



## ارزیابی کارایی قارچکش‌های شیمیایی در بهبود کیفیت بذر و مهار بیماری لکه برگ آلترناریایی گشنیز

نیما خالدی<sup>۱\*</sup> و محمدحسن عصاره<sup>۲</sup>

۱- نویسنده مسوول: استادیار، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

(n\_khaledi@areeo.ac.ir)

۲- استاد، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۶

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۲۴

### چکیده

بیماری لکه برگ آلترناریایی ناشی از *Alternaria alternata* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های بذرزاد گشنیز است. هدف از این مطالعه شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی قارچ‌های بذرزاد جداسازی شده از توده‌های بومی گشنیز، بررسی تأثیر تیمار بذور با قارچکش‌های شیمیایی روی شاخص‌های بنبه و جوانه‌زنی و همچنین بررسی کارایی آن‌ها در مهار بیماری بذرزاد لکه برگ آلترناریایی است. به منظور شناسایی قارچ‌های بذرزاد، توده‌های بذری گشنیز از مزارع استان‌های خراسان جنوبی، البرز، مرکزی، قزوین و همدان بر اساس ضوابط انجمن بین‌المللی آزمون بذر نمونه‌برداری شد. جدایه‌های قارچی پس از جداسازی و خالص‌سازی، بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و آغازگرهای اختصاصی گونه شناسایی و تأیید شدند. همچنین میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌ها با آزمون بیماری‌زایی روی گیاهچه بررسی شد. میزان کارایی تیمار بذر با قارچکش‌های ایپرودیون-کاربندازیم (Rovral-TS<sup>®</sup>) و ماتکوزب (Dithane M-45<sup>®</sup>) روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنبه و همچنین میزان پیشرفت بیماری ارزیابی شد. در مجموع، بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی هشت جدایه *Alternaria alternata* شناسایی شدند. شاخص‌های جوانه‌زنی و بنبه بین توده‌های بذری متفاوت بوده و به نظر می‌رسد بخشی از تفاوت مشاهده شده ناشی از آلودگی به قارچ‌های بذرزاد است. نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد که حدود ۶۲/۵ درصد جدایه‌ها بیماری‌زا و ۳۷/۵ درصد جدایه‌های بیماری‌زا نبودند. میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌های مختلف *A. alternata* متفاوت بود. تیمار بذر با قارچکش‌های شیمیایی به‌طور قابل توجهی روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنبه تأثیر معنی‌دار داشتند. قارچکش‌ها به‌طور کامل لکه برگ آلترناریایی گشنیز را مهار نکردند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که میزان غلظت‌های مؤثر بازدارندگی قارچکش‌های شیمیایی با توجه به میزان بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *A. alternata* متفاوت است. ضدعفونی بذور با قارچکش ایپرودیون-کاربندازیم در مقایسه با ماتکوزب موجب بیشترین میزان کاهش شاخص بیماری ناشی از *A. alternata* روی گیاهچه‌های گشنیز می‌شود. استفاده از توده‌ی بذری نه‌آلود در مقایسه با سایر توده‌های بذری گشنیز مورد بررسی و همچنین ضدعفونی بذور قبل از کاشت با قارچکش ایپرودیون-کاربندازیم در تمامی مناطق مساعد کشت این محصول توصیه می‌گردد.

**کلیدواژه‌ها:** بذرزاد، بیماری‌زایی، جوانه زنی، شناسایی، سلامت بذر

دبیر تخصصی: دکتر رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا

## مقدمه

گشنیز با نام علمی *Coriandrum sativum* L. گیاهی دارویی و یکساله از خانواده چتریان (*Apiaceae*) و بومی جنوب اروپا و مناطق مدیترانه است. با توجه به کاربرد گسترده گشنیز در صنایع مختلف و میزان ارزش آوری صادرات آن به صورت خام و فرآوری شده، این گیاه از ارزش اقتصادی بالایی در تجارت جهانی برخوردار است (Mafakheri and Aminian Dehkordi, 2019). بیماری لکه برگ آلترناریایی با عامل *Alternaria alternata* (Fr.) Keissl یکی از مهم‌ترین بیماری‌های بذرزاد گشنیز است (Mangwende et al., 2018). این بیماری روی بوته‌های گشنیز علاوه بر ایجاد سوختگی گل موجب شانکر ساقه و لکه برگی می‌شود. قارچ‌های *Aspergillus A. alternata*، *Fusarium Aspergillus niger* Tiegh *flavus* Link *Penicillium expansum* Link و *oxy sporum* Schldl از آفریقای جنوبی (Mangwende et al., 2018) و قارچ‌های *Phoma multirostrata A. alternata* (P.N.Mathur, S.K.Menon & Thirum.) Dorenb. *Fusarium oxysporum* Schldl & Boerema *Sclerotium rolfsii* Sacc *Fusarium roseum* Link *Cladosporium cladosporioides* (Fresen.) G.A.de *Aspergillus glaucus* Link ex Gray، Vries *A. A. flavus Aspergillus ruber* Thom & Church *Trichoderma viride* Persoon *niger Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn و *Helminthosporium tetramerum* McKinney هندوستان به عنوان قارچ‌های بذرزاد و همراه بذر گشنیز شناسایی و گزارش شده است (Sumanth et al., 2010; Khare et al., 2017). عوامل بیماریزای قارچی به صورت بذرزاد و یا همراه بذر موجب کاهش یا از بین بردن جوانه زنی و بنه بذر، پوسیدگی و نکروز بذر، پژمردگی و سوختگی گیاهچه می‌شوند (Khare et al., 2014).

قارچ *A. alternata* گسترش جهانی داشته و می‌تواند غلات، گیاهان زینتی، دانه‌های روغنی، سبزیجات و درختان میوه را بیمار کند (Simmons, 2007). برخی از جدایه‌های

این قارچ غیربیماریزا بوده و به صورت پوده‌رست و یا درون-رست روی سطح و درون بافت‌های گیاهی رشد می‌کنند (Bart and Thomma, 2003). میزان بیماریزایی و قدرت تهاجم جدایه‌های مختلف *A. alternata* متفاوت است (Sharma et al., 2013; Ramezani et al., 2019). نتایج حاصل از بررسی بیماریزایی جدایه‌های مختلف *A. alternata* جداسازی شده از بذر زیره سبز نشان داد که حدود ۷۷ درصد جدایه‌ها بیماریزا و یا کم بیماریزا و بقیه جدایه‌ها بیماریزا نبودند (Khaledi et al., 2021). قدرت تهاجم، عاملی مهم در سازگاری عوامل بیماریزا است که نشان دهنده توانایی احتمالی آنها در ظهور علائم بیماری روی میزبان در کوتاهترین زمان ممکن و ایجاد همه‌گیری بیماری است (Sacristan and García-Arenal, 2008).

با توجه به دامنه میزبانی وسیع *A. alternata* امکان مهار بیماری‌های ناشی از آن سخت بوده و روش مؤثری برای مهار این بیماری‌ها به‌جز استفاده از سموم شیمیایی در کنار استفاده از ارقام مقاوم و یا متحمل وجود ندارد. استفاده از ارقام مقاوم یکی از راهکارهای اقتصادی در مدیریت بیماری‌های گیاهی به‌شمار می‌رود. با این حال، تاکنون سطحی از مقاومت علیه لکه برگی آلترناریایی در گشنیز گزارش نشده است. در نتیجه راهبردهای مختلفی از جمله استفاده از بذر سالم، رعایت اصول به‌زراعی، استفاده قارچکش‌های شیمیایی و ضدعفونی بذر برای مدیریت بیماری‌های گشنیز توصیه شده است (Khare et al., 2014). استفاده از بذر سالم ضمن حفظ ارزش زراعی و تنوع ژنتیکی توده‌های بومی گشنیز ایرانی، موجب کاهش آلودگی محصول در مزرعه به بیماری‌های قارچی ناشی از بذر می‌شود. قارچکش‌های مانکوزب، کاپتان، کاپتوفول، کاربندازیم و تیرام برای مهار بیماری‌های گشنیز توصیه شده است (Khare et al., 2017). استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی می‌تواند اثرات منفی روی برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک و بیوشیمیایی میزبان داشته و تهدیدی جدی برای محیط زیست و سلامت انسان باشد (Petit et al., 2012).

بهترین راه مقابله با بیماری‌های بذرزاد استفاده از بذر سالم و گواهی شده همراه با تیمار بذر با قارچ‌کش‌های شیمیایی است.

(Mangwende et al., 2018) و بدین ترتیب جدایه‌ها جداسازی شدند. جدایه‌های قارچی با استفاده از روش تک اسپور کردن روی محیط کشت آب آگار دو درصد خالص سازی شدند. شناسایی جدایه‌های جنس آلترناریا بر اساس خصوصیات ریخت شناختی، میکروسکوپی و کلیدهای شناسایی معتبر انجام گردید (Simmons, 2007).

