نشریه پژوهش‌های زعفران (دو فصلنامه)
جلد دهم، شماره دوم، پاییز و زمستان ۱۴۰۱
شماره صفحه: ۲۹۴-۲۸۵
http://dx.doi.org/10.22077/JSR.2022.5616.1195

مقاله پژوهشی:

اتیولوژی پوسیدگی بنه‌ی زعفران در شهرستان خرم‌آباد

سید حسین وفائی[1*]، الهام درویشیان[2]
۱- استادیار، گروه گیاهپزشکی، واحد خرم آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم آباد، ایران.
۲- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، واحد خرم آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، خرم آباد، ایران.
*نویسنده مسئول: *Email: vafaei_h1353@yahoo.com*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۶/۱۳؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۱۹

چکیده
زعفران (*Crocus sativus* L.) گیاهی چند ساله و از مهمترین محصولات زراعی است. زعفران یک چاشنی ارزشمند است و به دلیل کاربردهای دارویی و پزشکی فراوان، تقاضا برای مصرف آن افزایش یافته است. تنش‌های زیستی از چالش‌های کشت زعفران هستند و پوسیدگی بنه به عنوان تنشی زیستی، یکی از مخرب‌ترین بیماری‌های بخش‌های زیرزمینی است. عوامل بیماری‌زای مختلفی از جمله قارچ‌ها بر رشد بنه تأثیر می‌گذارند و شناسایی این قارچ‌ها در کشت زعفران مهم است. مطالعه حاضر به منظور شناسایی قارچ‌های همراه بنه‌ی زعفران در شهرستان خرم‌آباد و بررسی بیماریزایی آنها اجرا گردید. بدین منظور، بنه‌های زعفران دارای علایم پوسیدگی از مناطق مختلف خرم‌آباد (۱۰ منطقه) در استان لرستان جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی قارچ‌ها با استفاده از محیط کشت جامد سیب‌زمینی و دکستروز انجام گرفت. پس از تهیه کشت خالص جدایه‌ها، مشخصات ریخت‌شناسی و میکروسکوپی اسپورها و سایر اندام‌های زایشی قارچ‌ها روی محیط‌های کشت برگ میخک آگار و سیب زمینی هویج آگار بررسی گردید. آزمون اثبات بیماریزایی جدایه‌های قارچ‌ها در شرایط گلخانه روی بنه‌های زعفران و به روش غوطه‌ور کردن در سوسپانسیون اسپور اجرا گردید. در مجموع ۵۸ جدایه جمع‌آوری و گونه‌های *Alternaria alternata*، *Fusarium solani*، *F. acuminatum* و *F. oxysporum* جداسازی و بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی شناسایی شدند. گونه‌ی *A. alternata* با ۲۵ جدایه و گونه‌ی *F. acuminatum* با ۴ جدایه به ترتیب بیشترین و کمترین فراوانی را داشتند. بر اساس آزمون بیماری‌زایی در شرایط گلخانه، *F. oxysporum* تهاجمی‌ترین و *A. alternata* ضعیف‌ترین گونه از نظر بیماری‌زایی بودند. گزارش قبلی از وقوع *F. acuminatum* و *F. solani* بر روی بنه زعفران از جهان و ایران وجود نداشت و به نظر میرسد که این اولین گزارش از بیماریزایی گونه‌ی *F. acuminatum* روی بنه‌ی زعفران در دنیا باشد.

واژه‌های کلیدی: آلترناریا، بیماریزایی، فوزاریوم، محیط کشت سیب زمینی- دکستروز-آگار.

