



مقاله علمی - پژوهشی

بررسی بیماری زایی گونه *Alternaria alternata* روی برگ و کورم زعفران در آزمایشگاه و گلخانه

علی حسین نیا<sup>۱</sup> و عباس محمدی<sup>۲\*</sup>

تاریخ پذیرش: ۱۶ آذر ۱۳۹۵

تاریخ دریافت: ۱ خرداد ۱۳۹۵

حسین نیا، ع. و محمدی، ع. ۱۳۹۷. بررسی بیماری زایی گونه *Alternaria alternata* روی برگ و کورم زعفران در آزمایشگاه و گلخانه. زراعت و فناوری زعفران، ۶(۱): ۶۱-۷۲.

چکیده

تولید زعفران، با ارزش ترین گیاه دارویی و ادویه ای شرق ایران، تحت تأثیر بیمارگرهای مختلفی قرار می گیرد. این تحقیق با هدف جداسازی، شناسایی و بررسی بیماری زایی جدایه های *Alternaria alternata* به عنوان عامل پوسیدگی کورم و برگ گیاه زعفران، در سال های ۹۴-۱۳۹۳ با نمونه برداری از خاک و بافت های گیاهی نواحی مختلف دشت بیرجند صورت گرفت. جدایه های قارچی به کمک محیط کشت عصاره سیب زمینی دکستروز آگار جداسازی و خصوصیات ریخت شناسی آن ها بر روی محیط کشت سیب زمینی هویج آگار بررسی شد. دی ان آی ژنومی جدایه های قارچی به روش CTAB استخراج و زیر واحدهای ریپوزومی به کمک آغازگرهای ITS1 و ITS4 تکثیر گردیدند. آزمون بیماری زایی جدایه ها بر روی گیاه زعفران به سه روش تلقیح برگ های بریده شده، تلقیح کورم زعفران در شرایط آزمایشگاهی و تلقیح گیاه زعفران درون گلخانه انجام شد. بر اساس خصوصیات ریخت شناسی، ۸۰ جدایه *A. alternata* در این تحقیق از دشت بیرجند شامل شهرستان های بیرجند، خوسف و سربیشه جداسازی گردیدند. در آزمون های بیماری زایی، پس از ۳ تا ۵ روز، برگ های بریده شده در محل تلقیح ابتدا کلروز و سپس نکروز بافت ها مشاهده گردید. کورم ها در محل تلقیح پوسیده شده و برگ های گیاهان تلقیح شده در گلخانه نیز دچار زردی و خشکیدگی شدند. شدت پوسیدگی و توسعه آن در جدایه های مختلف تقریباً یکسان و پس از ۵ روز غده های آلوده، پوسیده شده و بافت برگ ها نکروزه گردیدند. توالی ناحیه ITS جدایه ها ۱۰۰ درصد با توالی جدایه های *A. alternata* بانک ژن شباهت داشتند و در شجره فیلوژنتیکی با آن ها در یک گروه قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان داد که *A. alternata* پتانسیل ایجاد پوسیدگی کورم، لکه برگی، کلروز و نکروز برگ های زعفران را در صورت وجود شرایط بیماری زایی، دارا است. این تحقیق اولین گزارش از بیماری زایی این قارچ روی بافت های مختلف زعفران در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه است.

کلمات کلیدی: بیرجند، بیماری زایی، پوسیدگی، تلقیح، لکه برگی.

۱ - دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

۲ - دانشیار گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

\*- نویسنده مسئول: Amohammadi@birjand.ac.ir

## مقدمه

زعفران (*Crocus sativus* L.) از خانواده زنبقیان، گیاهی علفی، چندساله، بدون ساقه و دارای بنه است (Negbi, 2003). کشت این گیاه از قدیم در برخی نقاط دنیا مانند ایران، هند، ایتالیا و یونان متداول بوده و ایران ۹۵ درصد از زعفران جهان را تولید می‌کند. بیش از ۳۵۱ تن زعفران در سال از ۱۳۹۴ هزار هکتار مزارع آبی کشور برداشت گردیده که بخش اعظم آن در استان‌های خراسان رضوی و جنوبی تولید شده است (Anonymus, 2014). یکی از عوامل تأثیرگذار بر رشد و میزان محصول زعفران، بیمارگرهای قارچی، باکتریایی و نامتدی هستند (Ahrazem et al., 2010). تاکنون گونه‌های قارچی زیادی توسط پژوهشگران از مزارع زعفران در سرتاسر جهان جداسازی گردیده‌اند که برخی از این گونه‌های قارچی بر روی گیاه زعفران بیماری‌زا و برخی دیگر، فقط بخشی از میکوفلور زعفران بوده‌اند.

قارچ آلترناریا (*Alternaria* spp.) بیش از ۲۷۵ گونه دارد که گونه غالب در اکثر خاک‌ها و بافت‌های گیاهی، گونه *A. alternata* است. این گونه گسترش جهانی داشته و غلات، گیاهان زینتی، روغنی، سبزیجات از جمله کلم بروکلی، بادمجان، فلفل، هویج، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی، لوبیا و میوه‌هایی مانند مرکبات، سیب، توت و هلو را مورد حمله قرار می‌دهد (Droby et al., 1984; Akimitsu et al., 2003; Simmons, 2007). آلترناریا با ایجاد لکه روی برگ‌ها و قسمت‌های سبز گیاه و کاهش فتوسنتز باعث بیماری می‌شود (Woudenberg, 2015). این قارچ با تولید آنزیم‌های سلولاز و پکتین‌متیل-گالاکتوروناز، دیواره سلولی را تجزیه کرده و با تولید اسید-آلترناریک، سلول میزبان را از بین برده، مواد غذایی مورد نیاز خود را جذب کرده و روی میزبان تکثیر می‌گردد. پاتوتیپ‌های *A. alternata* به علت توانایی‌های تولید توکسین‌های اختصاصی

میزبان، دامنه میزبانی مشخص و محدود دارند (Templeton, 2013). برخی از جدایه‌های این قارچ نیز غیر بیماری‌زا بوده و به‌صورت ساپروفیت یا اندوفیت روی سطح و درون بافت‌های گیاهی رشد می‌نمایند.

