شناسایی و بررسی بیماریزایی فوزاریومهای همراه با طوقه و ریشه باقلا در استان خوزستان

صدیقه عظیمی[۱]، رضا فرخی نژاد[۲] و سید علی موسوی جرف[۳]

چکیده

به منظور تعیین و مطالعه فوزاریومهای همراه طوقه و ریشه باقلا در استان خوزستان در طی سالهای زراعی ۸۱-۱۳۸۰ از گیاهان آلوده در مزارع باقلا در نقاط مختلف استان خوزستان از جمله اهواز، حمیدیه، بهبهان، عقیلی، شوشتر، دزفول، صفی آباد، شوش و اندیمشک نمونه برداری شد. ۸٤ جدایه فوزاریوم جدا و خالص سازی گردید. این جدایه ها در۵ بخش (section)و ٦ گونه قرار گرفتند. در بین عوامل جدا شده گونه‌های*F.solani, F.oxysporum* و *F.moniliforme* به ترتیب با دارا بودن ۲۷ (۳۲/۱٤ درصد)، ۲۳(۲۷/۳۸ درصد) و ۱۸ (۲۱/٤۲ درصد) جدایه بیشترین فراوانی را داشتند در حالیکه گونه‌های *F. proliferatum*، *F. semitectum* و *F. equiseti* به ترتیب با دارا بودن ۸ (۹/۵۲ درصد)، ٤ (٤/۷٦ درصد)و ٤ (٤/۷٦ درصد) جدایه کمترین فراوانی را داشتند. همه گونه‌های مذکور برای اولین بار از باقلا در ایران وبرای گونه‌های *F.proliferatum* ، *F.semitectum* و *F.equiseti* باقلا به عنوان میزبان جدید (*Matrix nova*) گزارش می‌شود. در آزمون بیماریزایی از روشهای مختلف مایه زنی شامل غوطه‌وری ریشه‌ها در سوسپانسیون اسپور، اضافه کردن سوسپانسیون اسپور به خاک اطراف ریشه و کاربرد مایه تلقیح گندم در اطراف ریشه گیاهچه‌های باقلا استفاده شد. سوسپانسیون مورد استفاده حاوی ۱۰٦ اسپور در میلی لیتر بود. نتایج حاصل از آزمون بیماریزایی حاکی از بیماریزا بودن همه جدایه های مورد استفاده بود. همچنین گونه *F.solani* در هر سه روش مذکور، بالاترین شدت بیماریزایی را داشت.

واژه‌های کلیدی: فوزاریوم، طوقه و ریشه، باقلا، پوسیدگی

مقدمه

قارچ فوزاریوم به عنوان یکی از مهمترین عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه باقلا از نقاط مختلف جهان گزارش شده است که میتواند خسارت مهمی به محصول وارد کند (۱۳ ، ۱۸ و ۲۱).

این قارچ تشکیل غلافها، تعداد بذرها و وزن و اندازه بذرها را تحت تأثیر قرار داده و همچنین از طریق تأخیر در ظهور گیاهچه‌ها خسارت قابل توجهی به محصول وارد می‌کند (۲۳). گونه‌های متفاوتی از جنس فوزاریوم منجر به پوسیدگی بذر، جوانه اولیه و مرگ گیاهچه‌ها می‌شوند (۲۹). در مصر از محل گره‌های موجود در روی ریشه باقلا گونه‌های *F.oxysporum, F.solani* و *F.moniliforme* جداسازی شده‌اند (۲۷).

F.sumbucinum, F.oxysporum در لهستان بیماریزایی گونه‌های *F.avenaceum*, و *F.culmorum* روی گیاهچه‌های باقلا به اثبات رسیده است (۲۳).

گونه *F. oxysporum* f.sp. *faba* در بیشتر مناطق به عنوان گونه غالب بیماریزای فوزاریوم شناخته شده است (۱۲، ۲۵و۲۹)که منجر به پژمردگی و پوسیدگی ریشه باقلا شده و خسارت شدیدی به باقلای زمستانه و پائیزه وارد می‌کند (۲۴).

گونه *F. solani* نیز یکی از مهمترین عوامل پوسیدگی ریشه باقلا است که در مصر و بخصوص اتیوپی اهمیت دارد و باقلای استوایی(Lima bean) را به شدت تحت تأثیر قرارمی دهد (۱۲ و ۱۴).

۱- مربی گروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران

۲و۳- بترتیب دانشیار و استادیارگروه گیاهپزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران

تاریخ دریافت: ۸۲/۸/۲۵

تاریخ پذیرش: ۸۳/۱۲/۲٤

علیرغم مطالعات وسیعی که تاکنون روی فوزاریومهای همراه طوقه و ریشه باقلا در جهان صورت گرفته، در ایران تا کنون عوامل فوزاریومی باقلا بررسی نشده اند. لذا ضروری به نظر می‌رسید که از طریق این پژوهش، اطلاعاتی راجع به عوامل فوزاریومی که منجر به پژمردگی و پوسیدگی طوقه و ریشه باقلا در ایران می‌شوند بدست آید. در این تحقیق علاوه بر جداسازی و تشخیص گونه‌های مختلف فوزاریوم، بیماریزایی این جدایه‌ها نیز با سه روش مورد بررسی قرار گرفت و درصد فراوانی آنها نیز تعیین شد.

مواد و روشها

۱- نمونه برداری

جمع آوری نمونه ها از مزارع باقلا در نقاط مختلف استان خوزستان در طی سالهای زراعی ۸۱-۱۳۸۰ صورت گرفت. برای این منظور از مزارع شهرستانهای حمیدیه، شوشتر، اهواز، بهبهان، عقیلی، دزفول، شوش، ملاثانی، اندیمشک، صفی آباد و سوسنگرد نمونه برداری شد. نمونه برداری از مرحله گیاهچه تا هنگام برداشت محصول از بوته‌های آلوده صورت گرفت.

در بعضی از این بوته ها بافتهای طوقه و ریشه پوسیده شده بود و یا به رنگهای قهوه‌ای کمرنگ، قهوه‌ای مایل به سیاه و یا کاملاً سیاه تغییر رنگ داده بودند. در بعضی موارد آلودگی تا استوانه مرکزی ادامه یافته بود. همچنین در قسمتهای هوایی برخی از نمونه‌ها علائم توقف رشد، زردی و پژمردگی مشاهده شد.

نمونه‌ها در درون کیسه‌های پلاستیکی قرار داده شد و جهت جداسازی عوامل قارچی بلافاصله به آزمایشگاه منتقل گردید. همچنین از خاک اطراف ریشه نیز نمونه برداریهایی صورت گرفت که از این خاکها هم برای جداسازی عوامل قارچی بیماریزا استفاده شد.