مقدمه

زعفران با نام علمی *Crocus sativus* L. یکی از محصولات کشاورزی است که قدمتی حداقل ۳۵۰۰ ساله دارد و به دلیل خواص و کاربرد دارویی متعدد به عنوان چاشنی طلایی و طلای قرمز شناخته می‌شود (Gupta et al., 2021; Hammami et al., 2021; El Midaui et al., 2022). علاوه براین در گردشگری کشاورزی و ایجاد درآمد اقتصادی می‌تواند مؤثر باشد (Javan et al., 2022). حدود ۹۰٪ زعفران جهان در ایران کشت میشود و کشورهای هندوستان، افغانستان، یونان، ایتالیا، چین، مراکش، اسپانیا و آذربایجان در رتبه‌های بعدی قرار دارند (Gupta et al., 2021). علیرغم ارزش بالای این گیاه، کاهش مداوم تولید آن در بسیاری از کشورها گزارش شده‌است که دلیل آن در دسترس نبودن بنه سالم و کافی به عنوان بذر مادری است (Gupta et al., 2021). تنش‌ها از مهم‌ترین عوامل کاهش‌دهنده عملکرد محصولات کشاورزی از جمله زعفران در سطح جهان هستند (Amiriyan et al., 2021). در میان تنش‌های زیستی، پوسیدگی بنه زعفران عامل اصلی محدودیت تولید زعفران گزارش شده‌است (Sad et al., 1999; Di Primo & Cappelli, 2000; Fiori et al., 2011). پوسیدگی بنه نه تنها باعث کاهش عملکرد پایدار می‌شود بلکه به دلیل نقش بنه زعفران در تکثیر آن، تولید بنه‌های دختری به عنوان بذر نیز تحت تأثیر بیماری قرار دارد. دانش کافی و درستی از بیماری به دلیل عدم مطالعه دقیق آسیب-شناسی و اپیدمیولوژی آن در دسترس نیست. اگرچه در مورد مدیریت بیماری نقش برخی عوامل بیوکنترل در کاهش خسارت بیماری گزارش شده‌است (Gupta et al., 2020; Hu et al., 2021) اما مطالعات کافی در مورد وضعیت مقاومت یا حساسیت ارقام زعفران و نقش عملیات زراعی در مدیریت بیماری وجود ندارد بنابراین بررسی بیماری و عوامل ایجاد کننده آن ضروری است. عامل بیماری اولین بار در اروپا با نام *Rhizoctonia crocorum* گزارش گردید و کشاورزان فرانسوی و انگلیسی را مجبور به رها کردن کشت زعفران نمود (Gupta et al., 2021). سپس به تدریج در کشورهای مختلفی از جمله ژاپن، اسپانیا، فرانسه، ایتالیا، مراکش، اسکاتلند، ایران، چین و هندوستان گزارش گردید (Gupta et al., 2021). در ژاپن میکروارگانیسم‌هایی از قبیل *Fusarium bulbigenum* var. *blasticola*، *Bacillus croci*، *F. oxysporum* f.sp. *gladioli* و *Sclerotinia gladioli* به عنوان عامل پوسیدگی بنه گزارش شده‌اند (Gupta et al., 2021). تاکنون قارچ-های مختلفی از جمله *R. crocorum*، *S. bulborum* و *F. oxysporum* f.sp.*gladiola* از بنه‌های زعفران از اسپانیا گزارش شده‌اند (Gupta et al., 2021). در ایتالیا جدایه‌هایی از قارچ پنی‌سیلیوم از بنه‌های زعفران جداسازی و گزارش گردید (Gupta et al., 2021). در اسکاتلند گونه *P. corymbiferum* به عنوان عامل فساد بنه زعفران معرفی شد (Gupta et al., 2021). در بررسی اتیولوژی پوسیدگی بنه زعفران در هلند، گونه‌های *Pratylenchus penetrans*، *P. pratensis* و *Pythium* spp. از بنه زعفران جداسازی و شناسایی شدند (Schenk, 1970). در مطالعه‌ای گونه‌های *S.rolfsi*، *F. solani*، *F. oxysporum* و *Macrophomina phaseolina* و *F. oxysporum* f.sp. *gladioli* از کیشوار هندوستان به عنوان عامل پوسیدگی بنه زعفران گزارش شدند (Thakur et al., 1992). همچنین در بررسی دیگری سه گونه *F.solani*، *F. oxysporum* و *F. moniliforme* از کشمیر هندوستان گزارش گردید (Hassan & Devi, 2003; Wani & Dar, 2004). پوسیدگی ناشی از قارچ *S. rolfsii* در هندوستان اولین بار از جامو و کشمیر گزارش گردید (Kalha et al., 2007). در مراکش گونه‌های *F. culmorum*، *F. oxysporum*، *F. roseum*، *R. violacea*، *Rhizopus oryzae*، *Aspergillus niger* و *Penicillium* sp. از بنه‌های پوسیده زعفران جداسازی و گزارش شدند (Aymani et al., 2019). براساس نتایج مطالعات متعددی، گونه-های *R. stolonifer*، *P. digitatum*، *A. niger*، *F. oxysporum*، *A. flavipes*، *A. flavus* و *A. terreus* از ایران از گیاه زعفران جداسازی و شناسایی شده‌اند که برخی از آن‌ها بیماریزا و برخی نیز به عنوان مایکوفلور زعفران معرفی شده‌اند (Noorbakhsh et al., 2009; Saeedizadeh, 2014; Najjar et al., 2017; Najari et al., 2018). در چین وقوع *P. solitum* از روی بنه زعفران برای اولین بار گزارش شده‌است (Zhang et al., 2019). همچنین در چین گونه‌های *F. commune*، *F. nirenbergiae* و *F. annulatum*