یکی از گونه‌های این قارچ که تاکنون از گیاه زعفران جداسازی شده است گونه *A. alternata* است. راج و همکاران (Raj et al., 2013) در بررسی گونه‌های قارچی اندوفیت مزارع زعفران منطقه کیشتوار هند، گونه‌های قارچ آلترناریا را همراه دیگر گونه‌های قارچی مانند ریزوکتونیا، فوزاریوم، فیتوفترا، تریکودرما و پنی سیلیوم را از خاک و بافت زعفران جداسازی کردند (Raj et al., 2013). به استثنای مطالعه فوق که بیشتر بر مبنای اثر عصاره زعفران بر قارچ آلترناریا بوده و نه بیماری‌زایی آن‌ها، مطالعه دیگری در مورد بیماری‌زایی این قارچ روی گیاه زعفران صورت نگرفته است ولی بیماری‌زایی دیگر گونه‌های قارچی در کشورهای دارای مزارع زعفران مطالعه شده‌اند.

زادوکس در سال ۱۹۸۱ پوسیدگی بنفش زعفران به‌وسیله قارچ *Rhizoctonia violaceae* را از اسپانیا گزارش کرد (Zadoks, 1981). گونه *Macrophomina phaseolina* عامل پوسیدگی ۳۰ تا ۴۰ درصد کورم‌های زعفران در فاصله سال‌های ۱۹۸۹-۹۰ در بخش‌هایی از هندوستان بوده است (Thakur et al., 1992). گونه *Fusarium oxysporum* f. *gladioli* sp. عامل پوسیدگی کورم زعفران در اسپانیا معرفی شده است (Di Primo & Cappelli, 2000). حسن و دوی (Hassan & Devi, 2003) گونه‌هایی از جنس فوزاریوم، پنی-سیلیوم و ریزوکتونیا را عامل پوسیدگی کورم زعفران در منطقه کشمیر هند تشخیص دادند. وانی و دار (Wani & Dar, 2004) سه گونه *F. solani*، *F. moniliforme*، و *F. oxysporum* را عامل پوسیدگی کورم زعفران در کشمیر هند معرفی کرده‌اند.

سربیشه، از خاک و بافت‌های گیاهی که لکه‌های تیره‌رنگ مشکوک به آلودگی توسط جنس آلترناریا را داشتند، انجام گرفت. جداسازی قارچ عامل بیماری از بافت گیاهی، پس از ضدعفونی سطحی بافت‌های آلوده به وسیله وایتکس ۱۰ درصد به مدت ۱ دقیقه و کشت آن‌ها روی محیط کشت عصاره سیب‌زمینی دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar) صورت گرفت (Hong & Pryor, 2004). جداسازی از خاک با استفاده از محیط کشت زاپک‌آگار (Czapek's-Dox Agar) حاوی رزینگال انجام شد. خالص‌سازی جدایه‌ها با تک‌اسپور کردن روی محیط آب آگار (Water agar) ۲ درصد صورت گرفت (Samson et al., 2004). خصوصیات ریخت‌شناسی جدایه‌ها با استفاده از پرگنه‌های یک‌هفته‌ای قارچ بر روی محیط سیب-زمینی هویج آگار (Potato Carrot Agar) بررسی گردید (Atlas, 2010).

محیط کشت‌های PCA تلقیح شده با جدایه‌های قارچی، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، زیر نور سفید فلورسنت با چرخه ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند و پس از ۷ روز خصوصیات پرگنه‌ها بررسی گردید (Simmons, 2007). صفات ریخت‌شناسی مورد مطالعه شامل اندازه، رنگ و آرایش بندهای اسپور، وجود یا عدم وجود نوک در اسپورها و طول آن، تزیینات سطح اسپور و ابعاد کنیدیوفورها بود (Simmons, 2007; Woudenberg, 2015). برای به دست آوردن ابعاد اسپور، میانگین اندازه‌های ۵۰ اسپور محاسبه گردید. تشخیص گونه‌ها بر اساس خصوصیات فوق با استفاده از کلید شناسایی سیمونز (Simmons, 2007) صورت گرفت.

#### شناسایی مولکولی جدایه‌ها

##### استخراج دی‌ان‌آی جدایه‌های قارچی

ابتدا ۵۰ میلی‌گرم بافت ریشه ۷ روزه رشد کرده از هر جدایه بر روی محیط PCA، به کمک ازت مایع در هاون چینی استریل

قارچ *Sclerotium rolfsii* عامل پوسیدگی اسکروتیومی کورم زعفران در بخش‌هایی از کشور هندوستان به شمار می‌رود (Khalha et al., 2007). نوربخش و همکاران (Noorbakhsh et al., 2009) تعداد زیادی از گونه‌های آسپرژیلوس مولد آفاتوکسین را از گیاه زعفران در ایران جداسازی کرده‌اند که برخی از آن‌ها توانایی ایجاد پوسیدگی بر روی کورم زعفران را داشتند. اهرازم و همکاران (Ahrazem et al., 2010) تعدادی از گونه‌های قارچی را از گیاه زعفران در اسپانیا جداسازی کرده‌اند که برخی از آن‌ها بیماری‌زا و برخی دیگر غیر بیماری‌زا بودند. محمدی و امینی (Mohammadi & Amini, 2015) جدایه‌های *Acrostalagmus luteoalbus* را به عنوان یک قارچ غیربیماری‌زا و نجار (Najjar, 2016) چهار گونه آسپرژیلوس مولد آفاتوکسین را از میکوفلور زعفران در شرق ایران جداسازی نموده‌اند.

قارچ *A. alternata* در حال حاضر بیمارگر مهم مزارع زعفران نبوده و از نظر اقتصادی، از میزان خسارت آن در مزارع زعفران آماری در دست نیست ولی در صورت بالا بودن رطوبت مزرعه، گسترش آفات و بروز تنش‌های محیطی که به این گیاه خسارت می‌زند، شرایط برای گسترش این قارچ فراهم شده و در صورت دارا بودن قدرت بیماری‌زایی، خسارت اقتصادی به بار خواهد آورد. از آنجایی که تاکنون پژوهشی در خصوص بیماری‌زایی این گونه بر روی گیاه زعفران در ایران و به خصوص در شرق کشور صورت نگرفته است، این تحقیق با هدف بررسی بیماری‌زایی آن بر روی بخش‌های مختلف گیاه زعفران در شرایط آزمایشگاه و گلخانه انجام شد.

#### مواد و روش‌ها

##### نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در مناطق مختلف دشت بیرجند، شامل شهرستان بیرجند و بخش‌هایی از شهرستان‌های خوسف و

رنگ فلورسنت DNAsafe با ولتاژ ۹۰ میلی آمپر الکتروفورز شده و با دستگاه ژل داکيومنت مدل Cleaver translaminator از آن عکس برداری شد.

