



گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)

جلد ۴۶، شماره ۲، تابستان ۱۴۰۲

doi 10.22055/ppr.2023.43476.1688

شناسایی عوامل قارچی پوسیدگی خشک غده‌های بذری سیب‌زمینی و ارزیابی اثر برخی سنجه‌های شدت بیماری بر پیشرفت بیماری

نیما خالدی^{۱*}، فرشید حسنی^۱ و کبری مسلم‌خانی^۲

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۲۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۲۴

چکیده

بیماری پوسیدگی خشک فوزاریومی یکی از مهمترین بیماری‌های قارچی پس از برداشت سیب‌زمینی است که موجب کاهش عملکرد و کیفیت غده‌های بذری تولیدی می‌شود. هدف از این پژوهش بررسی وضعیت سلامت نمونه‌های بذری جمع آوری شده از مزارع بذری سیب‌زمینی به عوامل بیماری پوسیدگی خشک و همچنین ارزیابی برخی سنجه‌های مؤثر در شدت بیماری به‌ویژه میزان فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی و تولید فوزاریک اسید روی میزان شاخص بیماری و حجم پوسیدگی غده‌های سیب‌زمینی است. به منظور شناسایی گونه‌های *Fusarium* از غده‌های بذری ارقام مختلف سیب‌زمینی تولید شده در مزارع استان‌های اردبیل، چهار محال بختیاری، خراسان رضوی، زنجان، فارس، لرستان، مرکزی و همدان نمونه‌برداری شد. در مجموع، حدود ۱۸ درصد از نمونه‌های غده‌های بذری جمع‌آوری شده از مزارع مختلف در دامنه ۱ تا ۳ درصد آلوده به بیماری پوسیدگی خشک بودند. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی، ۲۶ جدایه متعلق به گونه‌های *F. solani sensu lato* (۱۳ جدایه)، *F. oxysporum* (۸ جدایه) و *F. sambucinum* (۵ جدایه) شناسایی شدند. نتایج نشان داد که حجم پوسیدگی ایجاد شده روی غده‌ها توسط جدایه‌های *Fusarium spp.* تحت تأثیر تولید و یا عدم تولید فوزاریک اسید و سطح فعالیت آنزیم‌های سلولاز و آمیلاز قرار می‌گیرد. یافته‌های این پژوهش دیدگاه‌های جدیدی را درباره وضعیت سلامت غده‌های سیب‌زمینی و تأثیر میزان آنزیم‌های برون‌سلولی و فوزاریک اسید ترشح‌شده توسط جدایه‌های قارچی بر میزان پیشرفت بیماری در غده‌ها ارائه می‌دهد که می‌توانند در بازنگری استاندارد ملی سلامت غده‌های بذری و مدیریت مؤثر بیماری در انبار مورد استفاده قرار گیرند.

کلیدواژه‌ها: آمیلاز، سلامت غده بذری، سلولاز، شدت بیماری، فوزاریک اسید

دبیر تخصصی: دکتر رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا

Citation: Khaleidi, N., Hassani, F. & Moslemkhani, C. (2023). Identification of the causal fungal agents of potato seed tubers dry rot and evaluation of the effect of some disease severity factors on the disease progress. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 46(2), 1-18. <https://doi.org/10.22055/ppr.2023.43476.1688>.

مقدمه

(et al., 2005). در ایران بیشترین فراوانی و خسارت به ترتیب مربوط گونه‌های *F. solani sensu lato* و *F. oxysporum* است که در اکثر انبارهای سیب‌زمینی بذری کشور جداسازی و شناسایی شده است (Sharifi et al., 2009). قارچ عامل بیماری قادر به نفوذ مستقیم به درون غده نبوده، عمدتاً از طریق زخم‌های احتمالی ایجاد شده در زمان برداشت و حمل و نقل آلوده می‌شوند. میزان خسارت سالانه بیماری طی دوره انبارداری به طور متوسط ۶ تا ۲۵ درصد و در برخی موارد تا ۶۰ درصد برآورد شده است (Stefańczyk et al., 2016). با توجه به انتقال قارچ عامل بیماری همراه با غده بذری و خاک، اهمیت بیماری در مزارع به‌ویژه مزارع تولید بذری سیب‌زمینی و کلاس‌های مختلف بذری بیشتر است. کشت غده‌های بذری آلوده موجب پوسیدگی غده‌ها و اندام‌های بذری جدید، عدم سبز شدن و یا ایجاد گیاهچه‌ها ضعیف، کاهش تعداد بوته در واحد سطح و در نتیجه کاهش عملکرد می‌شود (Theron & Holz, 1991). پایش و مهار بیماری در مزارع و انبارهای نگهداری و همچنین ارزیابی سلامت غده‌های بذری نقش مهمی را کاهش اثرات مخرب بیماری و افزایش میزان عملکرد محصول دارد. در حال حاضر استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی از جمله تیابندازول و فلوسیلازول به عنوان مدیریت مؤثر در مهار این بیماری توصیه شده است (Li et al., 2022).

طی فرایند بیماری‌زایی، گونه‌های *Fusarium* از طریق تولید آنزیم‌های برون‌سلولی موجب تخریب ساختار و شکستن پیوندهای آمیلوز و آمیلوپکتین و کاهش میزان نشاسته روی غده سیب‌زمینی می‌شوند. شدت بیماری‌زایی *F. solani sensu lato* روی غده‌های سیب‌زمینی تحت تأثیر میزان فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی تولید شده توسط آن قرار دارد (Olivieri et al., 2004). فوزاریک اسید به عنوان یک قارچ‌زهر غیراختصاصی توسط اکثر گونه‌های *Fusarium* تولید شده و موجب اختلال در فرایند متابولیسمی میزبان می‌شود (Dong et al., 2012). تولید فوزاریک اسید توسط جدایه‌های *F. oxysporum* نقش مهمی در ایجاد پوسیدگی

سیب‌زمینی با نام علمی *Solanum tuberosum* L. گیاهی دولپه‌ای، یک‌ساله و آتوتتراپلوئید از خانواده بادمجانیان (Solanaceae) به عنوان یکی از گیاهان راه‌بردی نقش مهمی را در تأمین امنیت غذایی دارد. براساس آخرین آمار سازمان خواروبار کشاورزی ملل متحد در سال ۲۰۲۱، سطح زیر کشت و میزان تولید جهانی سیب‌زمینی به ترتیب حدود ۱۸/۱ میلیون هکتار و ۳۷۶ میلیون تن بوده است (FAOSTAT, 2023). طبق آمارنامه کشاورزی در سال زراعی ۱۴۰۰-۱۳۹۹ در ایران، سطح زیر کشت این محصول حدود ۱۰۹ هزار هکتار و میزان تولید آن در حدود ۳/۹ میلیون تن برآورد شده است (Ahmadi et al., 2021). استان‌های همدان، اصفهان، فارس، زنجان، اردبیل، لرستان، چهارمحال و بختیاری و خراسان رضوی از جمله مهم‌ترین استان‌های تولیدکننده سیب‌زمینی خوراکی و بذری در کشور هستند (Ahmadi et al., 2021). بیماری پوسیدگی خشک فوزاریومی مهم‌ترین بیماری قارچی پس از برداشت سیب‌زمینی از نظر سطح وقوع و میزان خسارت بیماری است و می‌تواند موجب خسارت قابل توجه اقتصادی در مزرعه و پس از برداشت شود (Stefańczyk et al., 2016; Tiwari et al., 2021).

تاکنون چندین گونه از جنس *Fusarium* از جمله *F. avenaceum* (Fr.: *acuminatum* Ellis & Everh. *F. crookwellense* L. W. Burgess, P. E. (Fr.) Sacc. *F. culmorum* (Wm. G. Nelson & T. A. Toussoun. *F. equiseti* (Corda) Sacc. (Sm.) Sacc. *F. oxysporum* *graminearum* Schwabe. *F. sambucinum* Fuckel. Schlechtend: Fr. *F. semitectum* Berk. *scirpi* Lambotte & Fautrey. *F. solani* (Mart.) Appel. & Wollenw. & Ravenel. *F. sporotrichioides* Emend. Snyder & Hans. *F. tricinctum* (Corda) Sacc. و Sherb. به‌عنوان عوامل پوسیدگی خشک سیب‌زمینی در جهان معرفی شده‌اند (Cullen

ارزیابی بصری غده‌ها

غده‌ها با آب جاری شسته شده و به صورت بصری با چشم غیرمسلح و با کمک با ذره بین و بینی کولر از نظر علائم آلودگی به بیماری پوسیدگی خشک سیب زمینی مورد بررسی قرار گرفتند و درصد وقوع بیماری با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Göre, 2017):

$$100 \times \frac{\text{تعداد غده بیمار}}{\text{تعداد کل غده ارزیابی‌های شده}} = \text{درصد وقوع بیماری}$$

جداسازی و شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی

جدایه‌های قارچی

برای جداسازی عوامل قارچی، از حدفاصل بافت سالم و بیمار قطعاتی به ابعاد ۲×۲ میلی‌متر مربع بریده و با الکل اتیلیک ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه و سپس محلول رقیق شده هیپوکلریت سدیم (حاوی یک درصد کلر فعال) به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. قطعات در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز - آگار (Potato dextrose agar, Merck, Germany) کشت شدند (Erper et al., 2022). شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی بر اساس ویژگی‌های ظاهری ذکر شده در منابع معتبر (Burgess et al., 1994; Leslie & Summerell, 2006; Crous et al., 2021) و کلیدهای شناسایی معتبر (Booth, 1971; Nelson et al., 1983) انجام گرفت. برای استخراج DNA از جدایه‌های قارچ از کیت Genomic DNA isolation kit ساخت شرکت Pishgam Biotech ایران با توجه به شرکت سازنده استفاده شد. برای تأیید جدایه‌های *F. solani* *sensu lato* یا مرکب *F. solani* از آغازگرهای اختصاصی Forward: 5' ATC GGC (TEF-Fs4f/TEF-Fs4r) و Reverse: 3' CAC GTC GAC TCT (TGT TGA TTG TTA GC) که تولید یک قطعه به طول ۶۵۸ جفت باز می‌کند (Hussein et al., 2020)، برای *F. sambucinum* از آغازگرهای اختصاصی Forward: 5' ACA TAC CTT TAT GTT GCC

خشک روی غده‌های ارقام حساس سیب‌زمینی دارد (Venter & Steyn, 1998). بنابراین سنجش و ارزیابی قارچ‌زهرها و آنزیم‌های برون‌سلولی ترشح شده توسط *Fusarium* می‌تواند به عنوان روش مفیدی برای ارزیابی شدت بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گیرد.