به عنوان عامل پوسیدگی بنه زعفران گزارش شدند و بررسی بیشتر نشان داد که *F. nirenbergiae* گونه‌ی غالب بود (Mirghasempour et al., 2022a; Mirghasempour et al., 2022b). با توجه به استقبال و کاشت زعفران در سالهای اخیر در سطح استان لرستان، هدف این تحقیق جداسازی و شناخت قارچ‌های بنه زعفران در شهرستان خرم‌آباد بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از مزارع زعفران

به منظور شناسایی قارچ‌های بنه زعفران، جمع‌آوری نمونه‌ها از مناطق مختلف شهرستان خرم‌آباد براساس سطح زیر کشت زعفران و به صورت تصادفی انجام شد. مناطق نمونه‌برداری شامل روستاهای کمالوند، دینارواند، چغاهروشی، ایمان‌آباد، ده‌پیر، ناصروند، دارایی، رباط نمکی، سراب پرده و تیرباز بود. بنه‌های زعفران دارای علایم پوسیدگی و تغییر رنگ جمع آوری شدند و در پاکت‌های مقوایی به آزمایشگاه منتقل و تا زمان جداسازی قارچ در یخچال نگهداری شدند.

جداسازی و شناسایی قارچها از بنه زعفران

برای جداسازی قارچها ابتدا به منظور زدودن گل و لای، بنه‌های آلوده در زیر جریان آب شستشو داده و سپس در هوای آزاد خشک شدند. از حد فاصل بافت آلوده و سالم قطعاتی به اندازه ۱-۰/۵ سانتی متر جدا و بعد از ضدعفونی سطحی در هیپوکلریت سدیم ۵ درصد تجاری به مدت ۱ دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر سترون در شرایط سترون برروی محیط کشت سیب-زمینی- دکستروز-آگار(PDA[1]) منتقل شدند. کشت‌ها در شرایط دمایی ۲±۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از رشد پرگنه، خالص‌سازی جدایه‌ها با استفاده از روش تک اسپور و نوک ریسه کردن بر روی محیط کشت آب آگار دو درصد انجام گرفت. پس از جداسازی و خالص‌سازی، به منظور شناسایی قارچ‌ها، کشت‌های تازه از آنها جهت به دست آوردن اندام و اسپورهای مشخص تهیه گردید. برای جدایه‌های فوزاریوم از محیط کشت برگ میخک- آگار(CLA[2]) و جدایه‌های آلترناریا از محیط کشت سیب‌زمینی- هویج-آگار(PCA[3]) استفاده گردید. تصاویر میکروسکوپی و اندازه‌گیری اسپورها با استفاده از میکروسکوپ Eclipse Nikon 50 I(Japan) و Olympus BX51(Japan) انجام گردید. از ویژگی‌های ماکروسکوپی مثل رنگ و نحوه رشد پرگنه، رنگ پرگنه از سطح رویی و زیرین کشت و از ویژگی‌های میکروسکوپی شامل مشخصات کنیدی‌بر (سلول کنیدی‌زا)، شکل، اندازه و آرایش کنیدی‌ها بر روی کنیدی‌بر استفاده شد. برای هر جدایه قارچی ابعاد ۵۰ اسپور با استفاده از نرم افزار Image J Version 1.53n (National Institutes of Health, USA, 2021) اندازه‌گیری و میانگین آنها به عنوان اندازه نهایی اسپور تعیین گردید. با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی و میکروسکوپی اسپورها و سایر اندام‌های زایشی و با استفاده ازکلیدهای شناسایی معتبر (Nelson et al., 1983; Burgess et al., 1994; Leslie & Summerell, 2006; Simmons, 2007) قارچها شناسایی شدند.