### شناسایی مولکولی ۳ جدایه‌ها

برای تأیید جدایه‌های *A. alternata* از آغازگرهای اختصاصی این گونه (Forward: 5' GTG CCT TCC Reverse: 5' CGG و CCC AAG GTC TCC G 3' AAA CGA GGT GGT TCA GGT C 3' استفاده شد (Kordalewska et al., 2015). برای تهیه میسلیم مورد نیاز برای استخراج DNA، جدایه‌های قارچی در ظروف ارلن مایر محتوی محیط کشت عصاره‌ی سیب‌زمینی دکستروز (عصاره‌ی سیصد گرم سیب‌زمینی جوشانده شده، بیست گرم دکستروز، در یک لیتر آب مقطر) به مدت ۱۰ روز در داخل دستگاه انکوباتور شیکردار با دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. توده میسلیمی رشد یافته با پمپ خلاء، کیف بوختر و کاغذ صافی واتمن سترون جمع‌آوری و با آب مقطر سترون شستشو شدند. پس از آنگیری کامل، توده میسلیمی برداشت و به درون میکروتیوب‌های سترون ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. میکروتیوب‌های حاوی میسلیم تا مرحله استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. برای استخراج DNA از جدایه‌های قارچ از کیت Genomic DNA isolation kit ساخت شرکت Pishgam Biotech ایران با توجه به شیوه‌نامه‌ی شرکت سازنده استفاده شد. به منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج شده، از دستگاه نانودراب اسپکتروفوتومتری (NanoDrop 2000; Spectrophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA) و ژل آگارز دو درصد استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، سپس ۳۵ چرخه در مرحله واسرشت ۳۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال ۶۰ ثانیه در ۵۸ درجه سلسیوس و

با وجود اهمیت اقتصادی گشنیز، اطلاعات ما در مورد بیماری‌های ناشی از قارچ‌های بذرزاد این گیاه در ایران بسیار محدود است. هدف از این پژوهش (الف) شناسایی قارچ‌های بذرزاد در توده‌های بومی گشنیز، (ب) ارزیابی تأثیر آنها روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی، (ج) میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌های قارچی جداسازی شده از بذور، و (د) بررسی تأثیر کارایی تیمار بذر با قارچکش‌های شیمیایی رایج روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی و همچنین مهار بیماری لکه برگی آلترناریایی است.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه برداری

نمونه برداری در طی سال زراعی ۱۳۹۸ پس از رسیدگی کامل بذور و برداشت از توده‌های بذری گشنیز در استان‌های خراسان جنوبی (شهرستان بشرویه، سریشه و قائن)، البرز (شهرستان کرج)، مرکزی (شهرستان اراک)، قزوین (شهرستان قزوین) و همدان (شهرستان نهاوند) براساس شیوه‌نامه‌ی انجمن بین‌المللی آزمون بذر (Anonymous, 2017) و راهنمای فنی پارت چینی و نمونه برداری بذر (Abbasian, 2019) انجام شد و همراه ثبت مشخصات در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه سلامت بذر موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال منتقل گردید.

#### جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی

#### ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی

برای جداسازی جدایه‌های قارچی، پس از گندزدایی سطحی بذور به مدت یک دقیقه در محلول رقیق شده هیپوکلریت سدیم یک درصد، سه بار با آب مقطر سترون شستشو و سپس با کاغذ صافی سترون خشک شدند. بذور در سطح تشتک‌های پتری (به قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت عمومی سیب‌زمینی دکستروز آگار (عصاره‌ی سیصد گرم سیب‌زمینی جوشانده شده، بیست گرم دکستروز، ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) کشت و در اتاقک رشد با دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس و دوره نوری متناوب، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفت

## آزمون‌های بیماری‌زایی و سنجش قدرت تهاجم جدایه‌ها

### مواد گیاهی و آماده‌سازی مایه تلقیح حاوی جدایه‌های قارچ

برای ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها، بذر توده‌ی بومی گشنیز که فاقد هر گونه آلودگی طبیعی بود از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال تهیه شد. پس از ضدعفونی سطحی، بذور به مدت ۵ روز در انکوباتور روی کاغذ صافی سترون مرطوب در دمای  $20 \pm 1$  درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس در هر گلدان پلاستیکی (قطر ۱۵ سانتی‌متر) پنج بذر جوانه‌زده کشت و در شرایط دمایی  $25 \pm 3$  درجه سلسیوس با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی قرار گرفتند. بستر کشت مورد استفاده در این آزمایش، ترکیبی از پیت ماس، پرلیت و کوکوپیت با نسبت حجمی ۲:۱:۲ بود. برای تهیه مایه تلقیح جدایه‌های *A. alternata* سوسپانسیون اسپور جدایه‌ها در غلظت  $1 \times 10^5$  اسپور در هر میلی‌لیتر با استفاده از روش سری رقت سریالی با آب مقطر استریل از پرکنه‌های هفت روزه کشت شده در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار بر اساس روش شرح داده شده توسط Müller et al. (2012) تهیه شد.

### اثبات بیماری‌زایی و سنجش قدرت تهاجم جدایه‌ها

برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی، با اسپور پاشی روی گیاهچه به میزان یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور ( $1 \times 10^5$  اسپور در هر میلی‌لیتر) حاوی  $0/05$  درصد توئین ۲۰ در مرحله گیاهچه چهار هفته‌ای گشنیز بر اساس روش شرح داده شده توسط Shi et al. (2016) انجام شد. گیاهان شاهد با آب مقطر سترون افشانه شدند. پس از مایه‌زنی، گیاهان به مدت ۴۸ ساعت در محفظه‌ای با رطوبت ۸۰ تا ۸۵ درصد نگهداری و سپس به گلخانه با دمای ۱۷ تا ۲۵ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از ظهور علائم آلودگی، شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی گیاهچه، بر اساس نسبت میزان لکه برگی با استفاده از مقیاس ۰-۵ «۰» بدون لکه برگی، «۱» کمتر و یا مساوی دو لکه روی سطح برگ با قطر کمتر از ۵ میلی‌متر (۱ تا ۲۰ درصد سطح برگ)، «۲» بین سه تا چهار لکه روی برگ

مرحله گسترش در ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت ۸ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس بود. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۱۰ میکرولیتر 2X PCR Master Mix (Denazist, Iran)، ۲ میکرولیتر DNA با غلظت  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  و  $0/1$  میکرولیتر آغازگر روبه‌جلو و آغازگر برگشتی بود. 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 رنگ آمیزی بارنگ فلورسنت سایبرگرین (SYBR® Green) و سپس عکس‌برداری از ژل با استفاده از دستگاه Syngene Gene Gel Documentation مدل Flash Bio (USA) انجام شد.

### ارزیابی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه

آزمون جوانه زنی استاندارد براساس شیوه‌نامه‌ی انجمن بین‌المللی آزمون بذر انجام شد (Anonymous, 2017). برای این منظور تعداد ۴۰۰ بذر (چهار تکرار با ۱۰۰ عدد بذر) از نمونه‌های بذری به صورت تصادفی انتخاب و روی کاغذ صافی واتمن در داخل تشتک‌های پتری قرار داده شده و به اتاقک رشد در دمای  $25 \pm 1$  درجه سلسیوس و با دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی منتقل شدند. پس از ۲۱ روز، میانگین درصد جوانه‌زنی، میانگین درصد گیاهچه‌های غیرعادی (تغییر شکل یافته و بیمار)، میانگین ارتفاع ساقه‌چه و ریشه‌چه، میانگین وزن تر و وزن خشک (با قرار دادن در آون به مدت ۴۸ ساعت در ۷۵ درجه سلسیوس) اندازه‌گیری شد. همچنین شاخص طولی و وزنی بنیه با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید:

= شاخص طولی بنیه

$\times$  (میانگین طولی ساقه‌چه + میانگین طول ساقه‌چه)

درصد جوانه‌زنی نهایی

= شاخص وزنی بنیه

درصد جوانه‌زنی نهایی  $\times$  وزن خشک گیاهچه

محصولات استفاده شد. ابتدا کارایی قارچ کش‌های ایپرودیون-کاربندازیم و مانکوزب روی رشد جدایه‌های بیماریزای قارچی شناسایی شده (*A. alternata*) با استفاده از روش اختلاط در محیط کشت (Abd-El-Khair and El-Gamal Nadia, 2011) مورد بررسی و سپس حداقل غلظت مهارکنندگی<sup>۱</sup>، حداقل غلظت کشندگی<sup>۲</sup> و غلظت ممانعت‌کنندگی<sup>۳</sup> با استفاده از روش استاندارد رقیق‌سازی در محیط کشت مایع<sup>۴</sup> تعیین شد (Plodpai et al., 2013).