با وجود اهمیت اقتصادی غده‌های بذری سیب‌زمینی، اطلاعات ما در مورد عوامل بیماری پوسیدگی خشک فوزاریومی در مزارع و انبارهای نگهداری غده‌های بذری سیب‌زمینی در ایران بسیار محدود است و تاکنون مطالعه‌ای در خصوص تأثیر قارچ‌زهرها و آنزیم‌های برون‌سلولی در فرآیند آلودگی غده‌های سیب‌زمینی توسط قارچ *Fusarium* صورت نگرفته است. بنابراین، هدف از این پژوهش (الف) شناسایی گونه‌های عامل پوسیدگی خشک غده‌های بذری سیب‌زمینی، (ب) بررسی وضعیت سلامت نمونه‌های بذری جمع‌آوری شده از مزارع بذری سیب‌زمینی به عوامل بیماری پوسیدگی خشک فوزاریومی و (ج) ارزیابی ارتباط بین میزان فوزاریک اسید و آنزیم‌های برون‌سلولی ترشح شده با شدت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی است.

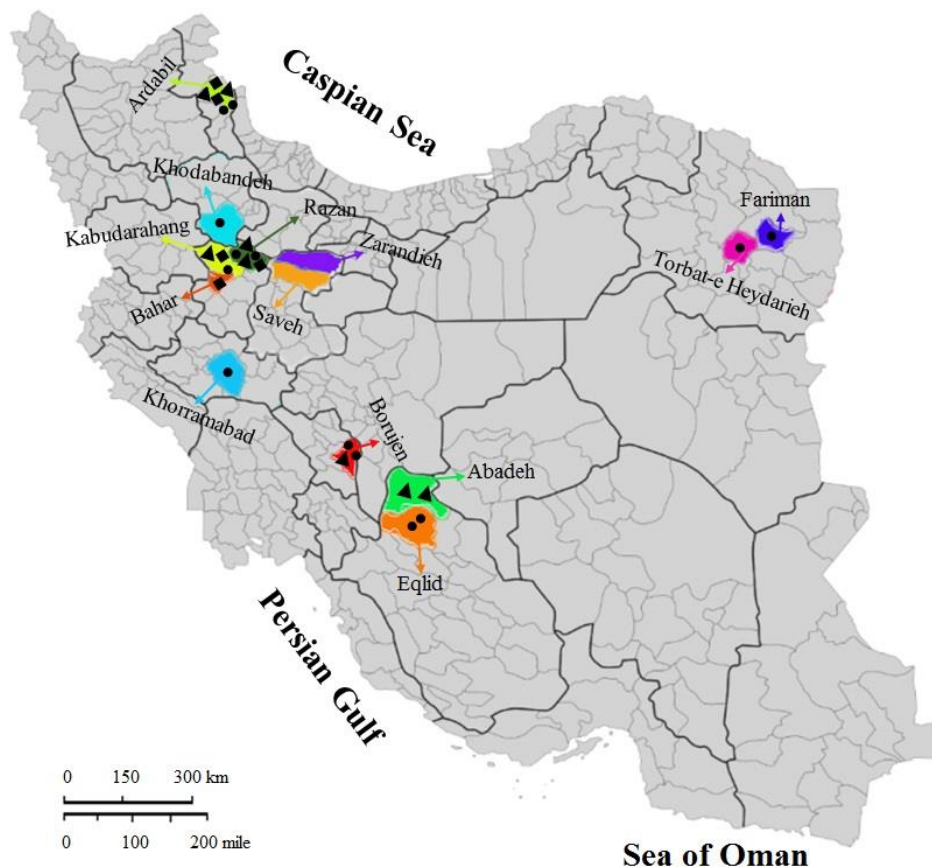
مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

از غده‌های بذری ارقام آگریا، بانبا، جلی، چلنجر، راموس، ساگیتا، سانته، سیفرا، فابولا و کلمبا تولید شده در طی سال‌های زراعی ۱۳۹۹-۱۴۰۰ در استان‌های اردبیل (اردبیل)، چهار محال بختیاری (بروجن)، خراسان رضوی (ترت حیدریه و فریمان)، زنجان (خدابنده)، فارس (آباده و اقلید)، لرستان (خرم آباد)، مرکزی (زرندیه و ساوه) و همدان (رزن، کبودر آهنگ و بهار) بر اساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه ملی سلامت نهال و مواد تکثیری (Hassani et al., 2009) نمونه‌برداری و پس از ثبت مشخصات به آزمایشگاه سلامت مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال منتقل شد (شکل ۱، جدول ۱).

sensu lato به ترتیب در دماهای ۵۸، ۶۰ و ۵۷ درجه سلسیوس و مرحله گسترش به مدت ۶۰ ثانیه در ۷۲ درجه سلسیوس و در نهایت مرحله گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس بود. اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل ۱۲/۵ میکرولیتر 2X PCR Master Mix (Pishgam, Iran)، ۳ میکرولیتر DNA الگو با غلظت تقریبی ۵۰ نانوگرم و یک میکرولیتر از هر آغازگر که در نهایت با افزودن آب دیونیزه سترون به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز 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.

Reverse: 5' GGA GTG TCA GAC و TCG 3' (GAC AGC T 3' که تولید یک قطعه به طول ۳۱۵ جفت باز می‌کند (Mishra et al., 2003) و برای *F. oxysporum* از آغازگرهای اختصاصی CLOX1/CLOX2 (Forward: 5' CAG CAA AGC ATC AGA CCA CTA TAA Reverse: 5' CTT GTC AGT AAC TGG و CTC 3' که تولید یک قطعه به طول ۵۳۴ جفت باز می‌کند (Mulè et al., 2003) استفاده شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز شامل مرحله واسرشت سازی اولیه ۵ دقیقه‌ای در ۹۴ درجه سلسیوس، سپس ۳۵ چرخه در مرحله واسرشت به مدت ۶۰ ثانیه در ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال به مدت ۶۰ ثانیه برای *F. solani* و *F. oxysporum*، *F. sambucinum* و



شکل ۱- مناطق جغرافیایی نمونه برداری شده از مزارع سیب زمینی نزدیک شهرهای ایران. مناطق نمونه برداری روی نقشه با زمینه رنگی و جدایه‌های شناسایی شده با *Fusarium solani sensu lato* (●)، *F. sambucinum* (■) و *F. oxysporum* (▲) مشخص شده است.

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

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی

برای ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها از غده‌های بذری سبب زمینی رقم آگریا با اندازه بذری ۳۰-۲۵ میلی‌متر که فاقد هر گونه آلودگی طبیعی بودند، استفاده شد. سوسپانسیون اسپورها در غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر تنظیم و حفره‌ای به عمق و پهنا ۶ میلی‌متر بر روی غده‌ها ایجاد شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور هر جدایه جداگانه در حفره تزریق و دهانه منفذ به وسیله پارافیلیم بسته شد. غده‌های مربوط به هر تیمار در داخل پاکت‌های کاغذی جداگانه به مدت ۲۱ روز در دمای 25 ± 1 سلسیوس و با شرایط تاریکی نگهداری شدند (Tiwari et al., 2021). غده‌های شاهد با آب مقطر مایه‌زنی شدند. برای ارزیابی بیماری پوسیدگی خشک، غده‌ها در امتداد خط تزریق به دو قسمت تقسیم شد. حجم پوسیدگی نیز با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (Heltoft et al., 2016).

$$f = \frac{1}{3} \pi h r^2 = \text{حجم پوسیدگی}$$

f: نصف پهنا پوسیدگی و h: عمق پوسیدگی

شدت پوسیدگی غده‌ها بر اساس درصد حجم بافت آسیب دیده توسط قارچ در ۶ سطح (۰ = بدون علائم بیماری، ۱ = قهوه‌ای شدن خفیف بافت و تا یک شانزدهم غده آسیب دیده، ۲ = تغییر رنگ بافت و تا یک هشتم غده آسیب دیده، ۳ = تغییر رنگ بافت و تا یک چهارم آسیب دیده، ۴ = تا یک دوم آسیب دیده و ۵ = بیش از نصف غده آسیب دیده) به روش شرح داده‌شده توسط (Nasr-Esfahani et al., 2013) درجه‌بندی و شاخص بیماری‌زایی با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

= درصد شاخص بیماری

$$\frac{0n_0 + 1n_1 + 3n_2 + 6n_3 + 12n_4 + 24n_5}{24N} \times 100$$

n_0 : تعداد غده‌ها با درجه صفر آلودگی، n_1 : تعداد غده‌ها با درجه ۱ آلودگی، n_2 : تعداد غده‌ها با درجه ۲ آلودگی، n_3 : تعداد غده‌ها با درجه ۳ آلودگی، n_4 : تعداد غده‌ها با درجه ۴

آلودگی؛ n_5 : تعداد غده‌ها با درجه ۵ آلودگی؛ N: تعداد کل غده‌ها.

کل آزمون شامل چهار تکرار (۵ غده) برای هر جدایه بود.

سنجش فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی ترشح‌شده و میزان کمی تولید فوزاریک اسید توسط جدایه‌های قارچی

برای استخراج آنزیم‌های آمیلاز و سلولاز توسط جدایه‌های *Fusarium spp.* به ترتیب از محیط کشت‌های مایع حاوی نشاسته و کربوکسی متیل سلولز استفاده و میزان فعالیت آنزیم‌ها به ترتیب در طول موج‌های ۵۴۰ و ۵۵۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت (Khaledi et al., 2017; Balakrishnan et al., 2021). آزمایش برای هر آنزیم چهار تکرار داشت و کل آزمایش دو بار تکرار شد. میزان فوزاریک اسید تولید شده بر اساس روش ارائه شده توسط (Brown et al., 2015) اندازه‌گیری شد. به‌طور خلاصه، از عصاره تخلیص شده هر نمونه ۲۵ میکرولیتر توسط لوپ تزریق با سرنگ مخصوص به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل Agilent 1100 (Agilent Technologies Waldbronn, Germany) آشکارساز آرایه دیودی^۱ و ستون فاز معکوس Zorbax Eclipse C18 (Agilent Technologies®, Germany) به طول ۲۵۰ میلی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر با اندازه قطر ذرات ثابت ۵ میکرومتر تزریق شد. فاز متحرک محلول استونیتربیل: آب حاوی ۰/۵ درصدتری فلورو استیک اسید با سرعت جریان ۰/۵ میلی‌متر بر دقیقه در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و آشکارساز با طول موج ۲۵۴ نانومتر برای ردیابی فوزاریک اسید تنظیم شد. در شرایط فوق زمان بازداری فوزاریک اسید حدود ۵ دقیقه بود. نتایج به دست آمده و اطلاعات مربوط به سطح زیر منحنی نمونه‌ها و زمان ماندگاری ثبت و سپس میزان فوزاریک اسید با توجه به منحنی استاندارد مشخص گردید (Brown et al., 2015).