نواحی تکثیرشده با آغازگرهای ITS1&4، خالص سازی و توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی (Macrogen Co.) توالی آنها تعیین گردیدند. با توجه به یکسان بودن خصوصیات ریخت شناسی جدایه‌ها، توالی ناحیه فوق در ۴ جدایه به عنوان نمونه، مورد بررسی قرار گرفت. تنظیم اولیه توالی‌ها و همسانه سازی آنها با داده‌های بانک ژن NCBI و MycoBank، با استفاده از نرم افزارهای ClastalX و Mega6 انجام شد (Tamura et al., 2013). داده‌ها با استفاده از روش‌های فاصله و حداکثر شباهت در نرم افزار Mega6 آنالیز گردیدند. با کمک توالی‌های به دست آمده در این تحقیق و داده‌های بانک ژن NCBI و MycoBank، شجره‌ی فیلوژنتیکی با استفاده از برنامه Mega6 طراحی گردید (Tamura et al., 2013). استحکام درخت فیلوژنتیکی با کاربرد Bootstrap (۱۰۰۰) آزمایش گردید.

#### بررسی قدرت بیماری‌زایی *A. alternata*

##### بررسی بیماری‌زایی روی برگ‌های بریده شده

بیماری‌زایی جدایه‌های *A. alternata* در شرایط آزمایشگاهی به روش تلقیح برگ‌های بریده شده انجام شد (Sharma et al., 2004). در این روش، برگ‌های بریده شده گیاه زعفران که فاقد هرگونه علائم و آلودگی ظاهری بودند، انتخاب و با محلول وایتکس ۱۰ درصد استریل شدند. روی برگ‌ها با نوک سوزن ظریف و استریل، زخم کوچکی ایجاد و قطعات ۵×۵ میلی متری از پرگنه ۷ روزه قارچ بر روی محیط PCA، روی آن قرار داده شد. از قطعات محیط کشت PCA و پرگنه قارچ *Bipolaris sp.* به عنوان شاهد، برای تلقیح بافت برگ‌ها استفاده شد. برگ‌های تلقیح شده برای حفظ رطوبت و

خرد گردیده و به ویال‌های استریل ۲ میلی لیتری منتقل شد. سپس ۶۰۰-۸۰۰ میکرولیتر بافر استخراج CTAB2X و یک میکرولیتر پروتئیناز K به آن اضافه و ورتکس گردید تا کاملاً سوسپانسیون یکنواخت به دست آید. در مرحله بعد به مدت ۳۰-۶۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از سرد شدن لوله‌ها، هم حجم محتویات آنها، کلروفرم اضافه گردید و هم زده شد. لوله‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۳۰۰۰ هزار دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ و محلول رویی آنها به داخل تیوب‌های ۲ میلی لیتری منتقل شد. مقدار ۶۰۰ تا ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول سرد به آنها اضافه گردید و دوباره با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از حذف محلول رویی، لوله‌ها روی یک دستمال کاغذی استریل به صورت وارونه قرار داده شده تا خشک گردند. سپس مقدار ۵۰-۱۰۰ میکرولیتر آب دیونیزه استریل به آنها اضافه شد (Raeder & Broda, 1985; Griffiths et al., 2006). ارزیابی کیفیت دی‌ان‌ای استخراج شده روی ژل آگارز ۱٪ در دستگاه الکتروفورز و عکس برداری با دستگاه ژل داکيومنت مدل Cleaver translaminator انجام شد.

نواحی ITS جدایه‌ها با آغازگرهای ITS1:5-۳ و ITS4:5- TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 تکثیر گردیدند (Houbraken et al., 2007). تکثیر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Biometra و طبق برنامه واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه در یک سیکل، واسرشت در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه، بسط در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه در ۳۵ سیکل و بسط نهایی به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد در ۱ سیکل انجام شد (Houbraken et al., 2007). بعد از انجام واکنش، محصول تکثیر روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی ۱ درصد

داشتند، انتخاب گردیده و برگ‌های خشک آن‌ها حذف شد تا جمعیت ساپروفیت‌های احتمالی روی برگ‌های مرده بر نتایج آزمون تأثیری نگذارد. سوسپانسیون  $10^6$  اسپور قارچ *A. alternata* از پرگنه‌های ۷ روزه آن روی محیط PCA درون آب مقطر استریل تهیه گردید و بر روی برگ‌های زعفران در شرایط گلخانه اسپری شد. گلدان‌های تلقیح شده به مدت ۴۸ ساعت در شرایط رطوبت نسبی ۹۰ درصد و دمای  $25^{\circ}\text{C}$  قرار داده شده و سپس به فضای گلخانه منتقل گردیدند (Palmero et al., 2014). نتایج این آزمون پس از یک هفته بررسی شد و از برگ‌هایی که علائم لکه‌برگی داشتند، دوباره قارچ عامل بیماری به کمک محیط کشت PCA جداسازی گردید. همانند دو آزمون قبل، از آب مقطر خالص و سوسپانسیون اسپور قارچ *Bipolaris sp.* به عنوان شاهد استفاده گردید.

## نتایج و بحث

### خصوصیات ماکروسکوپی قارچ

پرگنه‌های قارچ پس از ۷ روز روی محیط PCA، رنگ قهوه‌ای خاکستری تیره داشتند و ریشه‌ها درون محیط کشت و یا روی سطح آن رشد کردند. پرگنه‌ها، فاقد ریشه هوایی بوده و رشد آن‌ها تغییری در رنگ محیط کشت ایجاد نکرد. کنیدیوفورها منفرد و در برخی جدایه‌ها در انتها منشعب بودند. کنیدی‌ها به صورت دسته‌ای روی کنیدیوفورها تشکیل شدند. اسپوره‌های قارچ سطح محیط کشت را به طور یکنواخت پوشانده و پرگنه‌ها فاقد دواير متحدالمرکز ناشی از تفاوت اسپورزایی در تاریکی و روشنایی بودند (شکل ۱ و a - A).