برای ضدعفونی بذور با قارچ‌کش‌های شیمیایی، بذور به صورت دستی با افزودن سوپانسیون‌های تهیه شده از هر قارچ‌کش به نسبت‌های صفر تا ۲۰۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم بذر، به ۱۰۰ گرم بذر و آغشته کردن یکنواخت بذور با قارچ‌کش به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. سپس، بذره‌های تیمار شده روی کاغذهای سترون قرار گرفته و در زیر هود لامینار فلو خشک شدند. میزان کارایی ضدعفونی بذر با این قارچ‌کش‌ها در غلظت ممانعت‌کنندگی با ۵۰ درصد اثر مهارکنندگی روی رشد قارچ روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه با استفاده از مون جوانه زنی استاندارد و همچنین شاخص بیماری بذرزاد ناشی از *A. alternata* در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. میزان تأثیر قارچ‌کش‌ها روی شاخص بیماری با استفاده از رابطه‌ی زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد کاهش شاخص بیماری} = \left( \frac{\text{میزان شاخص بیماری در تیمار} - \text{میزان شاخص بیماری در شاهد آلوده}}{\text{میزان شاخص بیماری در شاهد آلوده}} \right) \times 100$$

هر تیمار دارای چهار تکرار در هر بار انجام آزمایش بود و آزمایش دو بار تکرار شد.

### تجزیه و تحلیل داده‌ها

واکاوی آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف پس از نرمال‌سازی داده‌ها با تبدیل لگاریتمی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار با استفاده از

با قطر کمتر از ۵ میلی‌متر (۲۱ تا ۴۰ درصد سطح برگ)، «۳» بین پنج تا هفت لکه روی برگ با قطر بیشتر از ۵ میلی‌متر (۴۱ تا ۶۰ درصد سطح برگ)، «۴» بیش از ۸ لکه روی برگ با قطر بیشتر از ۵ میلی‌متر که ممکن است لکه‌ها ادغام و موجب ایجاد لکه بافت مرده شوند (۶۱ تا ۸۰ درصد سطح برگ)، «۵» بیش از ۹ لکه روی برگ تا از بین رفتن کامل برگ (۸۱ تا ۱۰۰ درصد سطح برگ)؛ به روش شرح داده شده توسط Mangwende et al. (2018)، درجه‌بندی شد و شاخص بیماریزایی با فرمول زیر محاسبه گردید.

درصد شاخص بیماری

$$= \frac{0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5}{5N} \times 100$$

$n_0$ : تعداد گیاهچه‌ها با درجه صفر آلودگی،  $n_1$ : تعداد گیاهچه‌ها با درجه یک آلودگی،  $n_2$ : تعداد گیاهچه‌ها با درجه دو آلودگی،  $n_3$ : تعداد گیاهچه‌ها با درجه سه آلودگی،  $n_4$ : تعداد گیاهچه‌ها با درجه چهار آلودگی،  $n_5$ : تعداد گیاهچه‌ها با درجه پنج آلودگی؛  $N$ : تعداد کل گیاهچه‌ها

همچنین میزان قدرت تهاجم جدایه‌های قارچی روی گیاهچه با استفاده از روش شرح داده شده توسط Taheri (2019) مورد بررسی قرار گرفت. میزان قدرت تهاجم جدایه‌ها بر اساس مدت زمان ظهور علائم بیماری پس از مایه‌زنی توسط جدایه‌ها تعیین شد.

### ارزیابی کارایی قارچ‌کش‌های شیمیایی

با توجه به آنکه تاکنون سموم ضدعفونی‌کننده موجود در بازار برای مهار بیماری‌های بذرزاد گشنیز مورد بررسی قرار نگرفته و از سوی دیگر قارچ شناسایی شده (*A. alternata*) دامنه میزبانی وسیعی دارد، برای ارزیابی تأثیر کارایی این قارچ‌کش‌ها از قارچ‌کش‌های پیشنهاد شده ایپرودیون-کاربندازیم (نام تجاری (Rovral-TS® (WP 52.5%) و مانکوزب (نام تجاری (Dithane M-45® (WP 80%) به صورت پودر و تابل ساخت شرکت گیاه، روی سایر

1 - Minimum inhibitory concentration; MIC

2 - Minimum fungicidal concentration; MFC

3 - Inhibitory concentration 50; IC50

4 - Broth microdilution

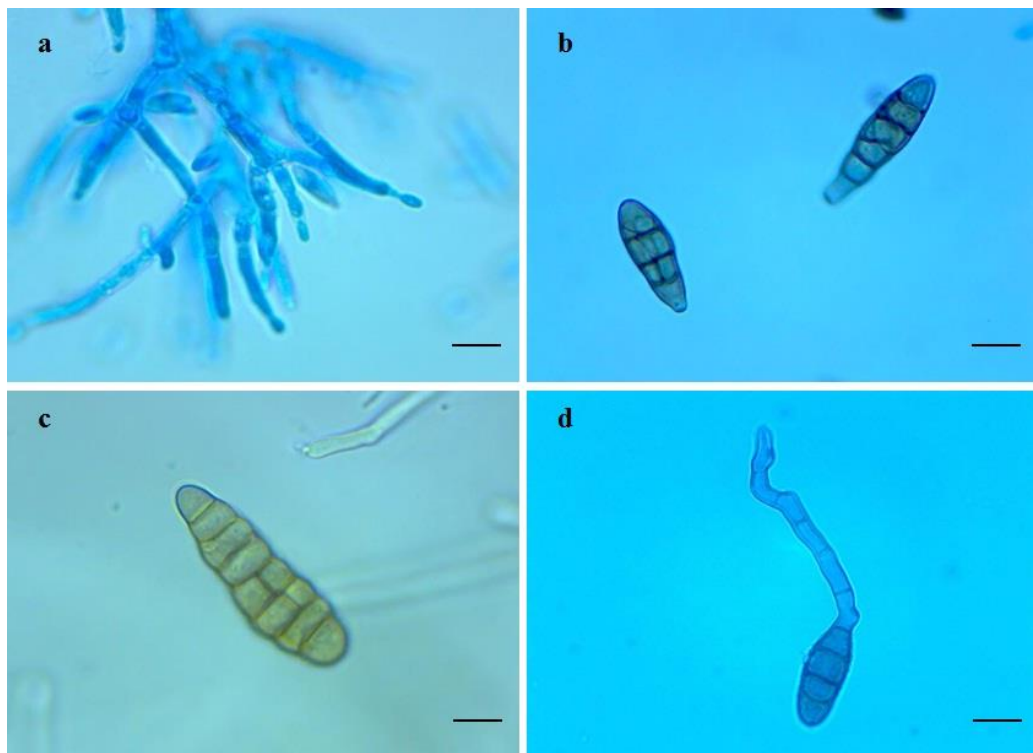
ذکر شده توسط Simmons (2007) انجام گرفت. کنیدیوم‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن، مخروطی یا گلابی وارونه یا تخم مرغی شکل، کوچک به ابعاد  $9-18 \times 2.0-6.3$  میکرومتر، فاقد نوک یا با نوکی کوتاه بودند (شکل ۱). کنیدیوم بر قهوه‌ای روشن تا سبز زیتونی، به ابعاد  $3-5 \times 3-6.0$  میکرومتر، راست یا خمیده، دارای دیواره، با  $3-8$  کنیدیوم که در یک زنجیره روی یکدیگر تشکیل شده بودند (شکل ۱). نتایج شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها به روش مولکولی و با استفاده از آغازگرهای اختصاصی AaF/AaR تأیید شد.

مقایسه داده‌های به دست آمده از بررسی بیماریزایی جدایه‌های *A. alternata* روی گیاهچه در جدول ۱ ارائه شده است. بررسی بیماریزایی جدایه‌های *A. alternata* روی گیاهچه گشنیز نشان داد که تمامی جدایه‌های قارچ شناسایی شده قادر به بیماریزایی روی گیاهچه‌های گشنیز نبودند. نتایج حاصل از بررسی بیماریزایی

نرم‌افزار SAS (version 9.2) انجام شد. هر آزمایش حداقل دو بار تکرار شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی دار سطح احتمال پنج درصد ( $P \leq 0.05$ ) مورد ارزیابی قرار گرفت. میزان غلظت مؤثر ۵۰ درصد قارچکش‌های شیمیایی مورد بررسی در بازداری از رشد میسلیمی قارچ‌ها، با استفاده از نرم‌افزار (Probit Analysis POLO-PC) تخمین زده شد (Anonymous, 1987). برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 استفاده گردید.