واکاوی‌های آماری

واکاوی آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف پس از نرمال سازی داده‌ها با تبدیل لگاریتمی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.2) مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی دار^۱ در سطح احتمال پنج درصد ($P \leq 0.05$) مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 استفاده گردید.

نتایج

نتایج حاصل از ارزیابی بصری غده‌ها در نمونه‌های جمع آوری شده از مزارع بذری سیب زمینی در استان‌های اردبیل، چهار محال بختیاری، خراسان رضوی، زنجان، فارس، لرستان، مرکزی و همدان نشان داد که در ۱۸ نمونه از ۱۰۰ بذری مورد بررسی، آلودگی غده‌ها به بیماری پوسیدگی خشک ردیابی شده است (جدول ۱).

بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و میکروسکوپی در مجموع ۲۶ جدایه از نمونه‌های بذری جمع آوری شده از منطقه اردبیل (۶ جدایه)، رزن (۵ جدایه)، کبودر آهنگ (۳ جدایه)، بروجن (۳ جدایه)، آباده (۲ جدایه)، اقلید (۲ جدایه)، تربت حیدریه (۱ جدایه)، فریمان (۱ جدایه)، خدابنده (۱ جدایه)، خرم آباد (۱ جدایه) و بهار (۱ جدایه) جداسازی شدند که متعلق به جنس *Fusarium* بودند (جدول ۱).

فقط در نمونه‌های بذری نمونه برداری شده از منطقه زرنده و ساوه آلودگی مشاهده نشده است (جدول ۱). در مجموع، ۱۳ جدایه متعلق به *F. solani sensu lato*، ۸ جدایه متعلق به *F. oxysporum* و ۵ جدایه متعلق به *F. sambucinum* بودند. مشخصات گونه *F. solani sensu lato* جداسازی شده به شرح زیر است: رنگ پرگنه قارچ از سفید تا کرم مایل به قهوه‌ای بوده، اسپوردوکیوم‌ها به رنگ کرم تشکیل شدند. ماکروکنیدیوم پرگنه قارچ از سفید تا کرم مایل به قهوه‌ای بوده، اسپوردوکیوم‌ها به رنگ کرم تشکیل شدند. ماکروکنیدیوم

نسبتاً کشیده، معمولاً دارای ۵ تا ۷ دیواره عرضی بوده که سلول انتهایی به صورت گرد و سلول پایه ممکن به شکل پا مشخص تا ضعیف بود. کلامیدوسپور به صورت جفتی و یا تکی در وسط ریشه یا انتها با دارای دیواره صاف یا ناصاف بوده تشکیل شدند و میکروکنیدیوم تخم مرغی بدون دیواره تا یک و گاهی ۲ دیواره عرضی بودند. با توجه به نتایج به دست آمده از واکاوی مولکولی با استفاده از آغازگرهای TEF-Fs4f/TEF-Fs4r نشان داد که ۱۳ جدایه‌ی شناسایی شده به روش ریخت‌شناسی به عنوان *F. solani sensu lato* مورد تأیید است (شکل ۲). گونه *F. solani sensu lato* از نمونه‌های غده‌های بذری جمع آوری شده از منطقه اردبیل، خدابنده، کبودر آهنگ، رزن، خرم آباد، بروجن، اقلید، تربت حیدریه و فریمان جداسازی و شناسایی شد. مشخصات گونه *F. oxysporum* جداسازی شده به شرح زیر است: رنگ پرگنه قارچ از سفید تا بنفش کم‌رنگ متغیر بوده و اسپوردوکیوم‌ها به رنگ نارنجی کم رنگ به فراوانی تشکیل گردیدند. ماکروکنیدیوم معمولاً با ۳ دیواره عرضی بوده که سلول انتهایی به صورت منحنی تا مخلوطی و سلول پایه به شکل پا با پاشنه بود. کلامیدوسپورها به فراوانی در ریشه‌ها معمولاً به صورت تکی یا جفتی اما گاهی زنجیری و توده‌ای تشکیل شدند و میکروکنیدیوم معمولاً یک سلولی و تخم مرغی بودند. نتایج به دست آمده از واکاوی مولکولی با استفاده از آغازگرهای CLOX1/CLOX2 نشان داد که ۸ جدایه‌ی شناسایی شده بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی به عنوان گونه‌ی *F. oxysporum* مورد تأیید است (شکل ۲). این گونه از نمونه‌های غده‌های بذری جمع آوری شده از منطقه اردبیل، کبودر آهنگ، رزن، بروجن و آباده جداسازی و شناسایی شد. مشخصات گونه *F. sambucinum* جداسازی شده به شرح زیر است: رنگ پرگنه قارچ از سفید تا نارنجی مایل به خاکستری تیره متغیر بوده و اسپوردوکیوم‌ها به رنگ نارنجی به فراوانی تشکیل شدند. ماکروکنیدیوم معمولاً دارای ۳ تا ۵ دیواره عرضی بوده که سلول انتهایی به صورت پستانک مانند و سلول پایه به شکل پا با پاشنه بود.

جدول ۱- مشخصات نمونه‌های بذری سیب‌زمینی جمع‌آوری شده از استان‌های مختلف ایران

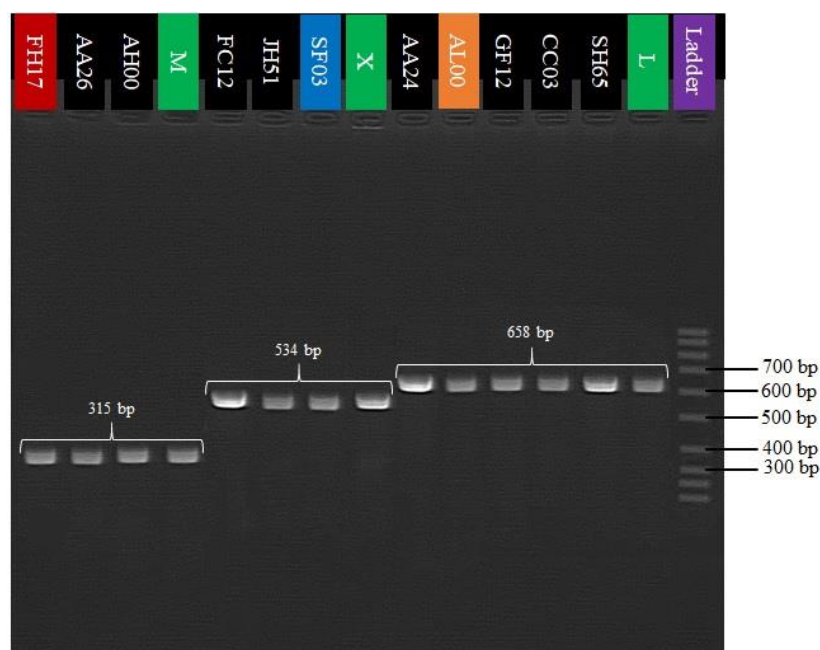
Table 1. Characteristics of potato seed samples collected from different provinces of Iran

Sample code	Cultivar	Sample site [#]	DI*	Sample code	Cultivar	Sample site [#]	DI*
PFA01	Agria	A-A	1	PFF19	Colomba	A-F	0
PFA02	Agria	A-A	0	PFF20	Colomba	A-F	0
PFA03	Agria	A-A	2	PFF21	Colomba	A-F	0
PFA04	Agria	A-A	0	PFL01	Agria	K-L	1
PFA05	Agria	A-A	3	PFL02	Banba	K-L	0
PDC01	Agria	B-CB	0	PFL03	Banba	K-L	0
PDC02	Banba	B-CB	0	PFL04	Jelly	K-L	0
PDC03	Jelly	B-CB	0	PFL05	Sante	K-L	0
PDC04	Jelly	B-CB	0	PFL06	Sifra	K-L	0
PDC05	Jelly	B-CB	0	PFM01	Agria	A-M	0
PDC06	Sifra	B-CB	0	PFM02	Agria	A-M	0
PDC07	Sifra	B-CB	0	PFM03	Banba	A-M	0
PDC08	Fabula	B-CB	2	PFM04	Banba	A-M	0
PDC09	Fabula	B-CB	1	PFM05	Jelly	A-M	0
PDC10	Colomba	B-CB	0	PFM06	Challenger	A-M	0
PDC11	Colomba	B-CB	0	PFH01	Agria	R-H	0
PFR01	Agria	F-RK	1	PFH02	Agria	K-H	0
PFR02	Agria	F-RK	0	PFH03	Agria	B-H	0
PFR03	Agria	F-RK	0	PFH04	Agria	R-H	1
PFR04	Agria	F-RK	0	PFH05	Agria	R-H	2
PFR05	Agria	TH-RK	0	PFH06	Agria	B-H	0
PFR06	Agria	TH-RK	1	PFH07	Jelly	K-H	0
PFR07	Banba	TH-RK	0	PFH08	Jelly	B-H	0
PFR08	Jelly	TH-RK	0	PFH09	Jelly	B-H	0
PFZ01	Agria	K-Z	0	PFH10	Jelly	R-H	0
PFZ02	Agria	K-Z	0	PFH11	Jelly	R-H	0
PFZ03	Agria	K-Z	1	PFH12	Jelly	K-H	0
PFZ04	Challenger	K-Z	0	PFH13	Jelly	B-H	0
PFZ05	Sagitta	K-Z	0	PFH14	Jelly	B-H	0
PFZ06	Sante	K-Z	0	PFH15	Jelly	R-H	0
PFZ07	Fabula	K-Z	0	PFH16	Jelly	B-H	1
PFZ08	Fabula	K-Z	0	PFH17	Jelly	B-H	0
PFF01	Challenger	A-F	0	PFH18	Ramus	R-H	0
PFF02	Challenger	A-F	0	PFH19	Ramus	K-H	0
PFF03	Challenger	A-F	0	PFH20	Ramus	R-H	0
PFF04	Sagitta	A-F	0	PFH21	Ramus	B-H	0
PFF05	Sagitta	A-F	0	PFH22	Ramus	B-H	0
PFF06	Sagitta	A-F	0	PFH23	Ramus	K-H	2
PFF07	Sagitta	E-F	2	PFH24	Sante	R-H	0
PFF08	Sifra	A-F	0	PFH25	Sante	R-H	0
PFF09	Sifra	A-F	1	PFH26	Sante	K-H	0
PFF10	Sifra	E-F	0	PFH27	Sante	B-H	0