اثبات بیماریزایی جدایه‌ها

جهت اثبات بیماریزایی، ابتدا جدایه‌های خالص قارچها در محیط کشت مایع سیب زمینی – دکستروز(PDB[4]) کشت شدند و در یک انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از رشد مناسب و صاف کردن آن با یک پارچه ململ سترون، سوسپانسیون اسپور با غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی-لیتر آب مقطر سترون تهیه گردید. بنه‌های سالم و تازه زعفران پس از حذف لایه سطحی، با محلول هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و اتانول ۷۵ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی و سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. جهت مایه‌زنی و جذب بهتر زادمایه قارچ، بنه‌ها در سوسپانسیون اسپور غوطه‌ور شدند. برای بنه‌های شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. سپس بنه‌ها در خاک سترون کشت و در شرایط دمایی۲±۲۳ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد به مدت ۴ هفته در گلخانه نگهداری شدند. در پایان این مدت بنه‌ها از خاک خارج و ضمن بررسی وضعیت آلودگی و علایم بیماری، از آنها کشت مجدد به منظور اثبات اصول کخ انجام گرفت.

[1] Potato Dextrose Agar
[2] Carnation Leaf Agar
[3] Potato Carrot Agar
[4] Potato Dextrose Broth

نتایج و بحث

در مجموع تعداد ۵۸ جدایه قارچی از بنه‌های آلوده جداسازی و مورد بررسی و شناسایی قرار گرفت و گونه‌های *A.alternata*، *F. solani*، *F. acuminatum* و *F. oxysporum* شناسایی شدند.

معرفی و توصیف قارچ‌های جدا شده:

***Alternaria alternata* (Fr.) Keissler**

فراوان‌ترین گونه‌ی قارچی با ۲۵ جدایه در بین قارچ‌های جدا شده از نمونه‌های بنه زعفران بود.

قطر پرگنه‌ی قارچ بعد از ۱۰ روز روی محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، ۷ سانتی‌متر بود. رنگ پرگنه قهوه‌ای تیره و در مرکز خاکستری، با حاشیه سفید بود. سطح زیرین پتری قهوه‌ای مایل به سیاه بود. بعد از کشت روی محیط سیب‌زمینی- هویج-آگار، رنگ پرگنه سبز زیتونی تا سبز تیره گردید. کنیدی‌برهای این قارچ قهوه‌ای روشن، راست یا خمیده، دارای دیواره و اندازه آنها (۵-۳/۵)×۳/۲(۶۰-۲۵) ۴۲ میکرومتر بود. کنیدی‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن، مخروطی یا گلابی وارونه و آرایش زنجیره‌ای داشتند. دارای ۷-۳ دیواره عرضی و ۳-۱ دیواره طولی بودند. اندازه کنیدی‌ها (۱۸-۸) ۱۳×(۶۱-۲۰) ۴۰ میکرومتر بود (شکل۱).