۲- جداسازی

به منظور جداسازی، ابتدا طوقه و ریشه آلوده با آب به خوبی شسته شدند. سپس از حد فاصل بخش سالم و بیمار بوسیله اسکالپل قطعات کوچکی بریده شد و این قطعات بوسیله هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضد عفونی سطحی شدند. سپس نمونه‌ها در دو مرحله با آب مقطر سترون شسته شده و با استفاده از کاغذ صافی سترون خشک گردیدند. همچنین بعضی از نمونه‌ها با استفاده از اتانول ۷۵ درصد ضد عفونی سطحی شدند.

قطعات مورد نظر پس از ضد عفونی بر روی تشتکهای پتری حاوی محیط کشتهای PDA[1]، WA[2] و Nash - snyder[3] قرار گرفتند. برای جداسازی عوامل قارچی از خاک اطراف ریشه نیز از روش کشت محلول خاک[4] و محیط کشت Nash-snyder استفاده شد (۲۷). خالص سازی جدایه‌ها با روش تک اسپور ودر بعضی موارد با روش نوک ریسه روی محیط کشت آب- آگار انجام گرفت.

۳- شناسایی گونه‌های فوزاریوم

برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم از روش نلسون و همکاران (۱۹۸۳) استفاده شد. ابتدا جدایه‌های تک اسپور روی محیط کشتهای PDA و CLA[5]کشت داده شدند. کشتها در انکوباتور تحت شرایط استاندارد (۱۲ ساعت تاریکی، ۱۲ ساعت روشنایی و درجه حرارت ۲۵ درجه سانتیگراد در روز و ۲۰ درجه سانتیگراد درشب) نگهداری شدند. برای تعیین رنگ و نرخ رشد پرگنه از محیط کشتPDA و برای تعیین ویژگیهای میکروسکوپی از محیط کشت CLA استفاده شد. خصوصیات عمده‌ای که برای شناسایی گونه‌های فوزاریوم مورد توجه قرار گرفت عبارت بود از: شکل ماکروکنیدیوم، وجود یا

1-Potato dextrose agar
2-Water Agar
3- Pepton PCNB Agar
4- Soil dilution plate technique
5- Carnation Leaf Agar

عدم وجود میکروکنیدیوم و شکل آن، اندازه کنیدیوم‌ها، نوع فیالید (منوفیالید یا پلی فیالید)، وجود یا فقدان زنجیره میکروکنیدیوم و سرهای دروغین، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور، نرخ رشد پرگنه و رنگ آن بخصوص از سطح زیرین پتری در محیط کشتPDA .

٤- آزمون بیماریزایی

بـه منظور بررسی بیماریزایی جدایه‌های فوزاریوم روشـهای مایـه زنـی گـیاهچه‌هـا بـا غوطه‌ورکردن ریشـه‌هـا در سوسپانسـیون اسپور (۱۷ و ۱۹)، اضافه کـردن سوسپانسـیون اسپور به خاک اطراف ریشه و اسـتفاده از مایه تلقیح گندم بکار برده شد. در هر سه روش مذکـور، بیماریزایـی ۲۰ جدایه فوزاریوم بدست آمـده از طوقـه، ریشـه و خاک اطراف ریشه باقلا در طـی سـالهای زراعـی ۸۱-۱۳۸۰ بررسـی گـردید. انـتخاب ۲۰ جدایـه از ۶ گونـه فوزاریـوم بـر اسـاس درصد فراوانی گونه های مورد نظر بود به طوری که از گونه های *F.oxysporum* و *F.solani* هر کدام ۶ جدایـــــه، از *F.moniliforme* ۴ جدایـــــه، از *F.proliferatum* ۲ جدایـــه و از گونـــه‌هـــای *F.semitectum* و *F.equiseti* هـر کـدام یـک جدایه انتخاب گردید.

٤-١- روش مایه زنی گیاهچه‌ها با وطه‌ورکردن ریشه‌ها در سوسپانسیون اسپور

بذور باقلا با استفاده از هیپوکلریت سدیم۱۰ درصدضد عفونی سطحی شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ روز با پارچه ململ سترون و مرطوب پوشانده شدند. بذور جوانه زده پس از ضدعفونی سطحی با اتانول ۸۵ درصد به گلدانهای حاوی خاک برگ و ماسه سترون منتقل شدند.

برای تهیه مایه قارچ از روش فری‌من و رودریگز (۱۹۹۳) استفاده گردید. ابتدا هر کدام از جدایه‌های قارچ روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. پس از گذشت ۵ روز، هر کدام از جدایه‌هاکه روی محیط کشت مذکور رشد کرده بودند به محیط کشتی که حاوی عصاره مخمر، پپتون، گلوکز، دیفکوآگار و آب مقطربود، منتقل شد. پتریها به مدت ۵ روز در دمای ۲۳-۲۲ درجه سانتی‌گراد تحت شرایط نوری مداوم نگهداری شدند. سپس سطح پتریها با مقدار کمی آب مقطر سترون شستشو داده شد و با کمک هموسیتومتر[1]، سوسپانسیون اسپور هر کدام از جدایه‌ها با غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی لیتر تهیه گردید.

برای مایه‌زنی، گیاهچه‌های دو هفته‌ای از گلدانها بیرون آورده شده و با آب به خوبی شسته شدند. سپس ریشه‌ها در بشرهای حاوی سوسپانسیون اسپور به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. در تیمار شاهد از آب- آگار ۰/۰۵ درصد استفاده گردید. پس از مایه زنی، گیاهچه‌ها به گلدانهای حاوی خاک برگ و ماسه سترون برگردانده شدند. این آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام شد.

٤-٢- روش اضافه کردن سوسپانسیون اسپور به خاک اطراف ریشه

در این آزمایش از گیاهچه‌هایی که مانند روش مذکور در بند ۱-۴- پرورش داده شده بودند، استفاده گردید. سوسپانسیون اسپور جدایه‌ها نیز مانند روش توصیف شده در بند ۱-۴ آماده گردید. خاک اطراف ریشه گیاهچه‌های دو هفته ای کنار زده شد و به ازاء هر گیاهچه، ۱۰ میلی لیتر از سوسپانسیون اسپور با غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی لیترکنار ریشه ریخته شد و سطح ریشه ها با خاک پوشیده شد. برای تیمار شاهد از آب آگار۰/۰۵ درصد استفاده گردید. این آزمایش نیز در یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت.

٤-٣- روش استفاده از مایه تلقیح گندم

برای تهیه مایه تلقیح ابتدا دانه‌های گندم به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شدند. سپس دانه‌های گندم درون شیشه‌های مکارتنی قرار گرفته

1- Hemocytometer

و دو روز متوالی به مدت نیم ساعت در اتوکلاو سترون گردیدند. ۲-۱ قرص به قطر ۰/۵ سانتیمتر از محیط کشت PDA که حاوی جدایه مورد نظر بود به دانه‌های گندم مایه زنی شد و شیشه‌های مکارتنی در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. پس از پوشش کامل بذور توسط قارچ، از آنها به عنوان مایه تلقیح استفاده شد (۱۶).