### خصوصیات میکروسکوپی

کنیدیوفورها به رنگ زرد کهربایی تا قهوه‌ای روشن، غالباً ساده، کوتاه، به طول ۳۰-۶۰ میکرومتر و در انتها خمیدگی‌های زانویی داشتند. کنیدیوفورهای ثانویه انتهایی و کوتاه، کنیدی‌ها

شادابی، بر روی کاغذ صافی استریل مرطوب شده با آب مقطر استریل، درون تشتک پتری استریل، در انکوباتور  $25^{\circ}\text{C}$  در تاریکی نگهداری شدند (Akimitsu et al., 2003). پس از ۳-۷ روز، علائم ایجادشده بر روی برگ‌ها، موردبررسی قرار گرفت. جداسازی دوباره قارچ آلترناریا از بافت‌های برگ تلقیح شده با کشت آن‌ها بر روی محیط کشت PCA صورت گرفت.

### بررسی بیماری‌زایی *A. alternata* بر روی کورم زعفران

به منظور تعیین بیماری‌زا *A. alternata* بر روی کورم زعفران، پوست لایه‌های سطحی کورم‌های کاملاً سالم زعفران حذف شده و کورم‌ها با وایتکس ۱۰ درصد، استریل سطحی شدند. با سوزن استریل، زخمی کوچک درون کورم ایجاد گردید و قطعه  $2 * 2$  میلی‌متری از قارچ رشد کرده بر روی محیط PCA درون آن قرار داده شد. تیمار شاهد در این آزمون، شبیه آزمون قبل، بافت محیط کشت PCA و پرگنه قارچ *Bipolaris sp.* بود. کورم‌های تلقیح شده، بر روی کاغذ صافی استریل مرطوب درون تشتک پتری و در داخل انکوباتور در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  قرار داده شدند. بعد از حدود ۴-۵ روز، اثر قارچ بر روی بافت کورم‌ها بررسی گردید (Palmero et al., 2014). جداسازی دوباره قارچ از کورم‌های تلقیح شده، با کشت بافت حذف‌شده ناحیه دارای علائم پوسیدگی و بافت سالم صورت گرفت.

### بررسی بیماری‌زایی *A. alternata* بر روی گیاه زعفران در شرایط گلخانه

برای بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *A. alternata* بر روی گیاه زعفران در شرایط گلخانه، پوست پیازهای سالم زعفران حذف و در جعبه‌های  $20 \times 30$  سانتی‌متری، درون خاک فاقد آلودگی کاشته شدند. جعبه‌های فوق در شرایط محیط بیرون از گلخانه قرار داده شدند تا بوته‌های زعفران به خوبی رشد کنند. ۱۰ گیاه زعفران کاملاً سالم که هر کدام ۵-۶ برگ سبز و فعال

با توجه به قرار گرفتن جدایه‌های این تحقیق با جدایه‌های گروه *A. alternata* در یک گروه و با استناد به خصوصیات ریخت‌شناسی کلید شناسایی سیمونز (Simmons, 2007) که کاملاً با خصوصیات گونه آلترناریا آلترناتا هم‌خوانی داشت، جدایه‌های این تحقیق به‌عنوان گونه *A. alternata* شناخته شدند.

### نتایج آزمون بیماری‌زایی

در آزمون تلقیح برگ‌های بریده‌شده، پس از ۴ روز، علائم زردی و کلروز در محل تلقیح برگ‌ها مشاهده گردید که این تغییر رنگ، از محل تلقیح به دو طرف برگ گسترش پیدا کرد. نواحی زرد شده پس از مدتی دچار نکروز و پوسیدگی شدند که این پوسیدگی همراه با تیره شدن و خشک شدن بافت‌ها بود. در نمونه‌های شاهدهی که با محیط PCA و قارچ *Bipolaris sp.* تلقیح شده بودند، هیچ‌گونه تغییر رنگ یا مرگ بافت در محل تلقیح روی برگ‌ها مشاهده نگردید (شکل B-۱). بافت‌های تلقیح نشده و شاهد، علاوه بر این‌که هیچ‌گونه علائمی نشان ندادند، کاملاً شاداب بوده و در بافت آن‌ها تغییری ایجاد نشده بود. که دلیلی بر عدم تأثیر شرایط آزمایش بر خصوصیات بافت‌ها بود. نتایج این بخش نشان داد که گونه *A. alternata* قادر است روی برگ‌های زعفران در شرایط آزمایشگاهی کلروز و نکروز ایجاد کرده و بافت برگ را بپوساند. برگ‌های استفاده شده در این آزمون از برگ‌های با سنین رشد مختلف انتخاب شده بودند که نتایج نشان داد قارچ *A. alternata* قادر به آلوده کردن برگ‌ها در تمام دوره رشدی گیاه است.

تکنیک تلقیح برگ‌های بریده‌شده، روش پذیرفته‌شده‌ای برای بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های آلترناریا بر روی بافت‌های گیاهان زراعی است. این روش قبلاً جهت بررسی واکنش ارقام مختلف گوجه‌فرنگی به آلترناریا (Foolad et al., 2000)، مطالعه واکنش ارقام سیب‌زمینی به آلترناریا (Droby et al.,

زنجیری، منشعب و اغلب یک‌سلولی بودند. زنجیره‌های جانبی بلندتر بوده و طول برخی به ۲۵ میکرومتر هم می‌رسید. کنیدی-ها قهوه‌ای‌رنگ، بیضوی تا تخم‌مرغی شکل ولی جوان‌ترها گرد بودند. اندازه کنیدی‌ها ۴-۱۲ × ۲۲-۳۰ میکرومتر، ۳-۷ دیواره عرضی و ۱-۳ دیواره طولی تیره داشتند. سطح کنیدی‌ها منقوس تا زگیل‌دار بود که در برخی موارد نقوش سطحی مانع از دیده شدن دیواره‌ها می‌گردیدند.

تکثیر ناحیه ITS در جدایه‌ها انجام شد و ناحیه‌ای در حدود ۴۰۰ جفت باز در همه جدایه‌ها تکثیر گردید که از نظر اندازه بر روی ژل آگارز تفاوتی با یکدیگر نداشتند. با توجه به اینکه تمام جدایه‌ای آلترناریای جداسازی شده در این تحقیق بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی به یک‌گونه تعلق داشتند، تعداد ۴ جدایه به‌عنوان الگو جهت تعیین توالی ناحیه ITS و تأیید گونه انتخاب شدند.