مشخصات جدایه‌های این تحقیق با گونه‌ی توصیف شده در کلید شناسایی سیمونز (Simmons, 2007) و منابع دیگر (Woudenberg et al., 2015; Zhao et al., 2020) مطابقت داشت. این گونه از گیاهان مختلفی گزارش شده‌است (Woudenberg et al., 2015). این گونه در گذشته از هندوستان (Raj et al., 2013) و ایران (Hossainnia & Mohammadi, 2018) به عنوان عامل پوسیدگی بنه زعفران گزارش شده‌است. در بررسی بیماریزایی روی بنه زعفران، این گونه از نظر شدت علایم ایجاد شده و پوسیدگی بافت بنه در رتبه آخر قرار گرفت و کمترین پوسیدگی بنه را در مقایسه با بنه سالم و سایر گونه‌های مورد بررسی نشان داد (شکل ۵-a).

***Fusarium solani* (Martius) Appel & Wollenweber emend. Snyder & Hansen**

از این گونه ۲۱ جدایه شناسایی گردید.

قطر پرگنه‌ی قارچ بعد از ۱۰ روز روی محیط کشت سیب زمینی- دکستروز-آگار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، ۷ سانتی‌متر بود. رنگ زیرین پرگنه از سفید تا بنفش متغیر بود. میسلیوم هوایی سفید تا کرم رنگ بود. میکروکنیدی ۱ تا ۳ سلولی ولی بیشتر یک سلولی، به اشکال بیضی، تخم‌مرغی و روی مونوفیالیدها تشکیل شدند. اندازه آنها(۵-۳/۵)×۴ (۱۶-۷/۵)۱۲ میکرومتر بود. ماکروکنیدی‌ها به تعداد زیاد در اسپورودوکیوم‌های کرم‌رنگ روی محیط کشت برگ میخک آگار تولید شدند. ماکروکنیدی‌ها نسبتاً بلند، خمیده، سلول انتهایی صاف و گرد، سلول پایه پاشنه‌ای ضعیف و غالباً دارای ۳ دیواره عرضی بودند. اندازه آنها (۵-۳/۵)۴/۲×(۴۵-۳۲) ۴۰ میکرومتر بود. کلامیدوسپور به فراوانی و بعد از دو هفته و با آرایش جفتی و یا تکی در وسط ریسه و یا در انتهای آن تشکیل شدند(شکل۲).

مشخصات جدایه‌ها با توصیف نلسون و همکاران (Nelson et al., 1983)، برجیس و همکاران (Burgess et al., 1994) و لزلی و سامرل (Leslie & Summerell, 2006) مطابقت داشت. این گونه از گیاهان متعددی گزارش گردیده‌است (Habibi et al., 2018). این گونه به عنوان عامل پوسیدگی بنه زعفران در کشمیر هند گزارش شده‌است (Wani & Dar, 2004). جدایه‌های این گونه بعد از گونه *F. oxysporum* بیشترین پوسیدگی را در بنه زعفران در شرایط گلخانه ایجاد کردند (شکل ۵ - d). مطالعات قبلی این قارچ را به عنوان یکی از مهمترین عوامل پوسیدگی بنه زعفران با کاهش عملکرد ۷۰ تا ۸۰ درصد زعفران گزارش نمودند (Kalha et al., 2007). این گونه در فنلاند (Haapalainen et al., 2016) و مراکش (Aymani et al., 2019) به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل پوسیدگی بنه‌ی زعفران گزارش شده‌است. گزارشی از این گونه روی گیاه زعفران در ایران وجود نداشت.

***Fusarium acuminatum* Ellis & Everhart**

از این گونه ۴ جدایه به دست آمد.