Sample code	Cultivar	Sample site [#]	DI*	Sample code	Cultivar	Sample site [#]	DI*
PFF11	Fabula	E-F	0	PFH28	Sante	R-H	0
PFF12	Fabula	E-F	0	PFH29	Sante	R-H	0
PFF13	Fabula	E-F	0	PFH30	Sante	B-H	0
PFF14	Fabula	E-F	0	PFH31	Sante	R-H	2
PFF15	Fabula	A-F	1	PFH32	Sifra	K-H	0
PFF16	Colomba	E-F	0	PFH33	Sifra	R-H	0
PFF17	Colomba	A-F	0	PFH34	Fabula	K-H	1
PFF18	Colomba	A-F	0	PFH35	Fabula	K-H	0

* DI: Disease incidence

[#]A-A: Ardabil-Ardabil, B-CB: Borujen-Chaharmahal & Bakhtiari, F-RK: Fariman-Razavi Khorasan, TH-RK: Torbat-e Heydarieh-Razavi Khorasan, K-Z: Khodabandeh-Zanjan, A-F: Abadeh-Fars, E-F: Eqolid-Fars, K-L: Khorramabad-Lorestan, A-M: Arak-Markazi, R-H: Razan-Hamadan, K-H: Kabudarahang-Hamadan, B-H: Bahar-Hamadan



شکل ۲- شناسایی مولکولی جدایه‌های گونه‌های مختلف *Fusarium* جداسازی شده از غده‌های بذری سیب‌زمینی. نوارها به ترتیب L (شاهد مثبت)، SH65، CC03، GF12، AL00 و AA24 متعلق به *F. solani sensu lato* با آغازگر TEF-Fs4f/TEF-Fs4r؛ X (شاهد مثبت)، SF03، JH51 و FC12 متعلق به *F. oxysporum* با آغازگر CLOX1/CLOX2؛ M (شاهد مثبت)، AH00، AA26، FH17 و متعلق به *F. sambucinum* با آغازگر FSF1/FSR1؛ (نشانه ۱۰۰ جفت بازی).

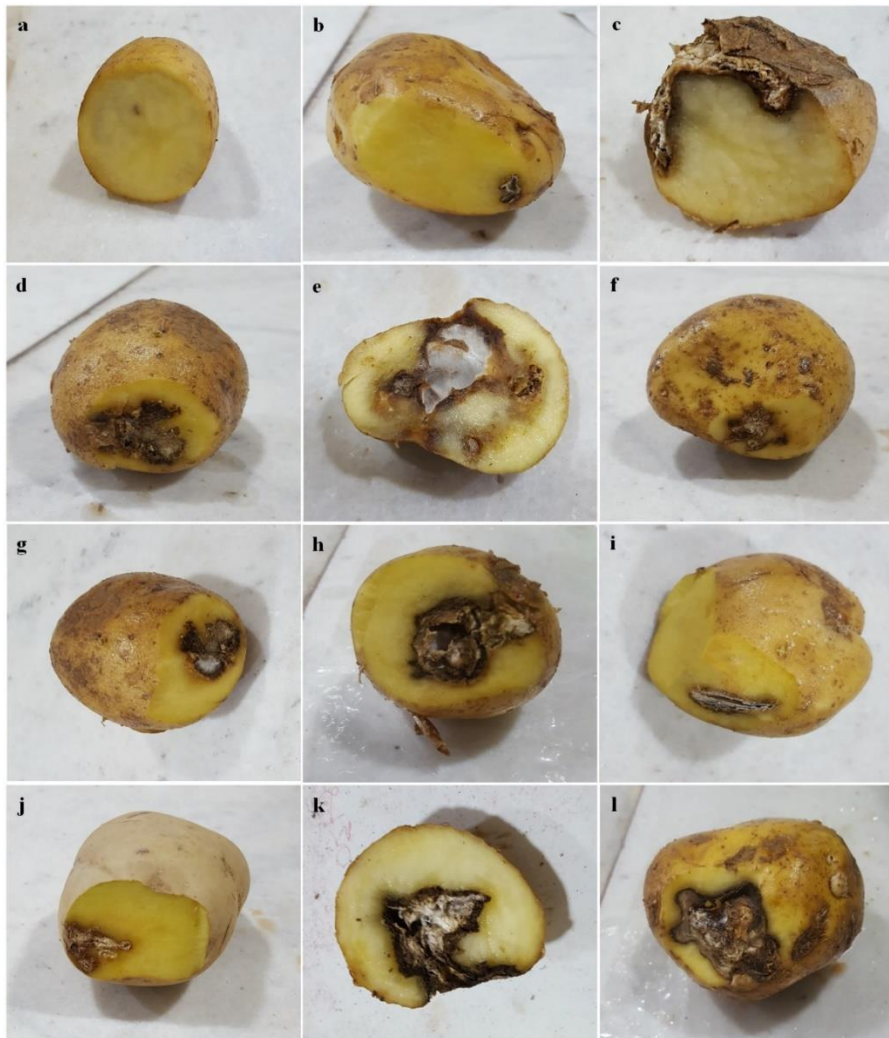
Figure 2. Molecular identification of different isolates of *Fusarium* species isolated from potato seed tubers. The bands L (positive control), SH65, CC03, GF12, AL00 and AA24 belonging to *F. solani sensu lato* with TEF-Fs4f / TEF-Fs4r primers; X (positive control), SF03, JH51 and FC12 belonging to *F. oxysporum* with CLOX1/CLOX2 primers; M (positive control), AH00, AA26, FH17 and belonging to *F. sambucinum* with FSF1/FSR1 primers respectively; (Ladder 100 bp Fermentas).

بدون دیواره تا یک دیواره عرضی بودند. نتایج به دست آمده از واکاوی مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی

کلامیدوسپورها اغلب به صورت زنجیری و توده‌ای و با دیواره صاف تشکیل شدند و میکروکنیدیوم تخم مرغی و

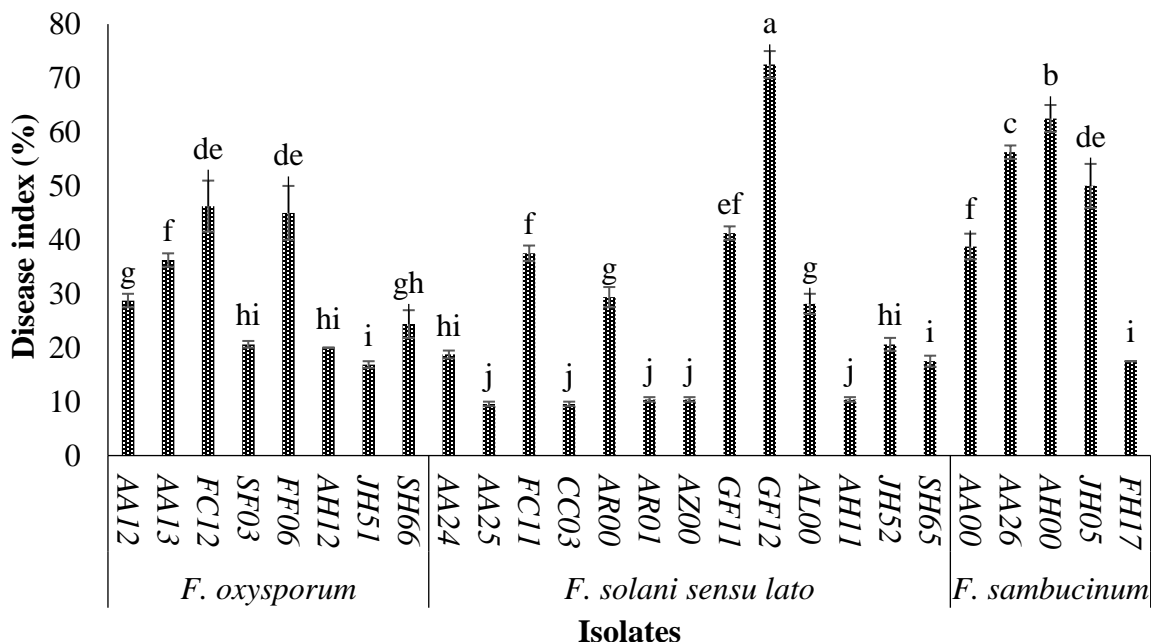
نتایج نشان داد که تمامی جدایه‌ها روی غده سیب زمینی (رقم آگریا) بیماریزا بودند. نتایج آزمون بیماری‌زایی روی غده‌ها نشان داد که میزان شاخص بیماری‌زایی ناشی از جدایه‌های قارچ *F. solani sensu lato* از $0/4 \pm 9/6$ تا $2/5$ از $72/5 \pm$ درصد، ناشی از جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* از $0/6 \pm 16/9$ تا $4/7 \pm 46/2$ درصد و ناشی از جدایه‌های قارچ *F. sambucinum* از $0 \pm 17/5$ تا $2/5 \pm 62/5$ درصد متغیر بود (شکل ۴).

FSF1/FSR1 نشان داد که ۵ جدایه‌ی شناسایی شده به روش ریخت‌شناختی به عنوان *F. sambucinum* مورد تأیید است (شکل ۲). گونه *F. sambucinum* از نمونه‌های غده‌های بذری جمع آوری شده از منطقه اردبیل، بهار، کبودر آهنگ و رزن جداسازی و شناسایی شد. بر اساس نتایج به دست آمده، تفاوت معنی‌داری در شاخص بیماری ناشی از جدایه‌های *Fusarium* شناسایی شده روی غده‌ها مشاهده شد (شکل ۳).