برای مایه زنی، خاک اطراف ریشه با دقت کنار زده شد و به ازاء هر گیاهچه، ۳ دانه گندم مایه زنی شده کنار ریشه گذاشته شد. در تیمار شاهد از گندم سترون شده بدون قارچ استفاده گردید. این آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام گرفت.

در همه روشهای فوق، آلودگی گیاهچه‌ها در طول زمان آزمایش بطور روزانه مورد بررسی قرار گرفت و جداسازی مجدد قارچ از محل آلودگی (طوقه و ریشه) صورت گرفت. در مورد جدایه‌هایی که علائم پژمردگی آوندی را نشان دادند، از مناطق مختلف ساقه نیز جداسازی مجدد قارچ صورت گرفت. وجود یا عدم وجود شانکر در انتهای ساقه مورد بررسی قرار گرفت و درصد مشاهده شانکر در گونه‌های مختلف نیز تعیین گردید.

طول لکه‌های طوقه و ریشه در روش سوسپانسیون اسپور به مدت ۱۰ و ۳۰ روز پس از مایه زنی و در روش مایه تلقیح گندم به مدت ۱۰ و ۲۰ روز پس از مایه زنی با دقت اندازه گیری شد. شدت بیماریزایی گونه‌های مختلف قارچ فوزاریوم بر حسب میانگین طول لکه‌های طوقه و ریشه با استفاده از آزمون دانکن در طرح کاملاً تصادفی با یکدیگر مقایسه گردید.

نتایج و بحث

۱ - گونه‌های فوزاریوم جدا شده از طوقه و ریشه

در این تحقیق، جمعاً ۸۴ جدایه متعلق به ۶ گونه فوزاریوم از قسمتهای طوقه، ریشه و خاک اطراف ریشه باقلا جداسازی شد. در میان گونه‌های مورد بررسی *F. oxysporum*, *F. solani* و *F. moniliforme* به ترتیب با دارا بودن ۲۷،۲۳ و ۱۸ جدایه بیشترین فراوانی را داشتند در حالیکه گونه‌های *F.semitectum*, *F.proliferatum* و *F.equiseti* به ترتیب با دارا بودن ۸ ،۴ و ۴ جدایه کمترین فراوانی را داشتند (جدول ۱).

اگر چه تاکنون درایران تحقیقات گسترده‌ای در زمینه تعیین گونه‌های فوزاریوم از روی میزبانهای مختلف از جمله گندم (۱۱)، نخل خرما(۱۰)، لوبیا چیتی(۳) و پیاز(۲) صورت گرفته است ولی جداسازی و بررسی بیماریزایی گونه های فوزاریوم از روی باقلا در این تحقیق برای اولین بار انجام شده است.

جدول۱- درصد فراوانی گونه ها بر اساس تعداد جدایه های هر گونه

ردیف	نام گونه	تعداد جدایه	درصد فراوانی
۱	*F. oxysporum*	۲۷	۳۲/۱٤
۲	*F. solani*	۲۳	۲۷/۳۸
۳	*F. moniliforme*	۱۸	۲۱/٤۲
٤	*F. proliferatum*	۸	۹/۵۲
۵	*F. semitectum*	٤	٤/۷٦
٦	*F. equiseti*	٤	٤/۷٦
مجموع		۸٤	۱۰۰

در ذیل گونه های شناسایی شده تشریح می‌گردند:

Fusarium oxysporum **Schlecht, emend. Snyder & Hans.**

میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA سریع بوده و پس از ۱۰ روز بیشتر از ۷ سانتیمتر بود. میسلیومهای هوایی فراوانی تولید کرد که ابتدا سفید رنگ بوده و با مسن شدن کشت بنفش کمرنگ شدند. رنگ سطح زیرین پرگنه از صورتی کمرنگ تا بنفش متغیر بود. این گونه دارای منوفیالیدهای کوتاه بود. میکروکنیدیومها فراوان و معمولاً تک یاخته ای بودند که به شکلهای تخم مرغی، بیضی تا قلوه ای شکل مشاهده شدند. ماکروکنیدیوم ها داسی شکل تا کمی خمیده و دارای ۵-۳ دیواره عرضی بودند. یاخته انتهایی ماکروکنیدیوم کمی خمیده و یاخته پایه به شکل پاشنه پا بود. کلامیدوسپورها به شکلهای منفرد، جفتی و زنجیره کوتاه مشاهده شدند. این گونه با داشتن ۲۷ جدایه به عنوان گونه غالب بیماریزای فوزاریوم در این تحقیق محسوب می شود که از این نظر با نتایج مطالعات سایر محققین (۱۲و۲۹) مطابقت داشت. گونه فوق منجر به پژمردگی آوندی، مرگ گیاهچه و پوسیدگی طوقه و ریشه در میزبانهای مختلفی از جمله سبزیجات، موز و خرما می‌شود (۱۵، ۱۶ و ۲۰).

F.oxysporum f.sp. *fabae* به عنوان عامل پژمردگی و پوسیدگی ریشه باقلا از کشورهای مختلفی از جمله مصر(۱۸) و سوریه(۱۳) گزارش گردیده است. این گونه در ایران از طوقه و ریشه گندم در خوزستان(۱۱) وفارس(۵) جداسازی شده است. همچنین منجر به پوسیدگی ریشه و طبق پیاز (۲)، زردی چغندر (۴) و پژمردگی موز در بلوچستان (۱) نیز می‌شود.

***Fusarium solani* (Mart). Apple & Wollenw. emend. Snyd. & Hans.**

میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA سریع بوده و پس از گذشت ۱۰ روز ۹ سانتیمتر بود. میسلیوم های هوایی کرم رنگ و به صورت پراکنده تولید گردید. رنگ سطح زیرین پرگنه از بیرنگ تا کرم متغیر بود. این گونه فقط منوفیالید داشت که بسیار بلند بوده و به صورت منشعب و غیر منشعب بود. میکروکنیدیوم ها بدون دیواره عرضی یا با یک دیواره عرضی بودند که به اشکال بیضی، تخم مرغی تا قلوه ای شکل دیده شدند. ماکروکنیدیوم ها نسبتاً سیلندری شکل، کمی خمیده با ۴-۳ دیواره عرضی بودند که سلول انتهایی آنها کند بوده و سلول پایه کمی فرورفتگی داشت. کلامیدوسپورها به صورت منفرد، جفتی، زنجیری و یا توده ای تشکیل شدند.

گونه *F.solan* با داشتن ۲۳ جدایه پس از *F. oxysporum* بیشترین فراوانی را داشت. این گونه منجر به پوسیدگی شدید طوقه و ریشه، شانکر ساقه و مرگ گیاهچه در طیف وسیعی از گیاهان از جمله حبوبات می‌شود (۱۵، ۱۶ و ۲۰) و در مناطق گرمسیری اغلب با شانکر ساقه و مرگ سرشاخه درختان در ارتباط است (۱۶). این گونه در ایران از گیاهان متعددی از جمله ریشه و طوقه گندم و جو در خوزستان(۱۱) و ریشه چغندر در خراسان(۴) جداسازی شده و بیماریزایی آن روی نخل خرما در خوزستان(۹) به اثبات رسیده است. همچنین یک بیمارگرعمده طوقه و ریشه لوبیا چیتی در استان چهارمحال و بختیاری محسوب می‌شود که به عنوان گونه غالب بیماریزای فوزاریوم در آن استان نیز شناخته شده است (۳).