### نتایج

بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و میکروسکوپی و با استفاده از کلید شناسایی معتبر در مجموع ۸ جدایه از توده‌های بذری بشرویه (۲ جدایه)، سربیشه (۵ جدایه) و قائن (۱ جدایه) جداسازی شدند که متعلق به *A. alternata* بودند (جدول ۱). تشخیص گونه *A. alternata* بر اساس ویژگی‌های کلیدی



شکل ۱- ویژگی‌های ریخت‌شناختی کنیدیوم‌های جدایه‌ی AGA2 از *Alternaria alternata* جداسازی شده از نمونه بذری گشنیز. (a) کنیدیوفورها با کنیدیوم‌های در حال نمو، (b, c) کنیدیوم‌های بالغ، (d) جوانه‌زنی کنیدیوم. خط مقیاس = ۲۰ میکرومتر.

Figure 1. Images of morphological characteristics of conidia of the AGA2 isolate of *Alternaria alternata* isolated from coriander seed sample. (a) Conidiophores with conidia developing, (b, c) mature conidia, (d) germinating conidium. Scale bars= 20  $\mu$ m.

جدول ۱ - مشخصات جدایه‌های *Alternaria alternata* جداسازی شده از نمونه‌های بذری گشنیز بر اساس محل نمونه برداری، بیماری‌زایی و قدرت تهاجم

**Table 1. Characteristics of *Alternaria alternata* isolates recovered from coriander seed samples based on sampling site, pathogenicity and aggressiveness**

Isolate code	Sample site*	Pathogenicity (DI)	Aggressiveness (hpi)
AGA1	Sarbisheh	0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	-
AGA2	Sarbisheh	73.25 ± 0.63 <sup>a</sup>	186
AGA3	Sarbisheh	22.75 ± 0.47 <sup>e</sup>	288
AGA4	Sarbisheh	40.25 ± 0.25 <sup>c</sup>	234
AGA5	Sarbisheh	0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	-
AGA6	Boshravieh	54.00 ± 0.71 <sup>b</sup>	210
AGA7	Boshravieh	0.00 ± 0.00 <sup>f</sup>	-
AGA8	Qaen	29.25 ± 1.11 <sup>d</sup>	252
LSD (0.05)		2.67	-

\*Sample sites were located in South Khorasan province

hpi = hours post inoculation, DI = disease index, Average ± standard error, Means within a column indicated by the same letter were not significantly different according to the least significant difference (LSD) test at the level  $p < 0.05$ .

بشرویه (۶۲/۵ درصد)، سریشه (۲۵ درصد)، قائن (۱۲/۵ درصد)، کرج (صفر درصد)، اراک (صفر درصد)، قزوین (صفر درصد) و نهاوند (صفر درصد) می‌باشد. در این مطالعه از توده‌های بذری گشنیز از میان گونه‌های *Alternaria* فقط گونه *A. alternata* جداسازی و شناسایی شد. نتایج درصد شاخص‌های جوانه‌زنی و بنيه بذر تحت تأثیر قارچ‌های بذرزاد نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذور در نمونه‌ها از ۶۵/۵۰ تا ۸۴/۷۵ درصد متغیر بود (جدول ۲). میانگین درصد گیاهچه‌های غیرعادی تغییر شکل یافته و بیمار در نمونه‌ها کمتر از یک درصد بود. بالاترین درصد گیاهچه عادی مربوط به نمونه‌های بذری مزارع کرج، قزوین، اراک و نهاوند بود. نتایج حاصل از آزمون استاندارد جوانه‌زنی نشان داد که شاخص بنيه گیاهچه از جمله شاخص طولی بنيه از ۱۲۹/۴۰ تا ۲۷۷/۵۵ و شاخص وزنی بنيه از ۱/۲۹ تا ۲/۲۲ متغیر بود (جدول ۲). بالاترین و کمترین شاخص بنيه گیاهچه به ترتیب متعلق به نمونه‌های بذر نهاوند و سریشه از استان همدان و خراسان جنوبی بود. در توده‌های بذری جمع آوری شده از استان خراسان جنوبی در مقایسه با توده‌های بذری جمع آوری شده از استان‌های البرز، مرکزی، قزوین و همدان تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های جوانه‌زنی و بنيه مشاهده شد. هرچند که در میان توده‌های بذری جمع آوری شده از کرج،

جدایه‌های *A. alternata* نشان داد که ۵ جدایه‌ها بیماری‌زا و ۳ عدد از جدایه‌های بیماری‌زا نبودند. جدایه AGA2 موجب بالاترین میزان بیماری در گیاهچه گشنیز شد. آزمون بیماری‌زایی نشان داد که شاخص بیماری برای جدایه‌های بیماری‌زا گونه *A. alternata* از ۲۲/۷۵ ± ۰/۴۷ تا ۷۳/۲۵ ± ۰/۶۳ متغیر بود (جدول ۱). همچنین قدرت تهاجم جدایه‌های *A. alternata* مورد مطالعه متفاوت بود (جدول ۱). نتایج آزمون قدرت تهاجم جدایه‌های *A. alternata* روی گیاهچه‌ها نشان داد که بیشترین میزان قدرت تهاجم جدایه‌ها مربوط به جدایه AGA2 بود که اولین علائم بیماری را ۱۸۶ ساعت پس از مایه‌زنی به صورت لکه‌های کوچک نکروزی روی برگ و ساقه نشان می‌دهند (جدول ۱). کمترین قدرت تهاجم در مقایسه با سایر جدایه‌های بیماری‌زا مربوط به جدایه AGA3 (۲۸۸ ساعت پس از مایه‌زنی) بود (جدول ۱). نتایج حاصل از ارزیابی آلودگی به *A. alternata* در توده‌های بذری گشنیز نشان داد که فقط در توده‌های بذری نمونه برداری شده از مناطق بشرویه، سریشه و قائن در استان خراسان جنوبی آلودگی ردیابی شده است. بیشترین فراوانی جدایه‌های قارچی جداسازی شده در توده‌های بذری گشنیز به ترتیب مربوط به جمعیت‌های بومی جمع آوری شده از

متغير و همچنين قارچکش مانکوزب از ۸۱۱ تا ۱۷۹۶ ميلي گرم در ليتر متغير بود (جدول ۳). مقادير ميزان غلظت مؤثر ۵۰ درصدی قارچکش‌هاي مورد بررسي بين ۳۱۰ تا ۷۵۳ ميلي گرم در ليتر متغير بود.

آزمون بيماريزايي نشان داد که شاخص بيماري بذرزاد ناشي از *A. alternata* در توده بذري سريشه به ترتيب در گياهچه‌هاي حاصل از تيمار شاهد، تيماري بذري ابيروديون-کاربندازيم و تيماري بذري مانکوزب به ترتيب به ميزان  $۲/۱۰ \pm ۴۹/۵$ ،  $۲۳/۰ \pm ۱/۷۶$  و  $۳۰/۵ \pm ۱/۷۶$  درصد متغير بود (شکل ۲). شاخص بيماري بذرزاد در توده بذري بشرويه به ترتيب در تيمارهاي بذري شاهد، ابيروديون-کاربندازيم و مانکوزب به ترتيب به ميزان  $۲/۵۶ \pm ۲۳/۲۵$ ،  $۱/۲۰ \pm ۱۲/۵$  و  $۷/۲۵ \pm ۰/۸۵$  درصد و همچنين در توده بذري قائن به ترتيب به ميزان  $۰/۹۵ \pm ۱/۰۵$ ،  $۰/۴۸ \pm ۵/۲۵$  و  $۳/۰ \pm ۰/۷۱$  درصد متغير بود (شکل ۲). کمترین شاخص بيماري در گياهچه‌هاي حاصل از تيماري بذري ابيروديون-کاربندازيم مشاهده شد.

بر اساس نتايج حاصل از مقايسه ميانگين شاخص‌هاي جوانه‌زني و بنيه، تيمارهاي بذري با قارچکش‌هاي شيميايي در مقايسه با تيمار بذري شاهد در گروه آماري مختلف قرار گرفتند و از لحاظ آماري بر اساس آزمون

اراک، قزوین و نهاوند تفاوت معنی‌داری در شاخص‌های جوانه زنی و بنيه مشاهده نشد. میانگین طول ساقچه از ۰/۹ تا ۱/۵ سانتی‌متر و طول ریشه‌چه از ۱ تا ۱/۸ سانتی‌متر متغير بود. همچنين وزن تر گياهچه از ۰/۲۱۵ تا ۰/۲۶۰ گرم و وزن خشک از ۰/۱۹ تا ۰/۲۶ گرم متغير بود (جدول ۲).

