. *Industrial Crops and Products, 61*, 186-192. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.06.051.

Rana, A., Sahgal, M., & Johri, B.N. (2017) *Fusarium oxysporum*: genomics, diversity and plant-host interaction. In Developments in fungal biology and applied mycology Springer, Singapore, p. 159-199. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4768-8_10.

Ren, T., Dai, D., Yu, M., Li, T., & Zhang, C. (2023). Identification and characterization of pathogens causing saffron corm rot in China.

Frontiers in Microbiology, 14, 1188376. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1188376.

Rubio-Moraga, T., Gómez-Gómez, L., Trapero, A., Castro-Díaz, N., & Ahrazem, O. (2013). Saffron corm as a natural source of fungicides: the role of saponins in the underground. *Industrial Crops and Products, 49*, 915-921. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.06.029.

Saeidi Aboueshaghi, R., Omidi, H., & Bostani, A. (2022). Effect of chicken manure and chemical fertilizers on some morphological characteristics and flowers production and replacement corm of saffron (*Crocus sativus* L.) under irrigation regimes. *Journal of Saffron Agronomy and Technology, 10*, 19-39. https://doi.org/10.22048/jsat.2022.300362.1436

.

Shamli, S. (2019). Occurrence of fungal disease of saffron in Golestan province. *Saffron Promotional Journal, 1*, 27-32. (In Persian).

Vafaei, S.H., & Darvishian, E. (2022). Etiology of corm rot of saffron in Khorramabad. *Journal of Saffron Research, 10*, 294-285. https://doi.org/10.22077/jsr.2022.5616.1195.

Wani, Z.A., Mirza, D.N., Arora, P., & Riyaz-Ul-Hassan, S. (2016). Molecular phylogeny, diversity, community structure, and plant growth promoting properties of fungal endophytes associated with the corms of saffron plant: An insight into the microbiome of *Crocus sativus* Linn. *Fungal Biology, 120*, 1509-1524. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2016.07.011.