***Fusarium moniliforme* Sheldon**

میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA پس از ۱۰ روز برابر ۹ سانتیمتر بود. میسلیوم های هوایی ابتدا سفید رنگ بوده و به تدریج بنفش رنگ شدند. رنگ سطح زیرین پرگنه کرم تا بنفش تیره بود. این گونه فقط دارای منوفیالید بود. میکروکنیدیوم ها فراوان و اغلب تک یاخته ای بودند که به اشکال تخم مرغی، بیضی تا گلابی شکل مشاهده شدند. میکروکنیدیوم ها به صورت زنجیری و در سرهای دروغین تشکیل شدند. ماکروکنیدیومها طویل، داسی شکل تا تقریباً راست

بوده و معمولاً ۵-۳ دیواره عرضی داشتند. سطح پشتی و شکمی ماکروکنیدیوم ها تقریباً موازی و دارای دیواره ظریفی بودند. سلول انتهایی ماکروکنیدیوم تا اندازه ای خمیده و سلول پایه به شکل پا بود. این گونه فاقد کلامیدوسپور بود.

گونه *F.moniliforme* نیز با ۱۸ جدایه تقریباً در تمام نقاط استان جداسازی گردید. این گونه می‌تواند دانه‌های بسیاری از گیاهان از جمله ذرت و سورگوم را آلوده کند (۱۵ و ۱۶). پوسیدگی ریشه، ساقه و دانه در ذرت و پوسیدگی طوقه و ریشه برنج توسط این گونه گزارش شده است (۱۵، ۱۶ و ۲۰). همچنین گونه فوق منجر به پوسیدگی چغندر و پوسیدگی طوقه و ریشه مار چوبه نیز می‌شود(۱۶). این گونه در ایران از روی میزبانهای مختلف از جمله گندم و جو در خوزستان(۱۱) و گلستان (۷)گزارش گردیده و بیماریزایی آن روی نیشکر در خوزستان (۸) به اثبات رسیده است.

Fusarium proliferatum (Matsushima) Nirenberg

میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA پس از ۱۰ روز برابر ۹ سانتیمتر بود. میسلیوم های هوایی ابتدا سفید رنگ بوده و با کهنه شدن محیط کشت به ارغوانی روشن تا بنفش تغییر رنگ داد. رنگ سطح زیرین پرگنه از کرم تا بنفش تیره متغیر بود. این گونه دارای منوفیالید و پلی فیالید بود. میکروکنیدیوم ها به شکلهای تخم مرغی، بیضی و گلابی شکل به صورت زنجیری و در سرهای دروغین تولید شدند. ماکروکنیدیوم ها داسی شکل تا تقریباً راست بوده و معمولاً۵-۳ دیواره عرضی داشتند. سطح پشتی و شکمی ماکروکنیدیوم تقریباً موازی و سلول پایه به شکل پاشنه بود. این گونه فاقد کلامیدوسپور بود.

گونه *F.proliferatum* با ۱۸ جدایه از برخی نقاط استان جدا سازی گردید. این قارچ را عامل پوسیدگی طوقه، میوه و لکه برگی دانسته‌اند (۱۵). این گونه در ایران از روی طوقه و ریشه گندم (۷و ۱۱) جداسازی شده است و بیماریزایی آن روی نیشکر (۸) و نخل خرما (۹) در خوزستان نیز به اثبات رسیده است. بر اساس منابع موجود، گزارش این گونه از روی باقلا در دنیا جدید می‌باشد.

Fusarium semitetum Berk. & Rav

میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA سریع بوده و پس از ۱۰ روز بیش از ۷ سانتیمتر بود. میسلیوم‌های هوایی به رنگ نخودی تا قهوه‌ای کمرنگ و رنگ سطح زیرین پرگنه کرم تا زرد مایل به قهوه‌ای بود. این گونه دارای منوفیالید و پلی فیالید بود. میکروکنیدیوم‌ها کمیاب بوده و ماکروکنیدیوم‌ها به دو شکل دیده شدند. آنهایی که در میسلیوم هوایی تشکیل شدند، کشیده و دوکی شکل بودند. سلول پایه این ماکروکنیدیومها دارای پاپیل بوده اما به شکل پاشنه پا نبود. بیشتر ماکروکنیدیوم‌ها در اسپورودوشیوم‌ها تشکیل شدند که این تیپ از ماکروکنیدیوم ها داسی شکل بوده و یاخته پایه به شکل پاشنه پا بود. کلامیدوسپورها به اشکال منفرد، جفتی و زنجیری مشاهده شدند.

گونه *F. semitectum* نیز با تعداد ۴ جدایه از طوقه و خاک اطراف ریشه باقلا جداسازی شد. این گونه معمولا در مناطق گرمسیر تا نیمه گرمسیر یافت می‌شود و ممکن است به قسمتهای هوایی گیاه نیز خسارت بزند. گزارشهایی از ایجاد بیماری توسط این گونه در محصولات انباری مانند موز، مرکبات و سیب زمینی ارائه شده است (۱۵، ۱۶ و ۲۰). این گونه در ایران از روی نیشکر(۸)، گندم و جو(۱۱) و نخل خرما(۱۰) در خوزستان، از روی طوقه و ریشه گندم در استان گلستان (۷) و از روی مرکبات در مازندران (۶) جداسازی شده است. بر اساس منابع موجود، گزارش این گونه از روی باقلا در دنیا جدید می‌باشد.

***Fusarium equiseti* (Corda) Sacc**

میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA پس از گذشت ۱۰ روز بیش از ۷ سانتیمتر بود. میسلیوم‌های هوایی به رنگ کرم تا قهوه ای روشن و رنگ سطح زیرین پرگنه زرد مایل به قهوه ای بود. این گونه فقط دارای منوفیالید بود. میکروکنیدیوم ها کمیاب و به شکل ویرگول (کاما) بودند. ماکروکنیدیوم ها اغلب ۶-۵ بندی، یاخته انتهایی خیلی کشیده و شلاقی شکل و یاخته پایه به طور مشخص پاشنه ای شکل بود. کلامیدوسپور فراوان و به صورت زنجیری و یا خوشه ای تشکیل گردید.

گونه *F.equiseti* نیز با ۴ جدایه از طوقه، ریشه و خاک اطراف ریشه باقلا جداسازی شد. این قارچ به عنوان عامل پوسیدگی طوقه، ساقه، ریشه و میوه در گیاهان مختلف معرفی شده است (۱۵ ، ۱۶ و ۲۰). این گونه در ایران از روی میزبانهای مختلف از جمله طوقه و ریشه گندم (۱۱)، طوقه و ریشه لوبیا چیتی (۳)و از روی مرکبات در شمال کشور(۶) گزارش شده است. همچنین عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز نیز می‌باشد (۲). بر اساس منابع موجود، گزارش این گونه از روی باقلا در دنیا جدید می‌باشد.