شکل ۳- حجم پوسیدگی خشک ناشی از جدایه‌های مختلف *Fusarium* spp. روی غده‌های سیب‌زمینی. شاهد (a); غده‌های سیب‌زمینی آلوده شده با قارچ *F. solani sensu lato* جدایه‌های AH11 (b)، AL00 (c)، GF11 (d) و GF12 (e); آلوده شده با قارچ *F. oxysporum* جدایه‌های JH51 (f)، AA12 (g)، FC (h) و SF03 (i); آلوده شده با قارچ *F. sambucinum* جدایه‌های FH17 (j)، AH00 (k) و AA26 (l).

Figure 3. The dry rot volume caused by different isolates of *Fusarium* spp. in potato tubers. Control (a); Potato tubers inoculated by *F. solani sensu lato* isolates AH11 (b), AL00 (c), GF11 (d) and GF12 (e); inoculated by *F. oxysporum* isolates JH51 (f), AA12 (g), FC (h) and SF03 (i); inoculated by *F. sambucinum* isolates FH17 (j), AH00 (k) and AA26 (l).



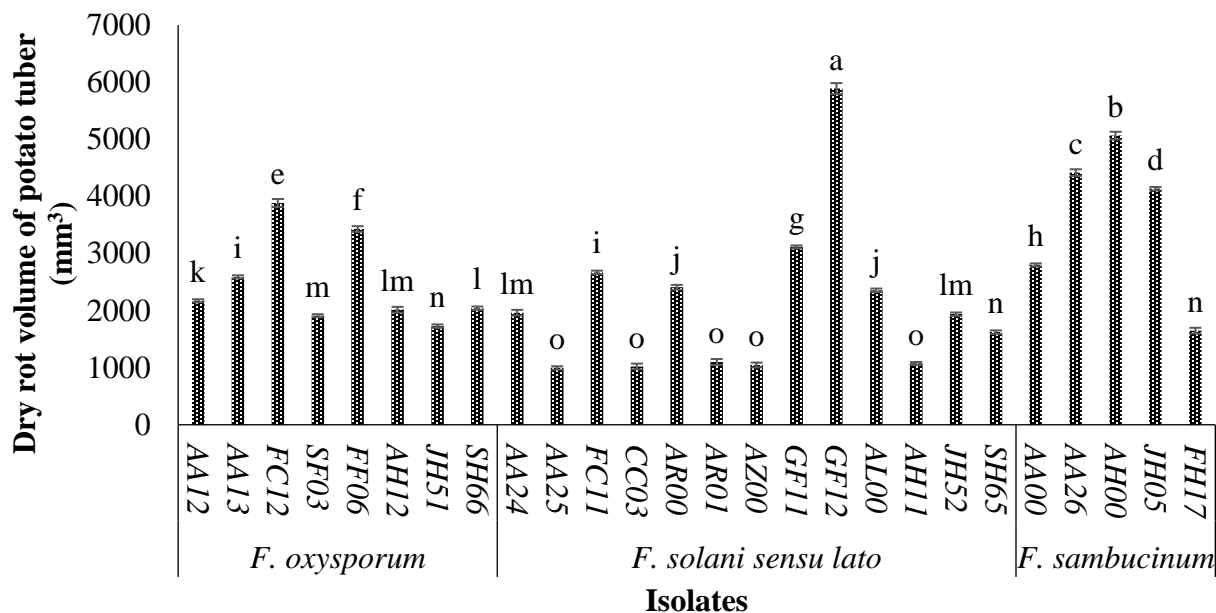
شکل ۴- مقایسه‌ی شاخص بیماری‌زایی (میانگین \pm خطای استاندارد) جدایه‌های مختلف *Fusarium* spp. بر روی غده‌های بذری سیب‌زمینی رقم آگریا، اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با توجه به آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند.

Figure 4. A comparison of disease index (mean \pm standard error) of different isolates of *Fusarium* spp. on potato seed tubers of Agria cultivar; means within a column indicated by the same letters were not significantly different according to the least significant difference (LSD) test at the level $P \leq 0.05$.

فوزاریک اسید در محدوده ۱۵-۲۸ $\mu\text{g kg}^{-1}$ برای *F. sambucinum*، در محدوده ۳۲-۱۴ $\mu\text{g kg}^{-1}$ برای *F. solani sensu lato* و در محدوده ۱۳-۱۹ $\mu\text{g kg}^{-1}$ برای *F. sambucinum* بود (جدول ۲). بررسی فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی ترشح‌شده توسط جدایه‌های *Fusarium* نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به تولید آنزیم‌های آمیلاز و سلولاز بودند. در زمانی که بیشتر جدایه‌ها حداکثر سطح فعالیت آنزیمی را نشان دادند، سطح فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی در میان جدایه‌های *F. solani sensu lato* برای آمیلاز از ۱۰۳/۵ تا ۳۱۷ $\mu\text{g mL}^{-1}$ و سلولاز از ۲۸۶ تا ۶۷۵ $\mu\text{g mL}^{-1}$ ، در میان جدایه‌های *F. oxysporum* برای آمیلاز از ۱۳۵ تا ۲۴۸/۷ $\mu\text{g mL}^{-1}$ و سلولاز از ۳۴۱/۵ تا ۵۱۹/۵ $\mu\text{g mL}^{-1}$ و در میان جدایه‌های *F. sambucinum* برای آمیلاز از ۱۲۹ تا ۲۹۵ $\mu\text{g mL}^{-1}$ و سلولاز از ۳۳۸/۵ تا ۶۲۲/۲ $\mu\text{g mL}^{-1}$ مشاهده شد (جدول ۲).

نتایج حاصل از ارزیابی حجم پوسیدگی ناشی از جدایه‌های گونه‌های مختلف *Fusarium* روی غده‌ها نشان داد که حجم پوسیدگی ناشی از جدایه‌های قارچ *F. solani sensu lato* از ۳۰/۲ \pm ۹۹۴/۳ تا ۹۶/۱ \pm ۵۸۸۷/۵ میلی‌متر مکعب، ناشی از جدایه‌های قارچ *F. oxysporum* از ۳۰/۲ \pm ۱۷۲۷ تا ۶۷/۹ \pm ۳۸۸۵/۷ میلی‌متر مکعب و ناشی از جدایه‌های قارچ *F. sambucinum* از ۵۰/۱ \pm ۱۶۴۸/۵ تا ۶۷/۹ \pm ۵۰۶۳/۲ میلی‌متر مکعب متغیر بود (شکل ۵).

نتایج ارزیابی میزان تولید فوزاریک اسید با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نشان داد که فوزاریک اسید توسط تمامی جدایه‌های *Fusarium* تولید نمی‌شود و فقط توسط ۱۰ جدایه‌ی شناسایی شده تولید می‌شود که ۴ جدایه متعلق به *F. sambucinum*، ۳ جدایه متعلق به *F. oxysporum* و ۳ جدایه آن متعلق به *F. solani sensu lato* هستند. سطح میزان تولید



شکل ۵- مقایسه‌ی حجم پوسیدگی خشک (میانگین \pm خطای استاندارد) ایجاد شده توسط جدایه‌های مختلف *Fusarium spp.* بر روی غده‌های بذری سیب‌زمینی رقم آگرویا، اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با توجه به آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار در سطح ۵ درصد تفاوت معنی‌دار داشتند.

Figure 5. A comparison of dry rot volume (mean \pm standard error) caused by different isolates of *Fusarium spp.* on potato seed tubers of Agria cultivar; means within a column indicated by the same letters were not significantly different according to the least significant difference (LSD) test at the level $P \leq 0.05$.

همچنین به ارزیابی تأثیر میزان فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی و فوزاریک اسید ترشح‌شده توسط جدایه‌های قارچی جداسازی شده روی میزان پیشرفت بیماری روی غده‌های سیب زمینی پرداخته شد. نتایج این پژوهش نشان داد که ۸۲ درصد از نمونه‌های بذری جمع‌آوری شده از مزارع سیب زمینی، به هیچ یک از عوامل پوسیدگی خشک آلوده نبودند. همچنین بیشترین میزان فراوانی جدایه‌های قارچی جداسازی شده به ترتیب مربوط به نمونه‌های بذری استان همدان (۹ جدایه)، اردبیل (۶ جدایه)، فارس (۴ جدایه)، چهار محال بختیاری (۳ جدایه)، خراسان رضوی (۲ جدایه)، زنجان (۱ جدایه) و لرستان (۱ جدایه) بود. در نمونه‌های بذری استان مرکزی هیچ‌گونه آلودگی به بیماری پوسیدگی خشک سیب زمینی مشاهده نشد. براساس مشاهدات ریخت‌شناختی و بررسی‌های مولکولی جدایه‌های شناسایی شده متعلق به گونه‌های *F. solani sensu lato*، *F. oxysporum* و *F. sambucinum* بودند.

نتایج حاصل از مقایسه میزان فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی نشان داد که میزان تولید و زمان رسیدن به حداکثر فعالیت آنزیم‌های سلولاز و آمیلاز برای جدایه‌های مختلف متفاوت بود. سطح فعالیت آنزیم سلولاز ترشح‌شده توسط ۵۴ درصد از جدایه‌های *Fusarium* پس از ۷۲ ساعت و ۴۶ درصد از جدایه‌ها با کمی تأخیر پس از ۹۶ ساعت کشت در محیط مایع به حداکثر میزان قابل اندازه‌گیری رسید این درحالیست که حداکثر سطح فعالیت آنزیم آمیلاز در ۸۵ درصد از جدایه‌ها پس از ۱۴۴ ساعت و ۱۵ درصد از جدایه‌ها با کمی تأخیر پس از ۱۶۸ ساعت کشت در محیط مایع مشاهده شد (شکل ۶).