نتايج حاصل از بررسي تأثير قارچکش‌هاي ابيروديون-کاربندازيم و مانکوزب روی رشد ميسليومي جدايه‌هاي بيماريزاي قارچی *A. alternata* جداسازی شده از بذور گشنيز نشان داد که قارچکش‌هاي ابيروديون-کاربندازيم و مانکوزب در غلظت توصیه شده (۲۰۰۰ ميلي-گرم در ليتر) روی ساير محصولات موجب مهار رشد ميسليومي جدايه‌هاي بيماريزاي *A. alternata* می‌شوند (جدول ۳). نتايج نشان داد که بين ميزان حداقل غلظت مهارکنندگی و غلظت کشندگی قارچکش‌ها روی هر کدام از جدايه‌هاي مورد بررسي تفاوت وجود دارد. حداقل غلظت مهارکنندگی قارچکش ابيروديون-کاربندازيم از ۶۳۰ تا ۱۲۶۸ ميلي-گرم در ليتر متغير و همچنين قارچکش مانکوزب از ۷۹۵ تا ۱۴۹۳ ميلي-گرم در ليتر متغير بود. حداقل غلظت کشندگی قارچکش ابيروديون-کاربندازيم از ۶۴۶ تا ۱۴۵۵ ميلي-گرم در ليتر

جدول ۲- مقايسه ميانگين شاخص‌هاي جوانه‌زني و بنيه در توده‌هاي بذري گشنيز تحت تأثير آلودگی طبيعي قارچی

Table 2. Means comparison of germination and vigor indices as affected by natural fungal infestation in coriander seed populations

Sample site*	NFI	GP	DS	SD	SL	RL	FW	DW	SLVI	SWVI
Boshrahviah (SK)	2	74.25 <sup>d</sup>	0.50 <sup>ab</sup>	0.25 <sup>b</sup>	1.1 <sup>c</sup>	1.4 <sup>c</sup>	0.233 <sup>d</sup>	0.022 <sup>b</sup>	193.07 <sup>d</sup>	1.65 <sup>d</sup>
Sarbisheh (SK)	5	65.50 <sup>e</sup>	1.00 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	0.9 <sup>d</sup>	1.0 <sup>d</sup>	0.215 <sup>e</sup>	0.019 <sup>c</sup>	129.40 <sup>e</sup>	1.29 <sup>e</sup>
Qaen (SK)	1	77.25 <sup>c</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.25 <sup>b</sup>	1.2 <sup>c</sup>	1.5 <sup>b</sup>	0.246 <sup>c</sup>	0.022 <sup>b</sup>	210.60 <sup>c</sup>	1.76 <sup>c</sup>
Karaj (AL)	0	80.50 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	1.7 <sup>a</sup>	0.258 <sup>ab</sup>	0.026 <sup>a</sup>	255.52 <sup>b</sup>	2.07 <sup>b</sup>
Arak (MA)	0	80.25 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.3 <sup>b</sup>	1.7 <sup>a</sup>	0.257 <sup>ab</sup>	0.026 <sup>a</sup>	244.70 <sup>b</sup>	2.06 <sup>b</sup>
Qazvin (QZ)	0	80.00 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.3 <sup>b</sup>	1.7 <sup>a</sup>	0.256 <sup>b</sup>	0.026 <sup>a</sup>	244.05 <sup>b</sup>	2.04 <sup>b</sup>
Nahavand (HM)	0	84.75 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	0.260 <sup>a</sup>	0.026 <sup>a</sup>	277.55 <sup>a</sup>	2.22 <sup>a</sup>
LSD (0.05)	-	2.29	0.62	0.39	0.11	0.08	0.004	0.001	12.92	0.07

NFI = number of fungal isolates, GP = Germination percent, DS = the average percentage of deformed seedling, SD = the average percentage of seedling disease, SL = average shoot length (cm), RL = average root length (cm), FW = fresh weight (g), DW = dry weight (g), SLVI = seedling length vigor index and SWVI = seedling weight vigor index. Each experiment was repeated two times with similar results. Means within a column indicated by the same letter were not significantly different according to the least significant difference (LSD) test at the level  $p < 0.05$ .

\*Sample sites were located in South Khorasan (SK), Alborz (AL), Markazi (MA), Qazvin (QZ), and Hamedan (HM) provinces.



جدول ۳- غلظت‌های مؤثر بازدارندگی قارچکش‌های شیمیایی در برابر رشد میسلیمی جدایه‌های بیماری‌زای *Alternaria alternata*

Table 3. The effective inhibitory concentration of chemical fungicides against mycelial growth of the pathogenic isolates of *Alternaria alternata*

Fungicides	Isolates														
	AGA2			AGA3			AGA4			AGA6			AGA8		
	IC50	MIC	MFC	IC50	MIC	MFC	IC50	MIC	MFC	IC50	MIC	MFC	IC50	MIC	MFC
Iprodione-carbendazim	310	630	646	315	638	644	357	719	732	469	944	1015	631	1268	1455
Mancozeb	401	795	811	448	874	895	503	995	1012	655	1306	1428	753	1493	1796

The units of chemical fungicides concentrations are presented as milligram per liter (mg/L). \*Inhibitory concentration with 50% inhibitory effect on the fungal growth (mg/L). †Minimum fungicidal concentration (mg/L). ‡Minimum inhibitory concentration (mg/L).

Dwivedi et al., 2006; ) هند (Khan et al., 2019،  
 (Samota and Singh, 2006; Khare et al., 2017  
 برزیل (Pereira et al., 2005) و آفریقای جنوبی  
 (Mangwende et al., 2018) مطابقت دارد. بر اساس  
 نتایج به دست آمده آلودگی طبیعی به قارچ *A. alternata* فقط در توده‌های بذری گشیش جمع‌آوری شده از استان خراسان جنوبی مشاهده شد. به نظر می‌رسد وجود آلودگی در توده‌های بذری خراسان جنوبی به‌ویژه بشرویه به قارچ‌های بذرزاد را می‌توان به حساسیت بالا، شرایط محیطی، تناوب زراعی با گیاهان حساس و همچنین عدم ضد عفونی بذر نسبت داد. با توجه به آنکه توده‌های بذری از نظر ژنتیکی متفاوت می‌باشند، بنابراین بخشی از تفاوت مشاهده شده در شاخص‌های بنيه و جوانه‌زنی مربوط به تنوع ژنتیکی، اختلاط و عدم خلوص ژنتیکی توده‌های بذری است.

نتایج آزمون جوانه‌زنی استاندارد در میان توده‌های بذری خراسان جنوبی با توده‌های بذری سایر استان‌های مورد بررسی نشان داد که اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های جوانه‌زنی و بنيه از جمله درصد جوانه‌زنی، طول ساقچه‌چه و ریشه‌چه، وزن تر و خشک گیاهچه وجود دارد. آلودگی بذر به قارچ‌های بذرزاد به‌ویژه *A. alternata* به عنوان یکی از

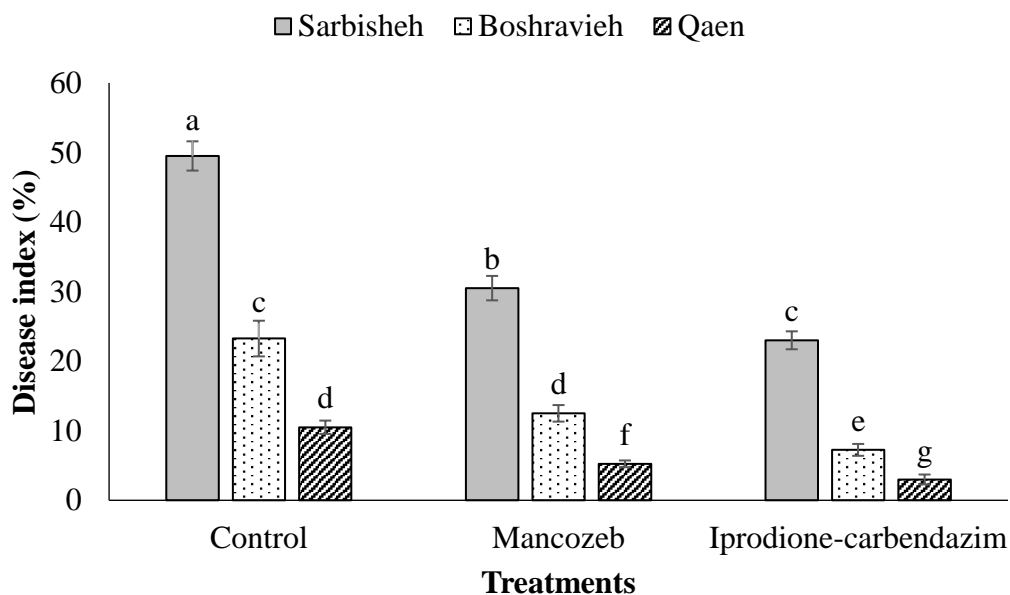
حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار بودند (جدول ۴). نتایج درصد جوانه‌زنی بذر گشیش ضد عفونی شده در آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذر در تیمارهای بذری با ایپرودیون- کاربندازیم و مانکوزب نسبت به تیمار شاهد به ترتیب حدود ۱/۱ و ۱/۰۶ درصد بهبود یافت. نتایج مقایسه آزمون جوانه‌زنی در تیمارهای بذری گشیش نشان داد که تیمار بذری با قارچکش‌های شیمیایی به‌طور قابل توجهی روی شاخص‌های بنيه و جوانه‌زنی از جمله درصد جوانه‌زنی، طول ساقچه‌چه و ریشه‌چه، وزن خشک و تر تأثیر گذاشته و موجب افزایش کیفیت گیاهچه‌ها می‌شوند (جدول ۴).