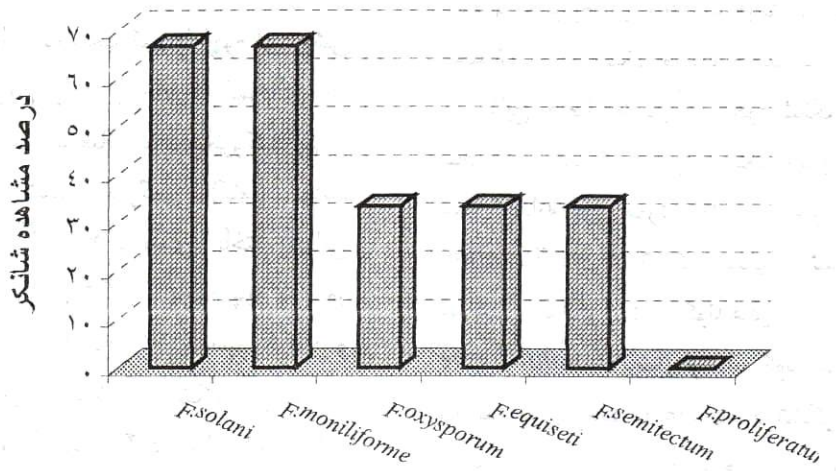
۲ - آزمون بیماریزایی

دربررسی بیماریزایی جدایه های انتخابی *F.oxysporum* اغلب گیاهان کوتوله شده و علائم پوسیدگی و پژمردگی آوندی را نشان دادند. همچنین در بعضی از تکرارها علائم زردی مشاهده شد. در جدایه‌های انتخابی *F.solani*، *F.moniliforme* *F.semitectum* , *F.equiseti* *F.proliferatum* بیماری به صورت پوسیدگی طوقه و ریشه مشاهده گردید. پوسیدگی ریشه معمولاً به رنگ قهوه‌ای تیره مایل به سیاه و یا کاملاً سیاه بود که اغلب ریشه‌های فرعی را فرا می‌گرفت. پوسیدگی در ناحیه طوقه بیشتر به رنگ قرمز مایل به قهوه ای تیره بود. در همه تکرارها علائم آلودگی در ساقه نیز گسترش یافت و گاهی ساقه کاملا سیاه و باریک شده و برگها کوچک، تیره و کاملا چروکیده گردیدند. در بعضی از جدایه‌ها، شانکرهایی در ناحیه طوقه تشکیل شد که حاشیه شانکر قهوه ای مایل به سیاه و یا قهوه ای مایل به قرمز بود و گاهی در وسط شانکر فرورفتگی مشخصی نیز بوجود می‌آمد.

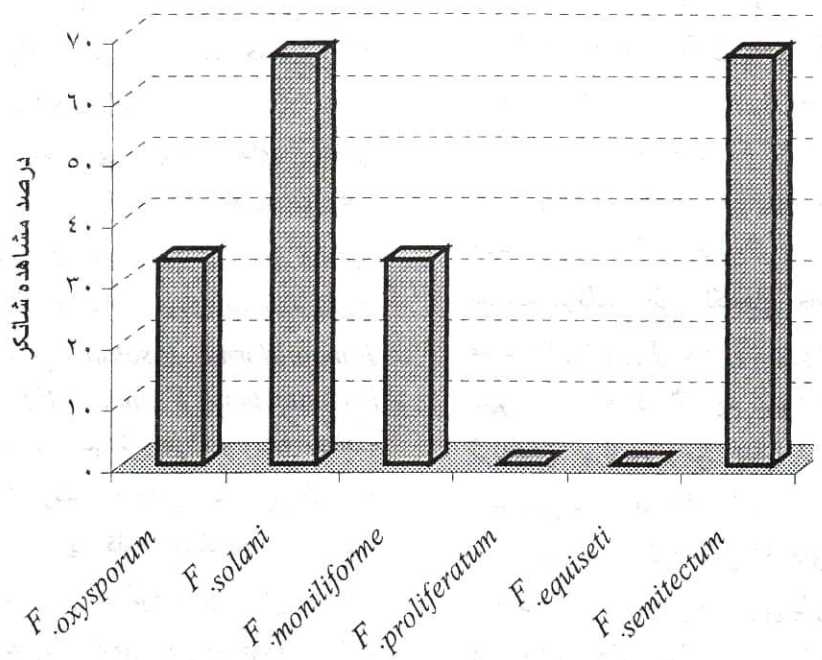
نتایج حاصل از بررسی وجود شانکر در انتهای ساقه نشان داد که در روش سوسپانسیون اسپور در همه جدایه‌های مورد نظر به جز جدایه‌های *F.proliferatum* شانکر تشکیل شد و درصد مشاهده شانکر در گونه‌های , *F.solani* *F.moniliforme* بیشتر از سایر گونه ها بود (شکل ۱). همچنین وجود یا عدم وجود شانکر در انتهای ساقه در روش مایه تلقیح گندم نیز مورد بررسی قرار گرفت که گونه های *F.semitectum* , *F.solani* بالاترین میزان شانکر را نشان دادند و در گونه های *F.proliferatum* , *F.equiseti* علائم بیماری بدون بروز شانکر بود (شکل۲). علائم مشاهده شده در آزمون بیماریزایی گونه‌های فوزاریوم جداشده از باقلا با آنچه که در شرایط مزرعه مشاهده گردید، کاملاً مطابقت داشت (شکل۳و۴).

نتایج مقایسه میانگین طول لکه‌های طوقه و ریشه به مدت ۱۰ روز پس از مایه زنی با روش سوسپانسیون اسپور نشان داد که تفاوت معنی داری بین گونه‌های مختلف فوزاریوم وجود نداشته و همگی در یک گروه قرار گرفتند (شکل۵). نتایج مقایسه میانگین طول لکه‌های طوقه و ریشه به مدت ۳۰ روز پس از مایه زنی با روش سوسپانسیون اسپور نشان داد که اگر چه تفاوت معنی داری بین گونه‌های فوزاریوم وجود ندارد اما از نظر شدت بیماریزایی در دو گروه قرار گرفتند (شکل۶).