آغازگرهای ITS1 و ITS4 توانستند ناحیه‌ای ۴۰۰ جفت بازی از ژنوم قارچ را تکثیر کنند (شکل A-۲) که توالی این نواحی صد درصد با توالی ناحیه ITS جدایه‌های گروه *A. alternata* و *A. tenuissima* بانک ژن NCBI و MycoBank شباهت داشتند ولی با برخی دیگر از گونه‌های آلترناریا بیش از ۴ درصد تفاوت ژنتیکی در توالی ناحیه تکثیرشده داشتند (شکل B-۲). در درخت ژنتیکی طراحی‌شده بر اساس توالی‌های این تحقیق و توالی‌های موجود در بانک ژن (شکل C-۲)، جدایه‌های این تحقیق با جدایه‌های *A. alternata* در یک گروه فیلوژنتیکی قرار گرفتند. جدایه‌های این تحقیق با دیگر گونه‌های آلترناریا مانند گونه *A. consortialis* و گونه‌های جنس *Embellisia sp.* که شباهت زیادی با قارچ آلترناریا دارند، در گروه‌های فیلوژنتیکی مختلفی قرار گرفتند (شکل C-۲). از آنجایی که توالی ناحیه ITS قادر به تفکیک برخی گونه‌های آلترناریا نبود، خصوصیات ریخت‌شناسی مبنای تفکیک از گونه‌هایی بودند که توالی یکسان داشتند.

نماید. از طرفی در آزمون بیماری‌زایی حتماً باید قارچ با بافت گیاه تماس داشته باشد. در صورت عدم حذف پوشش، قارچ تماس مستقیم با بافت کورم نداشته و ممکن بود شرایط بیماری‌زایی فراهم نگردد، بنابراین حذف پوشش کورم در این آزمون، مغایرتی با شرایط فعالیت قارچ در مزرعه ندارد. هرچند ای کاهش یا حذف پوشش کورم‌ها در زمان از بین رفتن کورم-های مادری یا در طول دوره تابستان درون خاک ممکن است اتفاق بیفتد.

یکی دیگر از شرایط این آزمون، زخمی نمودن بافت کورم‌ها بود. زخمی شدن کورم امکان ورود قارچ به درون بافت را فراهم نمود. هرچند این شرایط ممکن است تا حدودی با شرایط کورم-ها در مزرعه تفاوت داشته باشد، با این وجود در برخی موارد در مزرعه ممکن است همین وضعیت ایجاد گردد. در اثر تغذیه حشرات و کنه‌ها، کورم‌ها دچار زخم شده و شرایط برای ورود قارچ فراهم می‌گردد، بنابراین زخم ایجادشده بر روی کورم‌ها، در مزرعه نیز ممکن است توسط بسیاری از عوامل محیطی ایجاد گردیده و تفاوت زیادی میان شرایط این آزمون در مزرعه و در آزمایشگاه وجود نداشته است.

در شرایط گلخانه، ۳ تا ۵ روز پس از تلقیح بوته‌های زعفران، علائم زردی و کلروز برگ‌ها در محل‌های تلقیح، مشاهده گردید (شکل E-۱). علائم ایجادشده در این آزمون با علائم ایجادشده در آزمون برگ‌های بریده تشابه بسیار زیادی داشت ولی سرعت گسترش علائم بسیار کمتر از سرعت گسترش لکه‌ها در آزمون برگ‌های بریده شده بود. این تفاوت احتمالاً به دلیل شرایط محیطی گلخانه نسبت به محیط انکوباتور بوده است. زردی ایجادشده در اثر فعالیت قارچ بر روی برگ‌ها، کم‌کم گسترش یافت و محل تلقیح پس از مدتی دچار نکروز و خشکیدگی گردید (شکل E-۱).

تلقیح بافت‌های زعفران در شرایط گلخانه در اسفندماه انجام گردید. در این فصل گیاهان هم برگ‌های مسن و هم برگ‌های

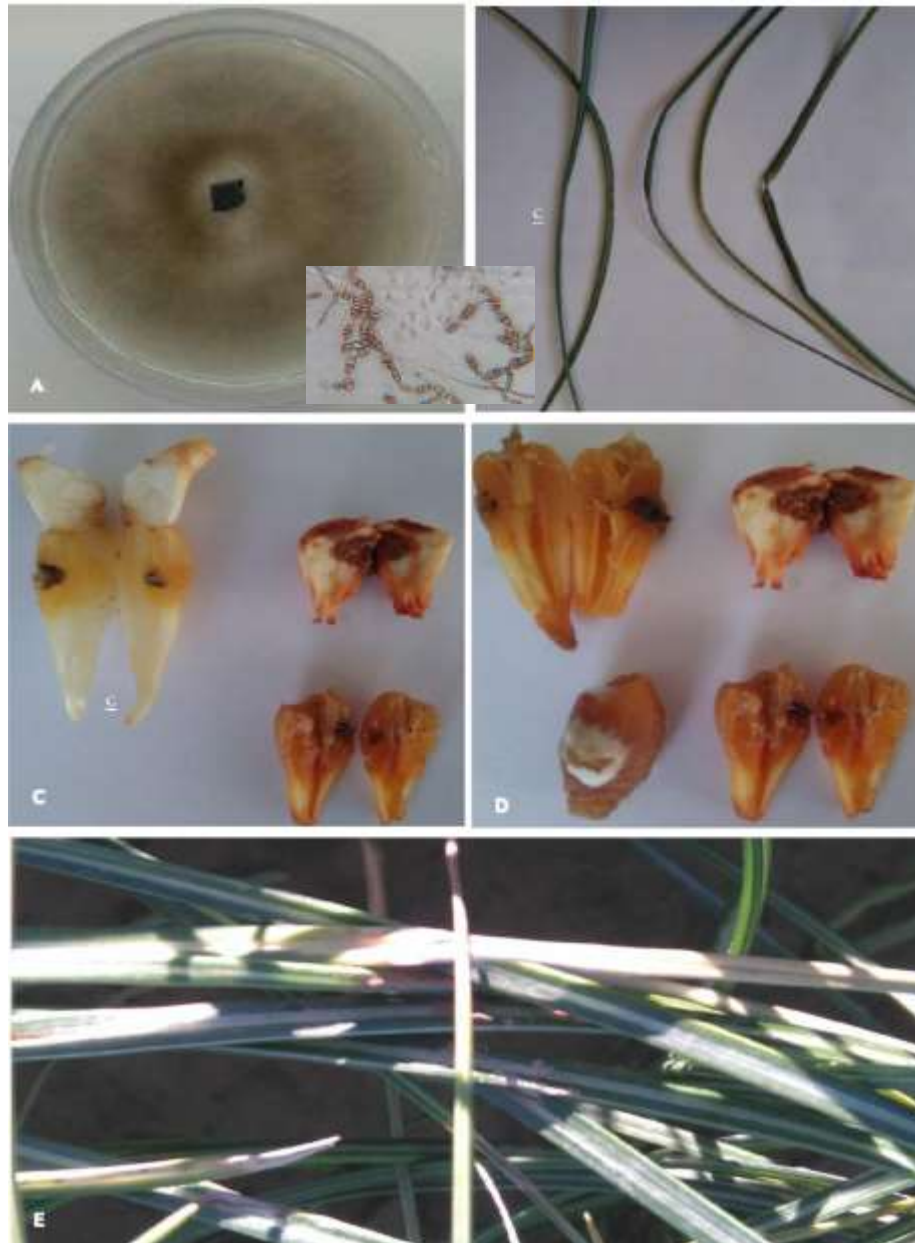
(1984) و بیماری‌زایی آلترناریا بر روی بسیاری از گیاهان دیگر استفاده شده است (Templeton, 2013). این پژوهش، کاربرد روش فوق به منظور بررسی بیماری‌زایی قارچ آلترناریا بر روی گیاه زعفران را تأیید کرده و نشان‌دهنده کارایی این روش در تشخیص بیمارگرهای این گیاه است. بر اساس این تحقیق، این روش به‌عنوان آزمونی مقدماتی جهت بررسی بیماری‌زایی گونه‌های *A. alternata* بر روی بافت برگ زعفران قابل استفاده است.