## بحث

در این پژوهش به بررسی نقش *A. alternata* بذرزاد روی کیفیت و سلامت بذر در توده‌های بومی گشیش و همچنین میزان تأثیر دو قارچکش شیمیایی ایپرودیون- کاربندازیم و مانکوزب در بهبود شاخص‌های بنيه و جوانه‌زنی گشیش پرداخته شد. قارچ *A. alternata* به عنوان قارچ بذرزاد از توده‌های بومی بذر گشیش در استان خراسان جنوبی شناسایی شد که وجود این قارچ همراه با بذر گشیش با گزارش‌های سایر محققان از توده‌های بذری در پاکستان ( Mehdi

سلامت بذر است. بذره‌های دارای درصد بالای جوانه زنی و بنيه قوی‌تر موجب ایجاد گیاهچه‌های عادی با توانایی بالا تحمل تنش‌های زنده و غیرزنده می‌شوند. محققان گزارش کردند که شاخص‌های بنيه و جوانه‌زنی با افزایش آلودگی بذور به قارچ‌های بذرزاد کاهش یافته است (Pant, 2011; Fatima and Khot. 2015; Turner et al., 2020) با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. نتایج نشان داد که در میان توده‌های بذری گشنیز مورد بررسی در شاخص‌های بنيه و جوانه‌زنی اختلاف معنی‌داری وجود دارد. نتایج این پژوهش با مشاهدات سایر محققان مطابقت داد (Singh et al., 2017). همچنین با توجه به نتایج ارزیابی شاخص‌های بنيه و جوانه‌زنی به نظر می‌رسد کیفیت توده‌های بذری کرج، قزوین و اراک مشابه بودند. همچنین آلودگی‌های طبیعی بذور به قارچ‌های بذرزاد به‌طور قابل‌توجهی روی شاخص‌های بنيه و جوانه‌زنی بذر تأثیر گذاشته و موجب کاهش کیفیت بذر به‌ویژه سلامت بذر می‌شوند. قارچ *A. alternata* موجب کاهش جوانه زنی بذر گشنیز و افزایش

عوامل مؤثر در کاهش شاخص‌های جوانه‌زنی و بنيه موجب کاهش کیفیت بذر و گیاهچه‌های حاصل از آنها می‌شود. همچنین سایر پژوهش‌ها نشان داده که آلودگی بذر به قارچ *A. alternata* موجب کاهش درصد جوانه‌زنی، طول ساقچه‌چه و ریشه‌چه گشنیز می‌شود (Pereira et al., 2005; Samota and Singh, 2006). کیفیت بذر گشنیز تحت تأثیر قارچ‌های بذرزاد و همراه بذر به‌ویژه *A. alternata* قرار گرفته و درصد جوانه‌زنی آن کاهش می‌یابد (Mehdi Khan et al., 2019). نتایج این پژوهش نشان داد که هرچه میزان فراوانی قارچ‌های بذرزاد بیماریزا در توده‌های بذری بیشتر باشد تعداد گیاهچه‌های غیرطبیعی (تغییر شکل یافته و بیمار) به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد. محققان گزارش کردند بین میزان وقوع *A. alternata* و درصد گیاهچه‌های غیرطبیعی همبستگی مثبت وجود دارد (Mangwende et al., 2018). وجود گیاهچه‌های کوچک، ضعیف و غیرعادی، نشان‌دهنده ضعیف بودن بنيه گیاهچه است. شاخص بنيه یکی از شاخص‌های تعیین‌کننده کیفیت و



شکل ۲- تأثیر ضدعفونی بذر گشنیز با قارچکش‌های شیمیایی در غلظت ممانعت‌کنندگی با ۵۰ درصد اثر مهارکنندگی روی میانگین شاخص بیماری (میانگین  $\pm$  خطای استاندارد) ناشی از *Alternaria alternata* در توده‌های بذری سریش، بشرویه و قائن

Figure 2. Effect of seed disinfection of coriander with chemical fungicides in inhibitory concentration with 50% inhibitory effect on the disease index (mean  $\pm$  standard error) caused by *Alternaria alternata* in Sarbisheh, Boshra Vieh and Qaen seed populations

جدول ۴- مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه در تیمارهای بذری توده سریشه با قارچکش‌های شیمیایی در غلظت ممانعت‌کنندگی با ۵۰ درصد اثر مهارکنندگی روی رشد *Alternaria alternata*

**Table 4. Means comparison of germination and vigor indices in seed treatments of Sarbishesh population with chemical fungicides in inhibitory concentration with 50% inhibitory effect on *Alternaria alternata* growth**

Treatments	GP	DS	SD	SL	RL	FW	DW	SLVI	SWVI
Control	65.50 <sup>b</sup>	1.00 <sup>a</sup>	1.00 <sup>a</sup>	0.9 <sup>b</sup>	1.0 <sup>b</sup>	0.215 <sup>b</sup>	0.019 <sup>b</sup>	129.40 <sup>b</sup>	1.29 <sup>c</sup>
Mancozeb	69.25 <sup>a</sup>	0.75 <sup>a</sup>	0.25 <sup>b</sup>	1.1 <sup>a</sup>	1.1 <sup>a</sup>	0.223 <sup>a</sup>	0.022 <sup>a</sup>	154.25 <sup>a</sup>	1.54 <sup>b</sup>
Iprodione-carbendazim	72.50 <sup>a</sup>	0.75 <sup>a</sup>	0.25 <sup>b</sup>	1.1 <sup>a</sup>	1.1 <sup>a</sup>	0.227 <sup>a</sup>	0.023 <sup>a</sup>	160.52 <sup>a</sup>	1.63 <sup>a</sup>
LSD (0.05)	2.76	0.99	0.65	0.13	0.04	0.005	0.001	12.76	0.07

GP = Germination percent, DS = the average percentage of deformed seedling, SD = the average percentage of seedling disease, SL = average shoot length (cm), RL = average root length (cm), FW = fresh weight (g), DW = dry weight (g), SLVI = seedling length vigor index and SWVI = seedling weight vigor index. Means within a column indicated by the same letter were not significantly different according to the least significant difference (LSD) test at the level  $p < 0.05$ .

مورد بررسی وجود دارد (Figueiredo-Carvalho et al., 2019; El-Houssaini et al., 2019) که با مشاهدات ما مطابقت دارد. بطور کلی ضدعفونی بذرها با قارچکش‌های شیمیایی یکی از روش‌های مؤثر در مهار بیماری‌های بذرزاد و خاکزاد است. نتایج حاصل از غلظت‌های مؤثر بازدارندگی قارچکش‌های شیمیایی از رشد میسلومی جدایه‌های مختلف بیماریزای *A. alternata* نشان داد که حداقل غلظت مهارکنندگی و کشندگی به ترتیب مربوط به قارچکش‌های ایپرودیون-کاربندازیم و مانکوزب است.

نتایج حاصل از بررسی کارایی ضدعفونی بذر با قارچکش‌های شیمیایی ایپرودیون-کاربندازیم و مانکوزب روی بیماری بذرزاد ناشی از *A. alternata* در گشیش نشان داد که قارچکش ایپرودیون-کاربندازیم در مقایسه با مانکوزب به میزان بیشتری موجب کاهش درصد شاخص بیماری بذرزاد ناشی از *A. alternata* می‌شود. میزان کاهش شاخص بیماری بذرزاد ناشی از *A. alternata* در گشیش توسط قارچکش ایپرودیون-کاربندازیم و مانکوزب به ترتیب به میزان ۵۳/۵ درصد و ۳۸/۴ درصد بود. قارچکش مانکوزب در غلظت ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر موجب کاهش رشد میسلومی *A. alternata* می‌شوند (Mahendra et al., 2014) که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. قارچکش مانکوزب ضمن کاهش رشد میسلومی قارچ *A. alternata*

درصد گیاهچه‌های تغییر شکل یافته و بیمار می‌شود (Mangwende et al., 2018). میان جدایه‌های مختلف تفاوت‌هایی معنی داری در میزان بیماریزایی روی گیاهچه‌های گشیش وجود دارد که این مشاهدات با گزارش سایر محققان مطابقت دارد (Mangwende et al., 2018). پژوهش حاضر نشان داد که جدایه‌های متفاوت از یک گونه، بیماریزایی و قدرت تهاجم متفاوتی دارند. نتایج این پژوهش مشابه با نتایج گزارش شده توسط سایر محققان در برهمکنش *A. alternata* با گیاهان مختلف از جمله زیره سبز (Khaledi et al., 2021) و سیب زمینی (Taheri, 2019) است.