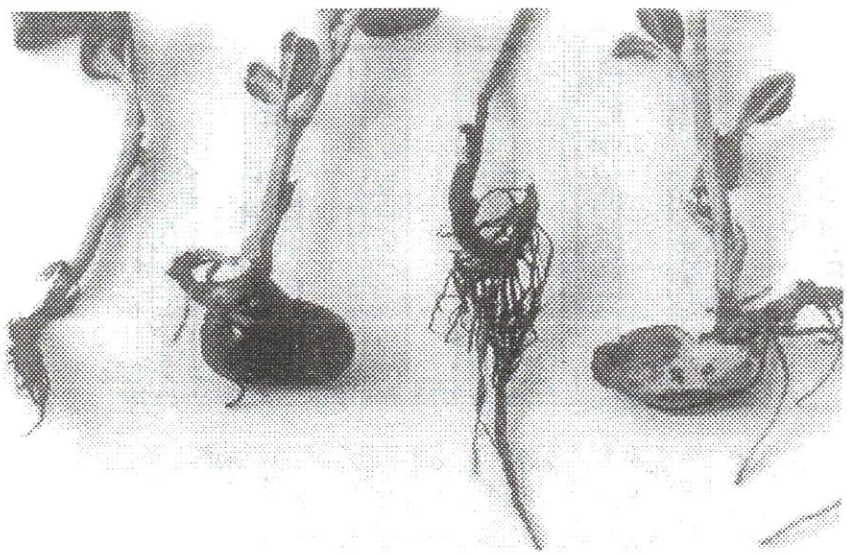
در مقایسه میانگین طول لکه‌های طوقه و ریشه به مدت ۱۰ روز پس از مایه زنی با روش مایه تلقیح گندم نیزگونه‌های فوزاریوم در دو گروه قرار گرفتند (شکل۷). در این آزمون نیز مانند روش سوسپانسیون اسپور، گونه *F. solani* بالاترین شدت بیماریزایی را داشت. همچنین میانگین طول لکه های طوقه و



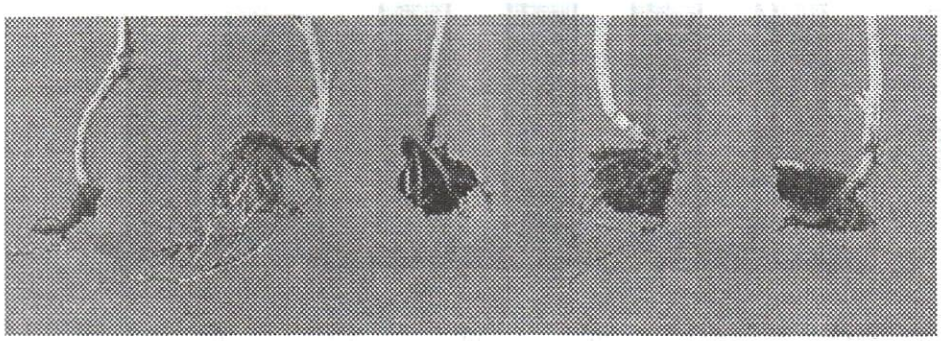
شکل ۱- درصد مشاهده شانکر طوقه در گیاهچه‌های باقلا که با روش سوسپانسیون اسپور مایه زنی شده‌اند.



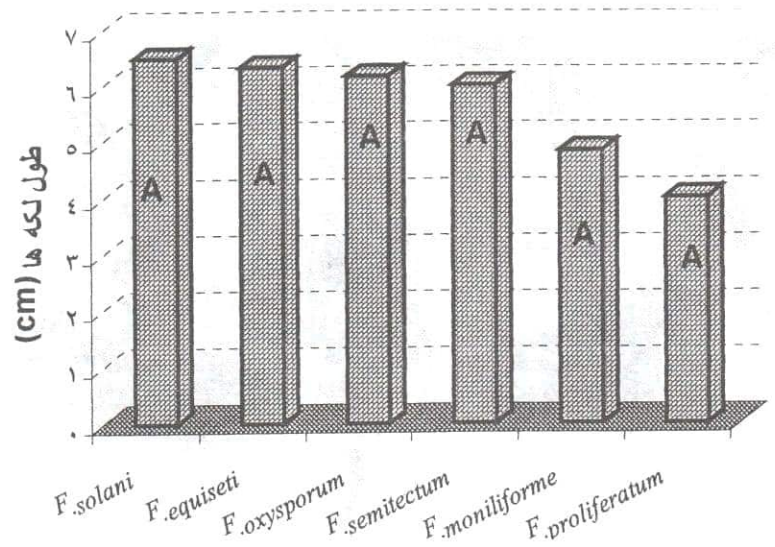
شکل۲- درصد مشاهده شانکر طوقه در گیاهچه‌های باقلا که با روش مایه تلقیح گندم مایه زنی شده‌اند.



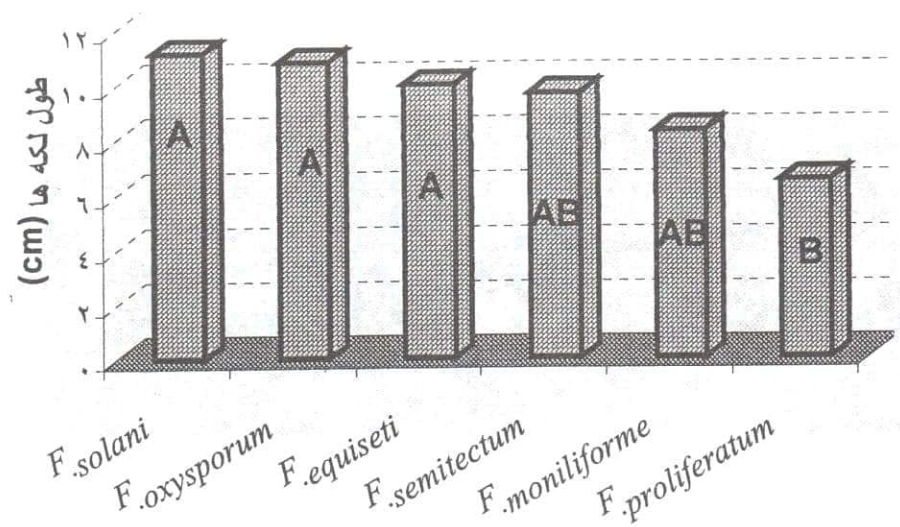
شکل۳- علائم بیماری در گیاهچه های باقلا که با روش اضافه کردن سوسپانسیون اسپورگونه *F.solani* به خاک اطراف ریشه مایه زنی شده اند.



شکل٤- علائم بیماری در گیاهچه های باقلا که با روش استفاده از مایه تلقیح گندم با گونه *F.solani* مایه زنی شده اند.