پس از تلقیح کورم‌ها توسط قارچ *A. alternata* بافت کورم‌های سالم تلقیح شده، پس از ۴ روز در محل تلقیح، تغییر رنگ داده و قهوه‌ای شدند. این تغییر رنگ به تدریج هم به صورت سطحی و هم به صورت عمقی گسترش پیدا کرد. بافت‌های تغییر رنگ یافته پس از ۵ روز به طور کامل دچار پوسیدگی گردیدند (شکل D و C-۱). از کشت مجدد بخش‌های پوسیده شده کورم‌ها بر روی محیط PDA، قارچ آلترناریا جداسازی گردید. در تیمار شاهد، محل زخم‌ها تغییر رنگ بسیار محدودی داشتند که ناشی از تأثیر زخم ایجادشده بوده و این تغییر رنگ به سایر قسمت‌های کورم گسترش پیدا نکرد (شکل C-C-۱). نتایج این آزمون نشان داد که قارچ *A. alternata* در صورت نفوذ به داخل کورم زعفران، قادر است در مدت کوتاهی بافت کورم را پوسانده و از بین ببرد.

کورم‌های زعفران که برای کاشت در مزرعه به کار می‌روند چندلایه پوششی دارند ولی در این تحقیق ابتدا پوشش سطحی حذف و بافت کورم زخمی تا قارچ بتواند داخل بافت نفوذ کرده و آلودگی صورت گیرد. در شرایط مزرعه کورم‌های سالم دارای لایه‌های پوشش بوده و کمتر در معرض مستقیم قارچ هستند ولی این لایه ممکن است به تدریج دچار پوسیدگی شده و از بین بروند. پوسیده شدن و از بین رفتن پوشش کورم‌ها توسط عوامل مختلف در مزرعه یا از بین رفتن این لایه پوششی توسط جوندگان و حشرات می‌تواند شرایطی شبیه این آزمایش را ایجاد

می‌تواند روی برگ ایجاد آلودگی کند.

جوان سبز تازه داشتند. بیماری‌زایی قارچ بر روی برگ‌ها، نشان داد که قارچ *A. alternata* در هر مرحله از دوره رشد گیاه



شکل ۱- (A) پرگنه قارچ *Alternaria alternata* بر روی محیط PCA، نتایج آزمون بیماری‌زایی پس از ۳ تا ۵ روز بر روی برگ‌های بریده‌شده (B)، کورم (C و D) و گیاه زعفران در شرایط گلخانه (E)

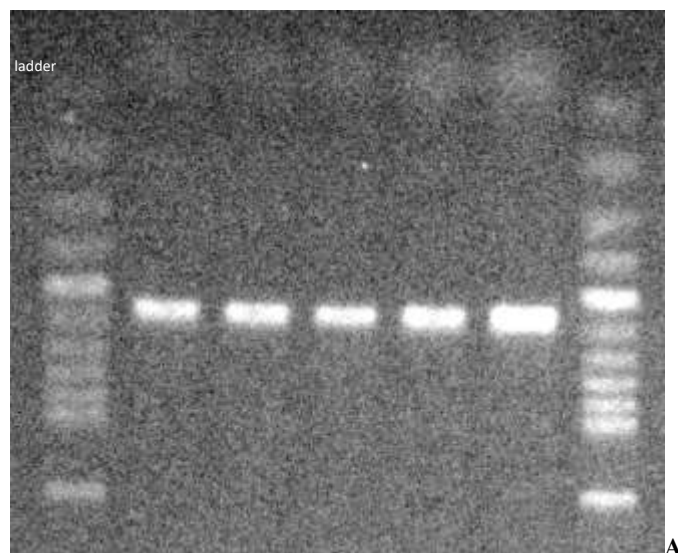
Figure 1- (A) *Alternaria alternata* on CMA, pathogenicity of *A. alternata* on detached leaves (B), corm (C and D) and saffron in greenhouse condition (E) after 3-5 days.

بریده‌شده و گیاه در حال رشد در گلخانه، مورد بررسی قرار گرفت. هرچند روش تلقیح برگ‌های بریده‌شده به وسیله قارچ آلترناریا و

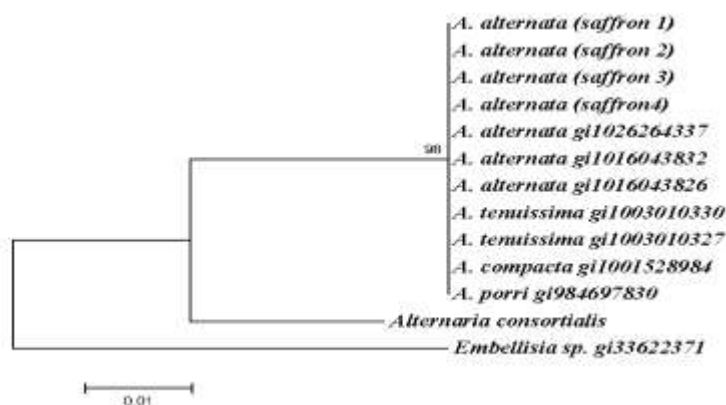
در این تحقیق بیماری‌زایی گونه *A. alternata* بر روی گیاه زعفران، به سه روش بیماری‌زایی بر روی کورم‌ها، برگ‌های



بررسی میزان آلودگی برگ‌ها به‌تنهایی به‌عنوان یک روش قابل قبول در آزمون‌های بیماری‌زایی این قارچ پذیرفته‌شده است ولی در این تحقیق تلاش گردید که بیماری‌زایی بر روی برگ‌های گیاه در شرایط گلخانه نیز بررسی گردد.