بین میزان بیماریزایی جدایه‌ها و غلظت‌های مؤثر بازدارندگی قارچکش‌های شیمیایی ارتباطی وجود دارد. نتایج نشان داد که میزان غلظت‌های مؤثر بازدارندگی قارچکش‌های شیمیایی روی جدایه‌ای که در مقایسه با سایر جدایه‌های بیماریزای دارای میزان بیماریزایی بیشتری روی گیاهچه‌های گشیش بودند، بالاتر است. به نظر می‌رسد این اختلاف در غلظت‌های بازدارندگی به علت تفاوت در جدایه‌ی بیمارگر *A. alternata* و نوع واکنش جدایه به قارچکش‌های شیمیایی و میزان بیماریزایی آن است. با توجه به نتایج گزارش شده توسط سایر محققان در مورد بیمارگرهای مختلف مشاهده شد که ارتباط قوی بین بیماریزایی بیمارگرهای قارچی و میزان غلظت‌های مؤثر بازدارندگی قارچکش‌ها و حتی ترکیبات بازدارنده

قارچ‌های بذرزاد در توده‌های بذری گشنیز، پیشنهاد می‌گردد از توده‌ی بذری نه‌آوردن برای کشت استفاده شود و توده‌های بذری استان خراسان جنوبی برای کشت در آن مناطق و سایر مناطق توصیه نمی‌گردد. با توجه به آنکه اطلاعات در مورد قارچکشی‌های موجود در بازار برای مهار بیماری‌های بذرزاد گیاهان دارویی از جمله گشنیز بسیار اندک بوده و از سوی دیگر قارچ *A. alternata* از بیمارگرهای مرده‌پرور با دامنه میزبانی وسیع است و همچنین قارچکشی‌های ایروودیون-کاربندازیم و مانکوزب مورد بررسی در این پژوهش موجب مهار کامل این بیماری نگردید، لازم است برنامه جامعی برای مدیریت بیماری ناشی از آن در مزارع اندیشیده شود. بنابراین پیشنهاد می‌گردد ضمن بررسی تأثیر قارچکشی‌های مختلف روی مهار بیماری ناشی از *A. alternata* به این موضوع نیز باید توجه نمود که قارچکشی‌ها روی میزان جوانه زنی بذور چه تأثیری گذاشته و تأثیرات جانبی آنها روی متابولیت‌های ثانویه گشنیز چگونه است. کشت مداوم، عدم رعایت تناوب، ناآگاهی از واکنش توده‌ها به عوامل بیماری‌های بذرزاد و تغییرات آب و هوایی باعث گردیده است تا بیماری‌های بذرزاد به سرعت گسترش یابد (Khaledi and Hassani, 2021). شناسایی قارچ‌های بذرزاد و میزان بیماری‌زایی آنها و همچنین بررسی میزان تأثیر آنها روی شاخص‌های بنيه و جوانه‌زنی می‌تواند در انتخاب راهکارهای مؤثر مدیریتی برای کاهش اثرات مخرب بیماری‌های ناشی از آنها در مزرعه و افزایش میزان تولید و کیفیت محصول مؤثر باشد.

### سپاس‌گزاری

نگارندگان از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال برای حمایت مالی از این پژوهش با شماره پروژه ۹۸۰۸۹۲-۱۲۴-۰۸-۰۸-۰۲۱-۹۸۰۲۴ تشکر و قدرانی می‌نمایند.

منجر به کاهش شدت بیماری ناشی از آن روی سبب زمینی می‌شود (Nasr Esfahani, 2015). قارچکشی ایروودیون-کاربندازیم در غلظت دو در هزار موجب کاهش بیماری ناشی از *A. alternata* در کاکتوس چانه می‌شود (Kim et al., 2017) که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد. نتایج نشان داد پیش تیمار بذر با قارچکشی‌های ایروودیون-کاربندازیم و مانکوزب در غلظت ممانعت‌کنندگی با ۵۰ درصد اثر مهارکنندگی روی رشد قارچ منجر به کاهش بروز بیماری بذرزاد سوختگی آلترناریایی شد. تیمار بذر با قارچکشی تیوفانات متیل موجب کاهش سوختگی گیاهچه کلزا ناشی از *A. alternata* می‌شوند (Soomro et al., 2020). نتایج این پژوهش با مشاهدات سایر محققان که گزارش داده‌اند که در تیمار بذر با قارچکشی شیمیایی میزان درصد جوانه‌زنی، میانگین طول ساقچه و ریشه‌چه به طور قابل توجهی بیشتر از شاهد بود مطابقت دارد (Soomro et al., 2020; Kgatle et al., 2020). تیمار بذر با قارچ کش‌ها ضمن کاهش بیماری‌های بذرزاد موجب افزایش شاخص‌های رشدی و عملکرد می‌شوند (Khanzada et al., 2002). محققان گزارش کردند که تیمار بذر با قارچکشی‌های شیمیایی به ویژه ایروودیون-کاربندازیم و مانکوزب ضمن افزایش درصد جوانه‌زنی موجب کاهش بروز بیماری سوختگی گیاهچه تربچه ناشی از *A. alternata* می‌شود (Islam et al., 2007) که با مشاهدات این پژوهش مطابقت دارد.

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که آلودگی‌های طبیعی بذور به جدایه‌های بیماریزا قارچ *A. alternata* یکی از عواملی است که موجب کاهش کیفیت توده‌های بذری گشنیز می‌شود. با توجه به مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و بنيه و همچنین ارزیابی میزان فراوانی و بیماریزایی

## REFERENCES

Abbasian, A. 2019. Seed lot and seed sampling guideline. Ministry of Jihad-e-Agriculture, Agricultural Research, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Technical Publication Series, 20 pp (In Farsi with English Abstract).

Abd-El-Khair, H., and El-Gamal Nadia, G. 2011. Effects of aqueous extracts of some plant species against *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris* plants. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44: 1-16.

Anonymous. 2017. International Seed Testing Association (ISTA); International Rules for Seed Testing. Proceedings of the international seed testing association. In Bassersdorf. Switzerland: Seed Science and Technology. 333 pp.

Anonymous. 1987. POLO-PC. A user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley CA.

Bart, P.H., and Thomma, J. 2003. *Alternaria* spp. from saprophyte to parasite. Molecular Plant Pathology, 4: 225-236.

Dwivedi, M., Agrawal, K., and Agrawal, M. 2006. Fungi associated with coriander seeds grown in Rajasthan and their phytopathological effects. Journal of Phytopathological Research, 19: 125-129.

El-Houssaini, H.H., Elnabawy, O.M., Nasser, H.A., Elkhatib, W.F. 2019. Correlation between antifungal resistance and virulence factors in *Candida albicans* recovered from vaginal specimens. Microbial Pathogenesis, 128: 13-19.

Fatima, S., and Khot, Y.C. 2015. Studies on fungal population of cumin (*Nigella sativa* L.) from different parts of Marathwada. International Journal of Multidisciplinary Research, 2: 25-31.

Figueiredo-Carvalho, M.H.G., Ramos, L.S., Barbedo, L.S., de Oliveira, J.C.A., Dos Santos, A.L.S., Almeida-Paes, R., and Zancopé-Oliveira, R.M. 2017. Relationship between the antifungal susceptibility profile and the production of virulence-related hydrolytic enzymes in Brazilian clinical strains of *Candida glabrata*. Mediators of Inflammation, <https://doi.org/10.1155/2017/8952878>

Islam, S.S., Rahman, M.H., Hasan, M.J., Ashadusjaman, M., and Khatun, M.M. 2007. Efficacy of fungicidal seed treatment in controlling *Alternaria* spp. in radish seed. International Journal of Sustainable Crop Production, 2: 46-50.

Kgatile, M., Flett, B., Truter, M., and Aveling, T. 2020. Control of *Alternaria* leaf blight caused by *Alternaria alternata* on sunflower using fungicides and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection, 132: 1-7.

Khaledi, N., Dehshiri, A., and Hassani, F. 2021. Effect of seed-borne fungi on seed health of native populations of Iranian cumin (*Cuminum cyminum* L.). Indian Phytopathology, 74: 1-10.

Khaledi, N., and Hassani, F. 2021. Effect of seed-borne *Fusarium* species on constituents of essential oils from seeds of black cumin populations. Journal of Plant Protection Research, 61: 1-14.