شکل۵- مقایسه میانگین طول لکه‌های طوقه و ریشه به مدت ۱۰ روز پس از مایه زنی با روش سوسپانسیون اسپور



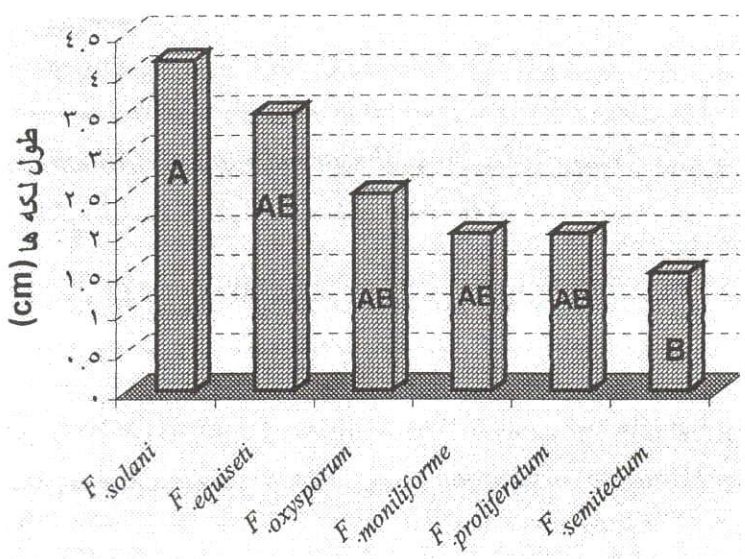
شکل٦- مقایسه میانگین طول لکه‌های طوقه و ریشه به مدت ۳۰ روز پس از مایه زنی با روش سوسپانسیون اسپور

ریشـه به مدت ۲۰ روز پس از مایه زنی با روش مایه تلقـیح گندم مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت که با استفاده از آزمون دانکن در سطح ٪۵ معنی دار شـد. در ایـن آزمـون گونه های فوزاریوم در دوگروه قرار گرفتند (شکل۸).

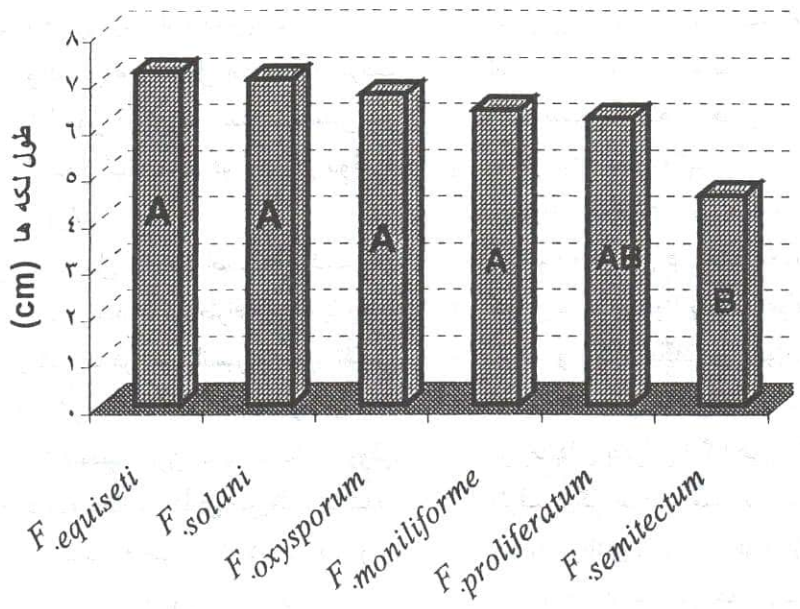
نـــتایج حاصـــل از روش اضـــافه کـــردن سوسپانسـیون‌اسـپور بـه خاک اطراف ریشه با روش غوطـه وری ریشـه‌ها در سوسپانسیون اسپور تفاوتی نداشـت اما با روش مایه تلقیح گندم متفاوت بود. در روش اسـتفاده از سوسپانسیون اسپور نسبت به روش مایـه تلقـیح گـندم علائم بیماری سریعتر و با شدت بیشـتری ظاهـر شـد بـه طوری که در این دو روش انـدازه لکـه‌های روی طوقه و ریشه به مدت ۱۰ روز پـس از مایـه زنی تفاوت قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر داشـت. همچنیـن درصـد مشـاهده شـانکر طوقه در روش سوسپانسـیون اسپور بالاتر از روش مایه تلقیح گندم بود به طوری که در بعضی از گیاهچه‌هایی که بـا روش سوسپانسـیون اسـپور مایـه زنی شده بودند شـانکر در ناحیه طوقه تشکیل شد ولی کاربرد روش مایـه تلقـیح گـندم در همان جدایه‌ها، بدون تشکیل شانکر بود (شکل۱و۲).

روند جداسازی از مرحله گیاهچه تا هنگام برداشت محصول در نقاط مختلف استان نشان داد که گونه های فوزاریوم از عوامل عمده بیماریزای طوقه و ریشه باقلا در خوزستان می باشند که احتمالاً به دلیل فقدان مدیریت آبیاری به خصوص در زمانهای بحرانی (گلدهی و تشکیل غلاف) و از طرف دیگر شرایط مساعد آب و هوایی هر ساله خسارت زیادی را ببار می آورند (۲۸).

بـا توجـه به ارزش غذایی باقلا و همچنین سطح زیرکشـت آن در اسـتان خوزستان کنترل بیماریهای ناشـی از گونـه های مختلف فوزاریوم در مزارع باقلا ضروری به نظر می رسد.



شکل۷- مقایسه میانگین طول لکه‌های طوقه و ریشه به مدت ۱۰ روز پس از مایه زنی با روش مایه تلقیح گندم



شکل۸ - مقایسه میانگین طول لکه‌های طوقه و ریشه به مدت ۲۰ روز پس از مایه زنی با روش مایه تلقیح گندم

منابع

۱- امانی، م.، زمانی زاده، ح.، حسن زاده، ن.، وسابکی، الف. ۱۳۸۱. تعیین گروههای سازگار رویشی *Fusarium oxysporum* عامل پژمردگی موز در بلوچستان. خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمانشاه، صفحه۲۲۳

۲- پیغامی، الف.، مسیحا، س.، ولی زاده، م.، و صمدی، ع.۱۳۸۱. بررسی میزان مقاوت ارقام مختلف پیاز *(Allium cepa. L)* به *(Fusarium spp.)* عوامل بیماری پوسیدگی ریشه و طبق پیاز، خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمانشاه، صفحه ۱۷۸.

۳- حیدریان، الف.، و ارشاد، ج.۱۳۸۱. شناسایی و بررسی قارچهای عامل پوسیدگی طوقه و ریشه لوبیا چیتی در استان چهارمحال و بختیاری. خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمانشاه، صفحه۱۵۶.

۴- دستجردی، ر؛ فلاحتی رستگار،م؛ و جعفرپور، ب.۱۳۸۱. شناسایی گونه های فوزاریوم همراه ریشه چغندرقند در مزارع استان خراسان و بررسی بیماریزایی گونه *Fusarium oxysporum*. چغندرقند شماره۱۸، صفحات ۱۴۳-۱۵۴.

۵- روانلو، ع.، و بنی هاشمی، ض. ۱۳۷۸. تاکسونومی و بیماریزایی فوزاریومهای همراه با ریشه و طوقه گندم در فارس. بیماریهای گیاهی جلد۳۵، صفحات۳۷- ۴۵.

۶- روحی بخش، الف.، و ارشاد، ج. ۱۳۷۶. بررسی میکوفلور لکه‌های نکروتیک برگ مرکبات در منطقه غرب مازندران. بیماریهای گیاهی جلد۳۳، صفحات۹۴- ۱۱۰.