<i>A. alternata</i> (saffron 1)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02	
<i>A. alternata</i> (saffron 2)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
<i>A. alternata</i> (saffron 3)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
<i>A. alternata</i> (saffron 4)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
<i>A. alternata</i> gi1026264337	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
<i>A. alternata</i> gi1016043832	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
<i>A. alternata</i> gi1016043826	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
<i>A. tenuissima</i> gi1003010330	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
<i>A. tenuissima</i> gi1003010327	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
<i>A. compacta</i> gi1001528984	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
<i>A. porri</i> gi984697830	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.02
<i>Alternaria consortialis</i>	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.04	0.02
<i>Embellisia</i> sp. gi33622371	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08



شکل ۲- ناحیه تکثیرشده با آغازگرهای ITS1&ITS4 (A) ماتریکس تشابه ژنتیکی (B) و شجره فیلوژنتیکی (C) جدایه‌های *A. alternata* جداشده از زعفران در این تحقیق و جدایه‌های بانک ژن بر اساس توالی ناحیه ITS

Figure 2- PCR product of ITS1&4 replication (A), Genetic Diversity (B) and Phylogenetic tree (C) of *A. alternata* isolates based on ITS region sequences.

مانند اسپرژیلوس‌ها فراهم نماید.

یکی از عوامل مؤثر در شیوع آلودگی آلترناریایی بر روی گیاهان مختلف، وجود رطوبت و دمای مناسب است ولی در زراعت زعفران در فصل تابستان در شرق ایران و مناطق زعفران کاری، به دلیل عدم آبیاری، مزارع زعفران خشک و میزان رطوبت در این ناحیه بسیار پایین است که باعث عدم گسترش قابل ملاحظه این قارچ در فصل تابستان می‌گردد. در فصل زمستان نیز میزان بارندگی کمتر از ۱۰۰ میلی‌متر یکی از عواملی است که باعث محدود شدن این بیمارگر شده است. بنابراین میزان گسترش بیماری‌های ناشی از این قارچ در حال حاضر در مزارع زعفران بسیار محدود است و معمولاً به صورت موردی و تک بوته‌ای است و این بیماری از بیماری‌های مهم زعفران محسوب نمی‌گردد ولی در صورت هرگونه تغییر شرایط محیطی یا کاشت زعفران در نواحی مرطوب یا با رطوبت بالا در سایر نقاط کشور، این قارچ می‌تواند یکی از عوامل محدودکننده زراعت زعفران به‌شمار آید.

توصیه می‌گردد که مدیریت تلفیقی گونه‌های آلترناریا در مزارع زعفران در کنار دیگر گونه‌های قارچی بیمارگر و توکسین‌زا به صورت هم‌زمان اعمال گردد تا هم پوسیدگی‌های ناشی از گونه *A. alternata* به بافت‌های زعفران خسارت بالایی وارد ننماید و هم اثر تشدیدکنندگی بر آلودگی بافت زعفران به گونه‌های خاکزاد مولد توکسین نداشته باشد.

نتایج این تحقیق نشان داد که گونه آلترن *A. alternata* اریا آلترناتا در خاک و بروی بافت زعفران در شهرستان بیرجند به راحتی قابل جداسازی است. جدایه‌های این گونه قادرند در شرایط مساعد روی بافت‌های زعفران، لکه‌برگی و یا پوسیدگی کورم ایجاد کنند. از آنجایی که زعفران گیاهی چندساله است، بافت‌های در حال تجزیه و قدیمی که در انتهای فصل رشد اطراف کورم‌ها و برگ‌های گیاه باقی می‌مانند، می‌توانند محل مناسبی برای تکثیر گونه‌های آلترناریا بوده و بیماری‌های ناشی از این قارچ را تشدید کنند. کورم‌ها نیز در طول فصل خشک در خاک هستند و عوامل مختلفی به‌خصوص نماتدها، کنه‌ها و بندپایان قادرند از آن‌ها تغذیه کرده و با ایجاد زخم، پوسیدگی‌های آلترناریایی کورم را گسترش دهند.

به دلیل کوتاه بودن دوره ظهور، برداشت و خشک کردن گل‌ها، این قارچ، بر روی بخش‌های مختلف گل بیماری ایجاد نمی‌کند ولی در صورتی که گل‌ها در شرایط مرطوب انبار شوند، ممکن است به گل‌ها نیز خسارت بزند. همان‌طور که قبلاً گفته شد برخی گونه‌های مختلف قارچی مانند اسپرژیلوس، عامل پوسیدگی کورم زعفران هستند. وجود آلودگی‌های ناشی از این بیمارگرها، می‌تواند اثر تشدیدکنندگی روی آلودگی آلترناریایی کورم زعفران داشته باشند. عکس پدیده فوق نیز صادق است. آلودگی به آلترناریا می‌تواند زمینه را برای آلودگی زعفران به‌خصوص کورم‌ها را به دیگر گونه‌های قارچی مولد توکسین

## منابع

Ahrazem, O., Rubio-Moraga, A., Castillo-López, R., Trapero-Mozos, A., and Gómez-Gómez, L. 2010. Crocus sativus pathogens and defence responses. Functional Plant Science and Biotechnology. Global Science Book Isleworth, UK, p. 81-90.

Akimitsu, K., Peever, T.L., and Timmer, L. 2003.

Molecular, ecological and evolutionary approaches to understanding Alternaria diseases of citrus. Molecular Plant Pathology 4: 435-446.

Anonymus. 2014. Iran Agriculture Statistics (Vol. 2). Ministry of Jihad-Keshavrz, Iran, 421 pp.