بحث

در این پژوهش به بررسی گونه‌های فوزاریومی دخیل در بیماری پوسیدگی خشک سیب زمینی، میزان آلودگی غده‌های بذری سیب زمینی به این عوامل بیماری پوسیدگی خشک و

جدول ۲- مشخصات جدایه‌های *Fusarium spp.* جداسازی شده از نمونه‌های بذری سیب‌زمینی بر اساس محل نمونه‌برداری، حداکثر میزان فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی و تولید فوزاریک اسید

Table 2. Characteristics of *Fusarium spp.* isolates recovered from potato seed samples based on sampling site, maximum level of extracellular enzyme activities and fusaric acid production

Isolate code	Sample code	Species	Fusaric acid production <i>in vitro</i> ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Maximum of enzyme activity ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
				Cellulase (72~96 hpc)	Amylase (144~168 hpc)
AA12	PFA03	<i>F. oxysporum</i>	ND	394.0 ± 1.7 m	169.2 ± 1.9 j
AA13	PFA03	<i>F. oxysporum</i>	13	443.7 ± 0.9 j	189.2 ± 2.6 h
FC12	PDC08	<i>F. oxysporum</i>	19	519.5 ± 2.5 e	248.7 ± 2.0 d
SF03	PFF09	<i>F. oxysporum</i>	ND	363.2 ± 2.4 pq	150.0 ± 1.5 mn
FF06	PFF15	<i>F. oxysporum</i>	18	490.5 ± 3.2 f	231.2 ± 1.7 e
AH12	PFH05	<i>F. oxysporum</i>	ND	373.0 ± 1.8 no	155.0 ± 1.6 l
JH51	PFH23	<i>F. oxysporum</i>	ND	341.5 ± 3.2 r	135.0 ± 0.8 o
SH66	PFH31	<i>F. oxysporum</i>	ND	377.0 ± 2.1 n	160.0 ± 0.4 k
AA24	PFA05	<i>F. solani sensu lato</i>	ND	368.0 ± 1.1 op	152.7 ± 0.8 lm
AA25	PFA05	<i>F. solani sensu lato</i>	ND	290.5 ± 2.1 uv	106.2 ± 0.9 s
FC11	PDC08	<i>F. solani sensu lato</i>	14	451.2 ± 2.4 i	195.2 ± 0.5 g
CC03	PDC09	<i>F. solani sensu lato</i>	ND	286.0 ± 1.5 v	103.5 ± 1.2 s
AR00	PFR01	<i>F. solani sensu lato</i>	ND	423.7 ± 2.8 k	186.5 ± 1.5 h
AR01	PFR06	<i>F. solani sensu lato</i>	ND	298.5 ± 1.8 t	117.2 ± 1.1 q
AZ00	PFZ03	<i>F. solani sensu lato</i>	ND	294.7 ± 2.3 tu	113.2 ± 0.6 qr
GF11	PFF07	<i>F. solani sensu lato</i>	16	477.5 ± 3.6 g	209.7 ± 1.6 f
GF12	PFF07	<i>F. solani sensu lato</i>	32	675.0 ± 1.2 a	317.0 ± 1.2 a
AL00	PFL01	<i>F. solani sensu lato</i>	ND	416.0 ± 1.9 l	175.5 ± 1.4 i
AH11	PFH05	<i>F. solani sensu lato</i>	ND	296.2 ± 1.5 tu	111.2 ± 1.4 r
JH52	PFH23	<i>F. solani sensu lato</i>	ND	358.5 ± 3.4 q	146.0 ± 2.1 n
SH65	PFH31	<i>F. solani sensu lato</i>	ND	334.2 ± 1.6 s	125.0 ± 2.5 p
AA00	PFA01	<i>F. sambucinum</i>	15	466.2 ± 0.8 h	199.2 ± 1.7 g
AA26	PFA05	<i>F. sambucinum</i>	24	576.7 ± 2.0 c	291.0 ± 0.9 b
AH00	PFH04	<i>F. sambucinum</i>	28	622.2 ± 4.9 b	295.0 ± 1.1 b
JH05	PFH16	<i>F. sambucinum</i>	22	543.7 ± 1.7 d	256.0 ± 2.1 c
FH17	PFH34	<i>F. sambucinum</i>	ND	338.5 ± 2.5 rs	129.0 ± 1.2 p
LSD (0.05)			0.68	6.71	4.27

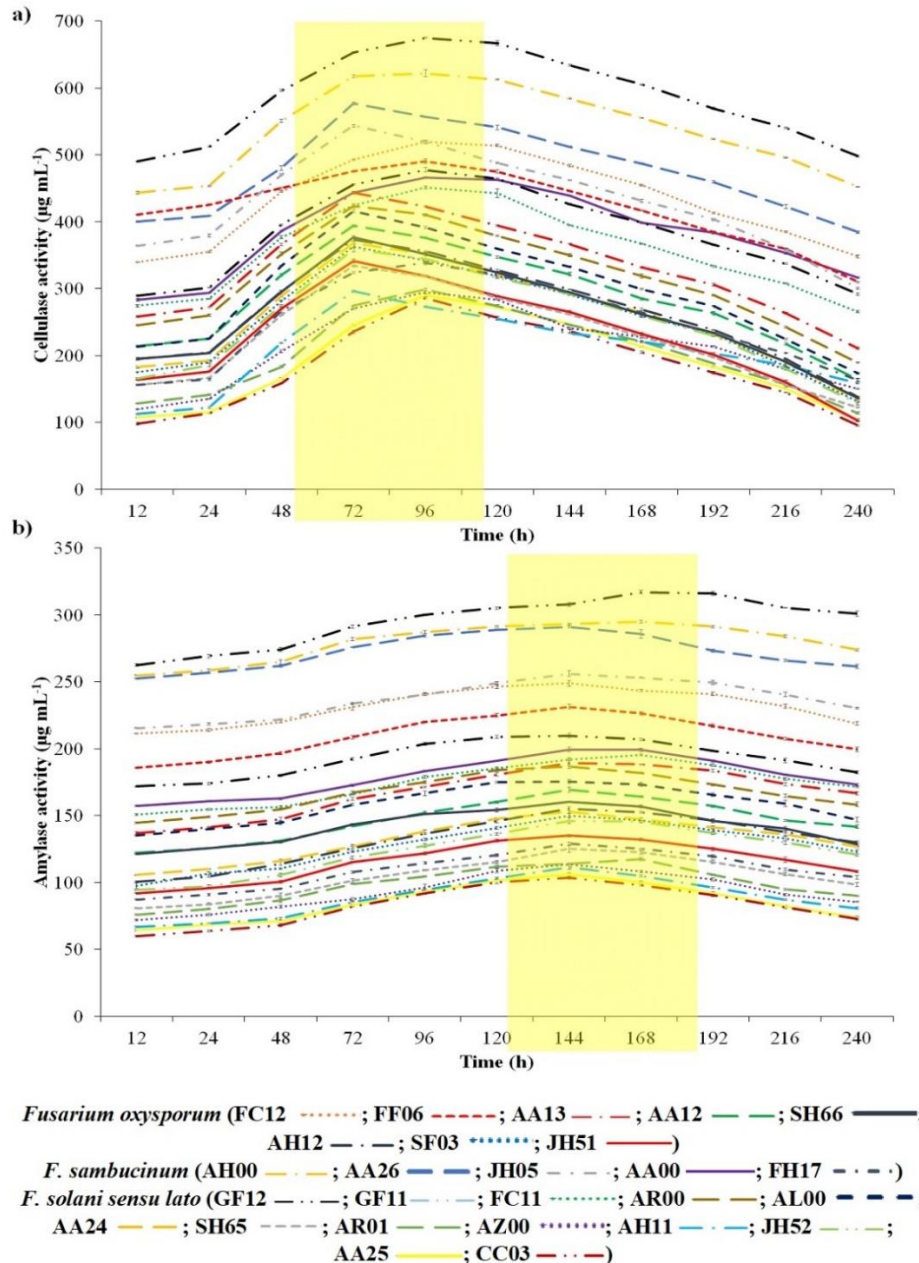
ND: Not detected, hpi: hours post inoculation, Average ± standard error, Means within a column indicated by the same letter were not significantly different according to the least significant difference (LSD) test at $P \leq 0.05$.

Stefańczyk et al. (2017; Aydin & Inal, 2018) و لهستان (Stefańczyk et al., 2016) بر اساس نتایج این پژوهش، بیشترین فراوانی جدایه‌های قارچی شناسایی شده به ترتیب متعلق به

این نتایج با گزارش‌های سایر محققان در قرقیزستان (Erper et al., 2022)، الجزایر (Azil et al., 2021)، هند (Tiwari et al., 2021)، مصر (Hussein et al., 2020)، ترکیه (Göre, 2021)

عوامل پوسیدگی خشک سبب زمینی در استان‌های مهم تولیدکننده این محصول از جمله همدان و اردبیل هستند. این یافته‌ها، نتایج مطالعات سایر محققان (Sharifi et al., 2009; Nasr-Esfahani et al., 2013) را تأیید کرد.

گونه‌های *F. solani sensu lato* (۱۳ جدایه، ۵۰ درصد)، *F. sambucinum* (۵ جدایه، ۸ درصد) و *F. oxysporum* (۱۹ جدایه، ۳۱ درصد) بود. همچنین گونه‌های *F. solani sensu lato* به عنوان مهم‌ترین *F. sambucinum* و *F. oxysporum lato*



شکل ۶- میزان فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی سلولاز (a) و آمیلاز (b) ترشح شده توسط جدایه‌های *Fusarium spp.* در شرایط آزمایشگاهی طی مدت ۲۴۰ ساعت، میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند، آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد.

Figure 6. A comparison of activity levels of extracellular enzymes of cellulase (a) and amylase secreted by *Fusarium spp.* isolates *in vitro* during 240 hours. Data are means ± standard error; the experiment was repeated twice with similar results.

Fusarium نشان داد که تمامی جدایه‌ها قادر به تولید آنزیم‌های آمیلاز بودند و تفاوت معنی داری بین جدایه‌های مختلف قارچ *Fusarium* از نظر میزان تولید آنزیم‌های سلولاز و آمیلاز وجود داشت. این نتایج در تطابق با نتایج پژوهش‌های (Gherbawy et al., 2019) و Hussein et al. (2020) بود. آن‌ها نشان دادند که تفاوت معنی داری در میزان فعالیت آنزیم‌های آمیلاز و سلولاز تولید شده توسط جدایه‌های مختلف گونه‌ی مرکب *F. solani* وجود دارد. در طول مدت بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی در این پژوهش مشاهده شد که حداکثر میزان فعالیت هر آنزیم برای جدایه‌های مختلف، متفاوت است، اما زمان رسیدن به اوج این فعالیت برای اکثر جدایه‌ها مشابه بود. همچنین بر اساس نتایج این پژوهش مشخص شد که فعالیت آنزیم سلولاز در زمان کوتاه‌تری به اوج می‌رسد که یک دلیل احتمالی برای این مشاهده این است که بخش عمده‌ای از دیواره سلولی گیاهان از پلی ساکاریدهایی از جمله سلولز و همی سلولز تشکیل شده است و به دلیل اهمیت فعالیت این آنزیم در تولید الیگوساکاریدهایی است که قارچ تمایل بیشتری به مصرف و استفاده از آن‌ها دارد؛ (Ying et al., 2018) نیز این موضوع را تأیید کرده‌اند.