۷- زارع، ر.، و ارشاد، ج. ۱۳۷۶. گونه های فوزاریوم جداشده از غلات در منطقه گرگان. بیماریهای گیاهی جلد۳۳، صفحات۱- ۱۴.

۸- طاهر خانی، ک.، علیزاده، ع.، فرخی نژاد، ر.، و شریفی تهرانی، ع. ۱۳۷۷. تعیین عوامل بیماریزای فوزاریومی نیشکر در استان خوزستان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرج. صفحه۱۲۰.

۹- علیزاده،ع ،. موسوی جرف، ع ،. و بنی هاشمی، ض.۱۳۷۸ . بیماریزایی، هیستوپاتولوژی و حساسیت چند رقم نخل خرما به سه گونه فوزاریوم. بیماریهای گیاهی جلد۱۰۱، صفحات۳۵- ۸۶ .

۱۰- موسوی جرف، ع ،. علیزاده، ع ،. حیاتی،ج و بنی هاشمی،ض. ۱۳۷۸. بررسی گونه های فوزاریوم همراه با نخل خرما در استان خوزستان. بیماریهای گیاهی جلد۳۵، صفحات ۷۵- ۸۵ .

۱۱- وفایی، ح ،. فرخی نژاد، ر.، و درویش نیا، م. ۱۳۸۰ . گونه های فوزاریوم همراه ریشه و طوقه گندم و جو در استان خوزستان. مجله علمی کشاورزی جلد۲۴، شماره۲، صفحات۱۰۱- ۱۲۵ .

12- Abouzeid, N. M., Elmorsy, G. A., Hassanein, A. M., and Arafa, M. K. 1997. Major organisms causing root-rot/ wilt and their relative importance on faba bean, lentil and chicpea. Egyptian Journal of Agricultur Research. 75: 529-542.

13- Akem, C. , and Bellar, M. 1999. Survey of faba bean disease in the main faba bean - growing regions of Syria. Arab Journal of Plant Protection. 17: 113-116.

14- Beshir, T., and Degago, Y.1999. Evaluation of faba bean cultivars for resistance to black root rot (*Fusarium solani*) in Ethiopia. FABIS Newsletter. 40: 23-25.

15- Booth, C. 1971. The Genus *Fusarium* .CMI. Kew, Surry.U.K.273p.

16- Burgess, L. W., Summerell. B. A., Bullock,S, Gott. K. P., and Ackhous, D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. *Fusarium* Research Laboratory Department of Crop Scince University of Sydny and Royal Botanic Gardens. 133p.

17- Dhingar, O. D., and Sinclair, J. B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 434p.

18- Elmorsy, G. A., Abouzeid, N. M., and Hassanein, A. M. 1997. Identification of *Fusarium* wilt caused by *F. oxysporum* and pathogen variability in faba bean, lentil and chickpea crops in Egypt. Egyptian Journal of Agricultural Research. 75: 551-564.

19- Freeman,S., and Rodriguez, R. I. 1993. A rapid inoculation technique for assessing pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *niveum* and *F. O.* f. sp. *melonis* on cucurbits. Plant Disease. 77: 1198-1201.

20- Gerlach, W.and Nirenberg, H. 1982. The genus *Fusarium* - A pictorial Atlas. Heff 209, Mit. Boil. Bundesanst.Land -Forstwirtsch. Berlin- Dahlem. 406p.

21- Gorfu, D.1994. Foot rot disease of faba bean in Ethiopia. FABIS Newsletter. 34: 27-28.

22- Gorfu, D. 1997. Effects of foot rot on faba bean. Seed Science and Technology. 25: 19- 23.

23- Korbas, M,. Remlein, D.and Drobnik, M.1995. Seedlings susceptibility of faba bean (*Vicia faba* var *minor*) cultivars to *Fusarium* disease. Materialy Sesji Instytutu ochrony Roslin. 35: 209- 212.

24- Leocata, S.and Sesto, F.1995. *Fusarium* on faba bean: factors limiting early cropping. Informator Agrario. 51: 74- 76.

25- Majchrzak, B., Kurowski. T. P., and Pszczolkowski, P.1996. Reaction of faba bean and pea cultivars to pathogenic fungi under different growing conditions. Plant Breeding and Seed Science. 40: 65- 78.

26- Nelson, P. E., Toussoun, T.A., and Marasas, W. F. O. 1983. *Fusarium* Species: An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania State Univ. Press, Univ. Park, 193p.

27- Omar, S. A., and Abdoalla., M. H. 2000. Physiological aspects of fungi isolated from root nodules of faba bean. Microbiological Research. 154: 339- 347.

28- Schwartz, H. F. 2001. Root rots of dry beans. Colorado State University Cooperative Extension. URL: http: //www.ext. colostate. Edu / pubs/ crops/ 02938.htm.

29- Simay, E. I. 1993. Effect of *Fusarium* spp. on faba bean seeds during germination. FABIS Newsletter. 33: 24-27.

Identification and Study on Pathogenicity of *Fusarium* spp. Associated with Foot and Root of Faba Bean in Khuzestan

S. Azimi,[1] R. Farrokhi Nejad [2] and S. A. Moosavi Jorf [3]

Abstract

During growing seasons of 2001-2002 this study was conducted to investigate and determine the *Fusarium* spp. associated with foot and root of faba bean in Khuzestan. Samples were collected from infected plants from different fields in different regions of Khuzestan including Ahwaz, Hamidie, Behbahan, Aghili, Shooshtar, Dezful, Sefiabad, Shoosh and Andimeshk. Eighty four isolates of the *Fusarium* species were isolated and purified by single spore or hyphal tip methods. Based on morphology, the isolates were identified as: *F. oxysporum* (27 isolates, 32.14%), *F. solani* (23 isolates, 27.38%), *F. moniliforme* (18 isolates, 21.42%), *F. proliferatum* (8 isolates, 9.52%), *F. semitectum* (4 isolates, 4.76%), and *F. equiseti* (4 isolates, 4.76%). This is the first report on these species from *vicia faba* from Iran. Besides, Faba bean is reported to be a *Matrix nova* for *F.proliferatum, F.semitectum* and *F. equiseti*. In pathogenicity tests, seedlings were inoculated using different methods including dipping roots in a spore suspension with 10^6CFU/ml, adding spore suspension to the soil around the roots, and using inoculated wheat grains (with the fungal isolates) in the soil around the seedling roots. Results indicated that all the isolates were pathogenic to the broad bean plants. In all pathogenicity methods mentioned above, *F. solani* had the most virulent.

Keywords: *Fusarium spp, Foot and Root, Faba bean, Rot*

1-Instructor, Department of Plant Protection, Chamran University, Ahvaz

2-Associate Professor, Department of Plant Protection, Chamran University, Ahvaz

3- Assistant Professor, Department of Plant Protection, Chamran University, Ahvaz