- Atlas, R.M. 2010. Handbook of Microbiological Media. CRC press.
- Di Primo, P., and Cappelli, C. 2000. Preliminary characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* causing *Fusarium* corm rot of saffron in Italy. *Plant Disease* 84: 806-806.
- Droby, S., Dinooor, A., Prusky, D., and Barkai-Golan, R. 1984. Pathogenicity of *Alternaria alternata* on potato in Israel. *Phytopathology* 74: 537-542.
- Foolad, M., Ntahimpera, N., Christ, B., and Lin, G. 2000. Comparison of field, greenhouse, and detached-leaflet evaluations of tomato germ plasm for early blight resistance. *Plant Disease* 84: 967-972.
- Griffiths, L.J., Anyim, M., Doffman, S.R., Wilks, M., Millar, M.R., and Agrawal, S.G. 2006. Comparison of DNA extraction methods for *Aspergillus fumigatus* using real-time PCR. *Journal of medical microbiology* 55: 1187-1191.
- Hassan, M., and Devi, L.S. 2003. Corm rot diseases of saffron in Kashmir valley. *Indian Phytopathology* 56: 122.
- Hong, S.G., and Pryor, B.M. 2004. Development of selective media for the isolation and enumeration of *Alternaria* species from soil and plant debris. *Canadian journal of microbiology* 50: 461-468.
- Houbraken, J., Due, M., Varga, J., Meijer, M., Frisvad, J.C., and Samson, R.A. 2007. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Usti*. *Studies in Mycology* 59: 107-128.
- Kalha, C.S., Gupta, V., Gupta, D., and Priya, S. 2007. First report of sclerotial rot of saffron caused by *Sclerotium rolfsii* in India. *Plant Disease* 91: 1203-1203.
- Mohammadi, A., and Amini, Y. 2015. Molecular characterization and identification of *Acrostalagmus luteoalbus* from saffron in Iran. *Agriculture Science Developments* 4: 16-18.
- Najjar, S. 2016. Taxonomic study of *Aspergillus* species associated with soil, crops and horticultural plants in Birjand plain. Department of plant protection, University of Birjand, Birjand, Iran. (In Persian with English Summary).
- Negbi, M. 2003. *Saffron: Crocus sativus* L. CRC Press.
- Noorbakhsh, R., Bahrami, A.R., Mortazavi, S.A., and Bahreini, M. 2009. PCR-based identification of aflatoxigenic fungi associated with Iranian saffron. *Food Science and Biotechnology* 18: 1018-1031.
- Palmero, D., Rubio-Moraga, A., Galvez-Patón, L., Nogueras, J., Abato, C., Gómez-Gómez, L., and Ahrazem, O. 2014. Pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from corms of *Crocus sativus*. *Industrial Crops and Products* 61: 186-192.
- Raeder, U., and Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17-20.
- Raj, P., Khan, S.S., Modak, M., Lone, Z.A., Rather, S.A., and Yaqoob, M. 2013. Biodiversity of endophytic fungi in saffron (*Crocus sativus*) and antimicrobial activity of their crude extract. *IAJPR* 3: 3702-3713.
- Samson, R.A., Hoekstra, E.S., and Frisvad, J.C. 2004. Introduction to food-and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS).
- Sharma, P., Sharma, S., and Sindhu, M. 2004. A detached leaf technique for evaluation of resistance in cabbage and cauliflower against three major pathogens. *Indian Phytopathology* 57: 315-318.
- Simmons, E.G. 2007. *Alternaria: An Identification Manual*. CBS fungal biodiversity centre,

Netherlands.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., and Kumar, S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution* 30: 2725-2729.

Templeton, G. 2013. *Alternaria* toxins related to pathogenesis in plants. *Microbial toxins* 8: 169-192.

Thakur, R., Singh, C., and Kaul, B. 1992. First report of corm rot in *Crocus sativus*. *Indian Phytopathology* 45: 278.

Wani, M.A.S., and Dar, G. 2004. Studies on Corm

Rot of Saffron (*Crocus sativus* L.). University of Kashmir.

Woudenberg, J. 2015. Restyling *Alternaria*. Phytopathology, Wageningen University.

Zadoks, J.C. 1981. Mr. DuHamel's 1728 treatise on the violet root rot of saffron crocus: physical explanation of a disease that perishes several plants in the Gastinois, and saffron in particular. Landbouwhoge school, Wageningen.

## Investigation of *Alternaria alternata* pathogenicity on corm and leaves of saffron in vitro and greenhouse conditions

Ali Hossainia<sup>1</sup> and Abbas Mohammadi<sup>2\*</sup>

Submitted: 21 May 2016

Accepted: 6 December 2016

Hossainia, A., and Mohammadi, A. 2018. investigation of *Alternaria alternata* pathogenicity on corm and leaf of saffron in vitro and greenhouse conditions. Saffron Agronomy & Technology 6(1): 61-72.

### Abstract

Saffron is one of the most important herbs and spices in the East of Iran and its production is affected by various pathogens. This study is aimed at isolation, identification and pathogenicity detection of *Alternaria alternata* isolates as leaf spot and corm rot of saffron agents. Soil samples and infected plant tissues were collected from different areas of the Birjand plain (Birjand, Khusf and Sarbishe) during the years 2014-15. *Alternaria* species were isolated by potato dextrose agar medium and their morphological characteristics were studied on the potato carrot agar medium. For molecular studies, genomic DNA was extracted by the CTAB method and ribosomal subunits of fungal isolates were amplified using ITS1 and ITS4 primers. Based on morphological characteristics, 80 isolates of *A. alternata* were isolated. The ITS regions sequences of selected isolates had 100 similarities with *A. alternata* species sequences in NCBI and MycoBank. These isolates caused chlorosis and necrosis on detached leaves, the inoculated corm was rotten and inoculated plants showed chlorosis and necrosis on leaves after 3-5 days. The results showed that *A. alternata* in the Birjand plain can cause corm rot and leaf chlorosis and necrosis in saffron. This study is the first report of the virulence of this fungus on saffron tissue in the East of Iran.

**Keywords:** Birjand, Inoculation, Leaf spot, Pathogenicity, Rot.

---

1- MSc Student of Plant Pathology, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran

2- Associate Professor of Plant Pathology, College of Agriculture, University of Birjand, Birjand, Iran

(\*-Corresponding author Email: Amohammadi@birjand.ac.ir)

DOI: 10.22048/jsat.2016.54452.1164