Khanzada, K.A., Rajput, M.A., Shah, G.S., Lodhi, A.M., and Mehboob, F. 2002. Effect of seed dressing fungicides for the control of seedborne mycoflora of wheat. Asian Journal of Plant Sciences, 1: 441-444.

Khare, M.N., Tiwari, S.P., and Sharma, Y.K. 2014. Disease problems in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) cultivation and their management for production of quality pathogen free seeds. *International Journal of Seed Spices*, 4: 11-17.

Khare, M.N., Tiwari, S.P., and Sharma, Y.K. 2017. Disease problems in the cultivation of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and their management leading to production of high quality pathogen free seed. *International Journal of Seed Spices*, 7: 1-7.

Kim, E., Lee, H.M. and Kim, Y.H. 2017. Morphogenetic alterations of *Alternaria alternata* exposed to dicarboximide fungicide, iprodione. *Plant Pathology Journal*, 33: 95-100.

Kordalewska, M., Brillowska-Dąbrowska, A., Jagielski, T., and Dworecka-Kaszak, B. 2015. PCR and real-time PCR assays to detect fungi of *Alternaria alternata* species. *Acta Biochimica Polonica*, 62: 707-712.

Mafakheri, S., and Aminian Dehkordi, R. 2019. The response of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) herbs to some nutritional treatments. *Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 35: 834-845.

Mahendra, P., Solanki, V.A., Nathawat, B.D.S., and Jagdish, P. 2014. Antifungal efficacy of bio-agents, botanicals and fungicides for inhibition of *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler causing Black point of Wheat. *Annals of Plant Protection Sciences*, 22: 358-362.

Mangwende, E., Kritzing, Q., Truter, M., and Aveling, T.A.S. 2018. *Alternaria alternata*: A new seed-transmitted disease of coriander in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 152: 409-416.

Mehdi Khan, M.M., Habib, A., Abdullah, A., Manzoor, A., Tahir, Z., Zahid, K., Shabbir, A., Latif, S., and Saqib Mushtaq M. 2019. Seed associated mycoflora of coriander (*Coriandrum sativum* L.) its effect on seed germination and management through seed treatment chemical. *International Journal of Biological Research*, 2: 101-117.

Müller, M.E.H., Steier, I., Köppen, R., Siegel, D., Proske, M., Korn, U., and Koch, M. 2012. Cocultivation of phytopathogenic *Fusarium* and *Alternaria* strains affects fungal growth and mycotoxin production. *Journal of Applied Microbiology*, 113: 874-887.

Nasr Esfahani, M. 2015. Efficacy of iminoctadine tris (WP 40%) Fungicide against Potato Early Blight Disease, *Alternaria solani* (Fr.) Keissler and *A. alternata* Sorauer. *Pesticides in Plan Protection Sciences*, 2: 31-43. (In Farsi with English Abstract)

Pant, R. 2011. Seed mycoflora of coriander and effect of some fungal metabolite on seed germination and seedling growth. *Asian Journal of Experimental Biological Sciences*, 2: 1.127-130.

Pereira, R.S., Muniz, M.F.B., and Nascimento, W.M. 2005. Aspects related to coriander seed quality. *Horticultura Brasileira*, 23: 703-706.

Petit, A.N., Fontaine, F., Vatsa, P., Clément, C., and Vaillant-Gaveau, N. 2012. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. *Photosynthesis Research*, 111: 315-326.

Plodpai, P., Chuenchitt, S., Petcharat, V., Chakthong, S., and Voravuthikunchai, S.P. 2013. Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action. *Crop Protection*, 43: 65-71.

Ramezani, Y., Taheri, P., and Mamarabadi, M. 2019. Identification of *Alternaria* spp. associated with tomato early blight in Iran and investigating some of their virulence factors. *Journal of Plant Pathology*, 101: 647-659.

Sacristan, S., and García-Arenal, F. 2008. The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Molecular Plant Pathology*, 9: 369-384.

Samota, R.K., and Singh, S.D. 2006. Pathogenic potential of seed mycoflora of coriander (*Coriandrum sativum* L.). *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 36: 62-63.

Sharma, Y.K., Choudappa, P.C., and Anwer, M.M. 2013. Efficacy of fungicides for the management of *Alternaria* blight of cumin. *International Journal of Seed Spices*, 3: 48-49.

Shi, Y.X., Wang, Y.Y., Wang, H.J., Chai, A.L., and Li, B.J. 2016. First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot of fennel (*Foeniculum vulgare*) in China. *Plant Disease*, 100: 2173-2173.

Simmons, E.G. 2007. *Alternaria: an identification manual*. CBS, Utrecht, 775 pp.

Singh, P., Mor, V.S., Kumar, S., and Bhuker, A. 2017. Correlation and regression analysis of viability and vigour parameters in coriander (*Coriandrum sativum* L.). *International Journal of Plant & Soil Science*, 20: 1-8.

Soomro, T.A., Ismail, M., Anwar, S.A., Memon, R.M., and Nizamani, Z.A. 2020. Effect of *Alternaria* sp. on seed germination in rapeseed, and its control with seed treatment. *Journal of Cereals and Oilseeds*, 11: 1-6.

Sumanth, G.T., Waghmare, B.M., and Shinde, S.R. 2010. Incidence of mycoflora from the seeds of Indian main spices. *African Journal of Agricultural Research*, 5: 3122-3125.

Taheri, P. 2019. Disease resistance and virulence screen in *Solanum tuberosum-Alternaria tenuissima* interaction: the role of pathogenicity factors. *Euphytica*, 215: 1-10.

Turner, R.E., Ebelhar, M.W., Wilkerson, T., Bellaloui, N., Golden, B.R., Irby, J.T., and Martin, S. 2020. Effects of purple seed stain on seed quality and composition in soybean. *Plants*, 9: 1-10.



© 2021 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).



## The efficiency of chemical fungicides in the improvement of seed quality and control of *Alternaria* leaf spot disease of coriander

N. Khaledi<sup>1\*</sup> and M.H. Assareh<sup>2</sup>

1. **\*Corresponding Author:** Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran (n\_khaledi@areeo.ac.ir)
2. Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 15 July 2021

Accepted: 7 September 2021

### Abstract

#### Background and Objective

*Alternaria* leaf spot disease, with the common agent of *Alternaria alternata*, is one of the most important seed-borne diseases of coriander. The present study aimed to identify seed-borne fungi isolated from native coriander seed populations based on morphological and molecular characteristics. In addition, the efficiency and effectiveness of seed treatment with chemical fungicides on vigor and germination indices, as well as the control of seed-borne diseases were evaluated.

#### Materials and Methods

In order to identify the seed-borne fungi of coriander, seed populations from the fields in South Khorasan, Alborz, Markazi, Qazvin, and Hamedan provinces of Iran were sampled according to the International Rules for Seed Testing. After isolation and purification, fungal isolates were identified and confirmed based on morphological characteristics and species-specific primers. Furthermore, the level of pathogenicity and the aggressiveness of isolates were assessed by pathogenicity test on seedlings. The effectiveness of seed treatment with Iprodione-Carbendazim (Rovral-TS<sup>®</sup>) and Mancozeb (Dithane M-45<sup>®</sup>) fungicides on germination and vigor indices, as well as the rate of disease progression were investigated.

#### Results

A total of eight isolates of *Alternaria alternata* were identified based on morphological and molecular characteristics. The germination and vigor indices varied among seed populations and it seemed that a part of the observed differences was due to infection by seed-borne fungi. The results of the pathogenicity test showed that approximately 62.5% of the isolates were pathogenic and 37.5% were non-pathogenic. Diverse levels of pathogenicity and aggressiveness were observed for various isolates of *A. alternata*. Seed treatment with chemical fungicides had a significant influence on germination and vigor indices. Fungicides did not completely control the seed-borne *Alternaria* leaf spot disease of coriander.

#### Discussion

The findings of the current research demonstrated that the effective inhibitory concentrations of chemical fungicides varied based on the pathogenicity of distinct isolates of *A. alternata*. Disinfection of seeds with Iprodione-Carbendazim fungicide caused a



lower disease index of *A. alternata* on coriander seedlings, compared to Mancozeb. In conclusion, the cultivation of Nahavand seed population out of all the evaluated coriander populations and the disinfection of seeds with Iprodione-Carbendazim fungicide before sowing in all areas suitable for the cultivation of this product are recommended.

**Keywords:** *Germination, Identification, Pathogenicity, Seed-borne, Seed health*

---

Associate editor: R. Mostowfizadeh-Ghلامfarsa (Prof.)

**Citation:** Khaledi, N., & Assareh, M. H. (2021). The efficiency of chemical fungicides in the improvement of seed quality and control of *Alternaria* leaf spot disease of coriander Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 44(3): 119-133. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17129>.