بررسی‌های انجام شده در این پژوهش نشان داد که احتمالاً بین شدت و شاخص بیماری پوسیدگی خشک ناشی از جدایه‌های گونه‌های مختلف *Fusarium* و میزان فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی ارتباط مستقیمی وجود دارد که اثبات این موضوع انجام آزمون‌های دقیق همبستگی را طلب می‌کند. رابطه بین نوع و میزان فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی، حجم پوسیدگی غده‌ها و شدت بیماری‌زایی ساده نیست اما جدایه‌هایی که سطح بالاتری از فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی را تولید می‌کنند، شدت بیماری‌زایی و حجمی پوسیدگی بیشتری را روی غده‌ها نشان می‌دهند. بر اساس نتایج این پژوهش، حجم پوسیدگی ناشی از جدایه‌هایی که میزان فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی بالاتری داشتند، بیشتر بود که با نتایج

بر اساس نتایج واکاوی‌های آماری این پژوهش مشخص شد که جدایه‌های مربوط به این گونه‌های مختلف *Fusarium* از نظر شدت بیماری‌زایی روی غده‌ی سیب زمینی دارای اختلاف معنی داری هستند که با نتایج پژوهش‌های پیشین در تطابق بود (Gherbawy et al., 2019; Hussein et al., 2021; Azil et al., 2020). یکی از معیارهای سنجش شدت بیماری‌زایی گونه‌های مختلف *Fusarium*، تولید و ترشح آنزیم‌های برون‌سلولی و قارچ‌زهرها توسط آن‌هاست که نقش مهمی در نفوذ و استقرار قارچ در فرایند بیماری‌زایی این بیمارگرها دارد (Zuriegat et al., 2021). فوزاریک اسید از جمله قارچ‌زهرهای مهم فوزاریومی است که میزان تولید آن به صورت مستقیم روی شاخص بیماری پوسیدگی خشک روی غده‌های سیب‌زمینی تأثیر گذار است (Venter & Steyn, 1998; Dong et al., 2012; Dong et al., 2014). شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها با افزایش میزان تولید فوزاریک اسید افزایش می‌یابد (Tan et al., 2011). جدایه‌ی GF12 قارچ *F. solani sensu lato* که دارای بالاترین میزان تولید فوزاریک اسید بود، بیشترین میزان شدت بیماری‌زایی را روی غده‌های بذری سیب زمینی مورد آزمایش داشته است. نتایج این پژوهش نشان داد که حدود ۳۸ درصد از جدایه‌های گونه‌های مختلف *Fusarium* جداسازی شده در این پژوهش، قادر به تولید فوزاریک اسید بودند.

علاوه بر قارچ‌زهرها، آنزیم‌های برون سلولی به‌ویژه در بیمارگرهای مرده‌پرور از جمله *F. solani sensu lato* و نیمه‌زیوآپرور از جمله *F. sambucinum* و *F. oxysporum* که ساختارهای نفوذ تخصص یافته ندارند، نقش مهمی در مراحل نفوذ و گسترش در میزبان دارند (Tiwari et al., 2021). اکثر گونه‌های *Fusarium* دارای ارتباط نیمه‌زیوآپروری با میزبان هستند و بسته به شرایط محیطی و میزبان از مرحله زیوآپروری وارد مرحله مرده‌پروری می‌شوند (Khaledi et al., 2017). بررسی فعالیت آنزیم‌های برون‌سلولی آمیلاز و سلولاز ترشح‌شده توسط جدایه‌های

سیب زمینی مورد بررسی در کشور از نظر میزان آلودگی به عوامل پوسیدگی خشک فوزاریومی در سطح قابل قبولی قرار دارند اما توجه به حفظ و حتی کاهش این میزان آلودگی جهت بهبود سطح کیفیت و سلامت غده‌های بذری تولیدی با مدیریت مناسب در مراحل تهیه غده بذری، کاشت، داشت، برداشت و انبارداری امکان پذیر است. بنابراین استفاده از غده‌های بذری سالم و گواهی شده، ضمن حفظ ارزش زراعی و همچنین تمایز، یکنواختی و پایداری صفات، موجب جلوگیری از گسترش بیماری‌ها و کمک به دستیابی به پتانسیل واقعی عملکرد و بهبود کیفیت محصول می‌شود. شناسایی عوامل پوسیدگی خشک سیب زمینی و همچنین بررسی برخی سنجه‌های مؤثر در بیماری‌زایی به‌ویژه تولید آنزیم‌های برون سلولی و فوزاریک اسید می‌تواند در انتخاب راه کارهای مؤثر مدیریتی برای کاهش اثرات مخرب بیماری و افزایش میزان تولید و کیفیت غده‌های بذری تولیدی مفید باشد. یافته‌های این پژوهش دیدگاه‌های جدیدی را درباره وضعیت سلامت غده‌های بذری سیب زمینی در طبقات بذری پایه در ایران از نظر آلودگی به بیماری پوسیدگی خشک و همچنین بررسی برخی از سازوکارهای دخیل در بیماری‌زایی از جمله میزان آنزیم‌های برون سلولی و فوزاریک اسید ترشح شده توسط جدایه‌های گونه‌های مختلف *Fusarium* بر میزان پیشرفت بیماری در غده‌ها ارائه می‌دهد که می‌تواند در بازنگری استاندارد ملی سلامت غده‌های بذری و مدیریت مؤثر بیماری در انبار مورد استفاده قرار گیرند.

سپاس‌گزاری

نگارندگان از مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال برای حمایت مالی از این پژوهش با شماره پروژه ۰۱۰۸۶۸-۰۱۰-۰۸-۰۸-۲ تشکر و قدرانی می‌نمایند.

Tiwari et al. (2021) مطابقت دارد. با مقایسه‌ی فعالیت آنزیم‌های برون سلولی و شدت بیماری‌زایی مشخص شد که آنزیم سلولاز در مقایسه با آمیلاز در مرحله‌ی اولیه نفوذ، تأثیر بیشتری داشته اما در مرحله‌ی پیشرفت بیماری تأثیر توأم هر دو آنزیم سلولاز و آمیلاز موجب پیشرفت بیماری پوسیدگی خشک روی غده‌ها و افزایش حجم پوسیدگی می‌شود.

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان داد که آلودگی غده‌های بذری سیب زمینی به عوامل پوسیدگی خشک موجب کاهش کیفیت و سلامت غده‌های بذری و احتمالاً گیاهچه‌های حاصل از آن و در نتیجه کاهش عملکرد می‌شود. بررسی‌های انجام شده در این پژوهش نشان داد که در گونه‌های مختلف *Fusarium*، جدایه‌هایی که میزان بالاتری آنزیم‌های برون سلولی و فوزاریک اسید را تولید می‌کنند شدت بیماری‌زایی قابل توجهی در مقایسه با سایر جدایه‌ها دارند. بنابراین، به نظر می‌رسد ارتباطی بین میزان تولید و یا عدم تولید فوزاریک اسید و سطح فعالیت آنزیم‌های برون سلولی به‌ویژه سلولز و آمیلاز با شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها و به تبع آن حجم پوسیدگی ایجاد شده وجود داشته باشد، البته باید تأثیر احتمالی سایر عوامل از جمله سایر قارچ‌زهرها و آنزیم‌های برون سلولی را که در این پژوهش مورد ارزیابی قرار نگرفته است، نیز مد نظر قرار داد. عوامل اصلی که باعث پوسیدگی خشک روی غده‌های بذری سیب زمینی می‌شوند بسته به مکان و شرایط آب و هوایی متفاوت هستند، اما ممکن است در طول زمان، به ویژه با تغییر شرایط آب و هوایی، تغییر کنند. با توجه به دامنه میزبانی وسیع گونه‌های مختلف *Fusarium* و انتقال بیماری از مزرعه به انبار و بالعکس، ارزیابی وضعیت غده‌های بذری ارقام مختلف سیب زمینی در تمامی کلاس‌های بذری از نظر آلودگی به پوسیدگی خشک فوزاریومی حائز اهمیت است. اگرچه وضعیت مزارع و انبارهای نگهداری غده‌های بذری

REFERENCES

Ahmadi, K., Ebadzadeh, H. R., Hatami, F., Mohammadnia-Afroz, S., Esfandiarpour, E., & Abbasi Taleghani, R. (2021). *Agricultural statistics*. Ministry of Agriculture-Jahad.

- Aydin, M., & Inal, B. (2018). Comparative susceptibility of some commercial potato cultivars to *Fusarium sambucinum* and *F. solani* isolates causing tuber dry rot. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16, 4879–4892. https://doi.org/10.15666/aeer/1604_48794892
- Azil, N., Stefańczyk, E., Sobkowiak, S., Chihat, S., Bouregghda, H., & Śliwka, J. (2021). Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with tuber dry rot and wilt of potato in Algeria. *European Journal of Plant Pathology*, 159, 495–509. <https://doi.org/10.1007/s10658-020-02177-5>
- Balakrishnan, M., Jeevarathinam, G., Kumar, S. K. S., Muniraj, I., & Uthandi, S. (2021). Optimization and scale-up of α -amylase production by *Aspergillus oryzae* using solid-state fermentation of edible oil cakes. *BMC Biotechnology*, 21, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12896-021-00686-7>
- Booth, C. (1971). *The genus Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. CAB International; Kew, Surrey, England.
- Brown, D. W., Lee, S. H., Kim, L. H., Ryu, J. G., Lee, S., Seo, Y., Kim, Y. H., Busman, M., Yun, S. H., Proctor, R. H., & Lee, T. (2015). Identification of a 12-gene fusaric acid biosynthetic gene cluster in *Fusarium* through comparative and functional genomics. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28, 319–332. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-14-0264-R>
- Burgess, L. W., Summerell, B. A., Bullock, S., Gott, K. P., & Backhouse, D. (1994). *Laboratory manual for fusarium research* (3rd ed.). Fusarium Research Laboratory, Dept. Of Crop Science, University Of Sydney and Rooyal Botanic Gardens, Sydney, Australia.
- Crous, P., Lombard, L., Sandoval-Denis, M., Seifert, K., Schroers, H., Chaverri, P., Gené, J., Guarro, J., Hirooka, Y., Bensch, K., Kema, G., Lamprecht, S., Cai, L., Rossmann, A., Stadler, M., Summerbell, R., Taylor, J., Ploch, S., Visagie, C., Yilmaz, N., ... & Thines M. (2021). *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology*, 98, 1–184. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116>
- Cullen, D. W., Toth, I. K., Pitkin, Y., Boonham, N., Walsh, K., Barker, I., & Lees, A. K. (2005). Use of quantitative molecular diagnostic assays to investigate *Fusarium* dry rot in potato stocks and soil. *Phytopathology*, 95, 1462–1471. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-1462>
- Dong, X., Xiong, Y., Ling, N., Shen, Q., & Guo, S. (2014). Fusaric acid accelerates the senescence of leaf in banana when infected by *Fusarium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30, 1399–1408. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1564-1>
- Dong, X., Ling, N., Wang, M., Shen, Q., & Guo, S. (2012). Fusaric acid is a crucial factor in the disturbance of leaf water imbalance in *Fusarium*-infected banana plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.08.004>
- Erper, I., Alkan, M., Zholdoshbekova, S., Turkkan, M., Yildirim, E., & Özer, G. (2022). First report of dry rot of potato caused by *Fusarium sambucinum* in Kyrgyzstan. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129, 189–191. <https://doi.org/10.1007/s41348-021-00505-3>
- FAOSTAT. (2023, June 05). *Food and agriculture data*. <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCinfo>

- Gherbawy, Y. A., Hussein, M. A., El-Dawy, E. G. A., Hassany, N. A., & Alamri, S. A. (2019). Identification of *Fusarium* spp. associated with potato tubers in Upper Egypt by morphological and molecular characters. *Asian Journal of Biochemistry, Genetics and Molecular Biology*, 2, 1–14. <https://doi.org/10.9734/ajbgmb/2019/v2i330062>
- Göre, M. E. (2017). Fungal seedborne pathogens infecting potato seed tubers from Turkey, 2011–2014. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 124, 539–551. <https://doi.org/10.1007/s41348-017-0091-y>
- Hassani, F., Alipour, D., & Darvishi, B. (2009). *Technical guidelines for the control and certification of potato seed farms*. Seed and Plant Certification and Registration Institute.
- Heltoft, P., Brierley, J. L., Lees, A. K., Sullivan, L., Lynott, J., & Hermansen, A. (2016). The relationship between soil inoculum and the development of Fusarium dry rot in potato cultivars Asterix and Saturna. *European Journal of Plant Pathology*, 146, 711–714. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0946-2>
- Hussein, M. A., Gherbawy, Y., & El-Dawy, E. G. A. (2020). Characterization, pathogenicity and enzymatic profile of *Fusarium solani* associated with potato tubers in Upper Egypt. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 53, 495–508. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1761223>
- Khaledi, N., Taheri P., & Falahati-Rastegar, M. (2017). Identification, virulence factors characterization and analysis virulence together with aggressiveness of *Fusarium* spp., causing wheat head blight in Iran. *European Journal of Plant Pathology*, 147, 897–918. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1059-7>
- Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Ames, Blackwell Publishing Professional.
- Li, Y., Xia, X., Zhao, Q., & Dong, P. (2022). The biocontrol of potato dry rot by microorganisms and bioactive substances: A review. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 18, 1005–1016. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101919>
- Mishra, P. K., Fox, R. T. V., & Culham, A. (2003). Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic Fusaria. *FEMS Microbiology Letters*, 218, 329–332. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2003.tb11537.x>
- Mulè, G., Susca, A., Stea, G., & Moretti, A. (2003). Specific detection of the toxigenic species *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* from Asparagus plants using primers based on calmodulin gene sequences. *FEMS Microbiology Letters*, 230, 235–240. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00926-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00926-1)
- Nasr-Esfahani, M., Alizadeh, G., & Ramazani, S. (2013). Genetical diversity of Fusaria dry rot species of potato in disease severity. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47, 312–323. <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.809225>
- Nelson, P. E., Toussoun, T. A., & Marasas, W. F. O. (1983). *Fusarium species: an illustrated manual for identification*. Pennsylvania State University Press, University Park, Pennsylvania, USA.

Olivieri, F. P., Maldonado, S., Tonon, C. V., & Casalongue, C. A. (2004). Hydrolytic activities of *Fusarium solani* and *Fusarium solani* f. sp. *eumartii* associated with the infection process of potato tubers. *Journal of Phytopathology*, 1526, 337–344. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2004.00851.x>

Sharifi, K., Zare, S., Zamanizadeh, H., & Arjmandian, A. (2009). *Fusarium* species causing dry rot of potatoes in Ardabil, Tehran and Hamedan Provinces. *Journal of Plant Pests and Diseases*, 76, 93–113.

Stefańczyk, E., Sobkowiak, S., Brylińska, M., & Śliwka, J. (2016). Diversity of *Fusarium* spp. associated with dry rot of potato tubers in Poland. *European Journal of Plant Pathology*, 145, 871–884. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-0875-0>

Theron, D. J., Holz, G. (1991). Predication of potato dry rot based on the presence of *Fusarium* in soil adhering to tuber at harvest. *Plant Disease*, 75, 126–30. <https://doi.org/10.1094/PD-75-0126>

Tiwari, R. K., Bashyal, B.M., Shanmugam, V., Lal, M. K., Kumar, R., Sharma, S., Gaikwad, V. K., Singh, B., & Aggarwal, R. (2021). Impact of *Fusarium* dry rot on physicochemical attributes of potato tubers during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, 181, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2021.111638>

Venter, S. L. & Steyn, P. J. (1998). Correlation between fusaric acid production and virulence of isolates of *Fusarium oxysporum* that cause potato dry rot in South Africa. *Potato Research*, 41, 289–294. <https://doi.org/10.1007/BF02358198>

Ying, C., Yongqing, X., Yao, F., Xiuyu, L., Fumeng, H., Yingqi, H., Zhe, F., & Fenglan, L. (2018). Characteristics of cell wall degradation enzyme produced by main pathogenic *Fusarium* spp. in potato dry rot. *Crops*, 34, 154–160. <https://doi.org/10.16035/j.issn.1001-7283.2018.04.026>

Zuriegat, Q., Zheng, Y., Liu, H., Wang, Z., Yun, Y. (2021). Current progress on pathogenicity-related transcription factors in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 22, 882–895. <https://doi.org/10.1111/mpp.13068>



© 2023 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/>).



Identification of the causal fungal agents of potato seed tubers dry rot and evaluation of the effect of some disease severity factors on the disease progress

N. Khaledi^{1*}, F. Hassani¹, C. Moslemkhani²

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. Associate professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 13 April 2023

Accepted: 19 June 2023

Abstract

Background and Objective

Fusarium dry rot is one of potatoes' most significant postharvest fungal diseases, reducing crop yield and seed tuber quality. Utilizing certified seed tubers treated with chemical fungicides is the simplest and most cost-effective method for preventing dry rot disease damage to potatoes. Monitoring for diseases transmitted by tubers enhances the quality of seed tubers produced and reduces the risk of disease establishment and soil contamination. This study aimed to identify the causal fungal agents of potato seed tubers dry rot, determine the susceptibility of seed samples from potato seed farms to *Fusarium* dry rot agents, as well as to evaluate some of the effective factors in disease severity, particularly the levels of extracellular enzyme activity and fusaric acid production on the disease index and dry rot volume of potato tubers.

Materials and Methods

To identify *Fusarium* species responsible for dry rot disease in the seed tubers of Agria, Banba, Jelly, Challenger, Ramus, Sagitta, Sante, Sifra, Fabula, and Colomba cultivars of potato grown in Ardabil (Ardabil), Chaharmahal & Bakhtiari (Borujen), Razavi Khorasan (Fariman and Torbat-e Heydarieh), Zanzan (Khodabandeh), Fars (Abadeh and Eqlid), Lorestan (Khorramabad), Markazi (Arak) and Hamedan (Razan, Kabudarahang, and Bahar) provinces were sampled according to the standard guidelines of the National Seedling Health and Propagation Materials Laboratory. The pathogenicity test was carried out on artificially inoculated potato tubers cv. Agria for determining the volume of dry rot caused by *Fusarium* isolates. Furthermore, spectrophotometry and high-performance liquid chromatography (HPLC) methods were used to evaluate *in vitro* activities of amylase and cellulase, as well as fusaric acid production.

Results

The results indicated that approximately 18% of the seed tubers samples collected from different fields were infected with *Fusarium* dry rot disease in the 1 to 3% range. A total of 26 isolates were identified based on morphological and molecular characteristics belonging to *F. solani sensu lato* (13 isolates, 11%), *F. oxysporum* (8 isolates, 7%), and *F. sambucinum* (5 isolates, 5%).

Analyzing the activity of extracellular enzymes revealed that all recovered *Fusarium* isolates were capable of producing amylase and cellulase enzymes but at varying levels. The maximum amount of extracellular enzymes produced by *Fusarium* spp. isolates ranged from 286 to 675 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for cellulase and from 103.5 to 317 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for amylase. According to the results, cellulase peaked sooner than amylase, but both enzymes contributed to the development of dry rot in potato tubers. The results revealed that approximately 38% of the isolates produced fusaric acid in the 13-32 $\mu\text{g kg}^{-1}$ range. Moreover, the disease index level and the volume of dry rot caused by different *Fusarium* species isolates on potato tubers varied.

Discussion

It appears that the amount of dry rot caused by *Fusarium* spp. isolates on potato tubers are affected by the production of fusaric acid and the activity levels of cellulose and amylase. This research provides new insights into the health status of potato seed tubers, the predominant *Fusarium* species causing dry rot disease, and the effect of the level of extracellular enzymes and fusaric acid secreted by fungal isolates on the disease progress in potato tubers, which can be applied to the revision of the national standard for seed tuber health and effective disease management during storage. The dry rot disease and its detrimental impact on tubers significantly threaten the official seed tubers certification system, production, and storage procedures. The current study is the first report on identifying the *Fusarium* dry rot disease agents from potato seed tubers in Iran and investigating the relationship between the disease severity of isolates and their extracellular enzyme activity, and fusaric acid production.

Keywords: Amylase, Cellulase, Disease severity, Fusaric acid, Seed tuber health

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

Citation: Khaledi, N., Hassani, F. & Moslemkhani, C. (2023). Identification of the causal fungal agents of potato seed tubers dry rot and evaluation of the effect of some disease severity factors on the disease progress. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 46(2), 1-18. <https://doi.org/10.22055/ppr.2023.43476.1688>.