میزان رشد پرگنه‌ی قارچ بعد از ۱۰ روز روی محیط کشت سیب زمینی – دکستروز– آگار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، ۸ سانتی‌متر بود. رنگ سطح زیرین پرگنه گل‌رزی تا قرمز کارمن و میسلیوم هوایی به رنگ سفید بود. در ۴ جدایه این گونه در این تحقیق

میکروکنیدی تولید نشد. سلول کنیدی‌زا به شکل مونوفیالید و بندرت مشاهده گردید. ماکروکنیدی‌ها در محیط کشت برگ میخک به فراوانی تولید شده، به شکل خمیده، با دیواره نسبتاً ضخیم، سلول پایه پاشنه-ای، سلول انتهایی مخروطی و کمی کشیده، اغلب ۵ دیواره عرضی و به ندرت ۳ تا ۴ دیواره عرضی داشتند. اندازه ماکروکنیدی‌ها (۴/۵-۲/۵)×۳ (۵۰-۴۴) ۴۷ میکرومتر است. کلامیدوسپور در برخی جدایه‌ها مشاهده گردید. در جدایه‌های دارای کلامیدوسپور، تولید آن بیشتر با آرایش زنجیری بود (شکل ۳).

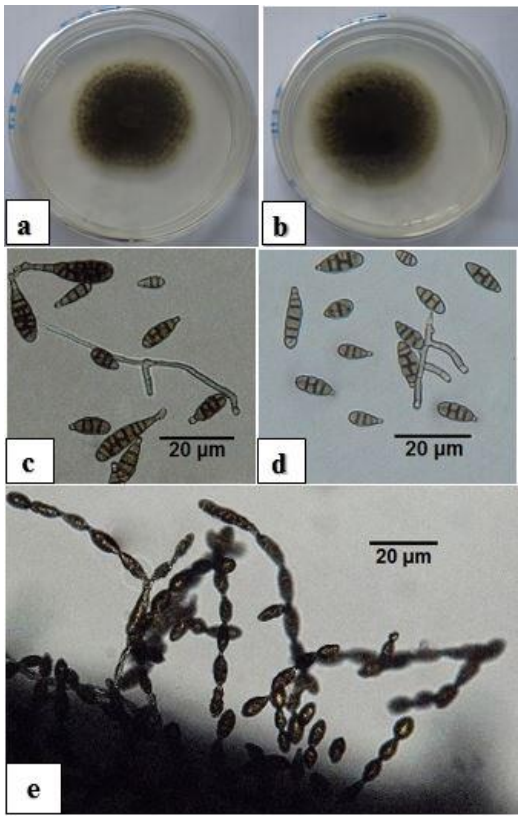
مشخصات این گونه با توصیف برجیس و همکاران(Burgess et al., 1994)، نلسون و همکاران (Nelson et al, 1983) و ویژگی‌های ذکر شده در مونوگراف لزلی و سامرل (Leslie & Summerell, 2006) کاملاً مطابقت داشت. ویژگی‌های ماکروکنیدی، عدم تولید میکروکنیدی در بیشتر جدایه‌ها و آرایش زنجیری کلامیدوسپور با جدایه‌های این گونه در مطالعات اخیر نیز کاملاً مطابقت داشت (Chakroun et al., 2022). این گونه همراه ریشه و بخش‌های زیرزمینی خیلی از گیاهان گزارش شده‌است (Trabelsi et al., 2017; Park et al., 2021). از نظر بیماریزایی، در مطالعه حاضر جدایه‌های این گونه پوسیدگی ضعیفی روی بنه ایجاد کردند (شکل ۵- b) و در روی اندامهای بالای سطح خاک در مقایسه با سایر گونه‌ها از جمله *F. solani* و*F. oxysporum* علایم خاصی ایجاد نشد. در برخی مطالعات نیز این گونه به عنوان ضعیف‌ترین گونه-ی بیماریزا روی گیاهان میزبان در مقایسه با سایر گونه-های فوزاریوم گزارش شده‌است و بیشتر به عنوان یک عامل مهم پوده‌رست و پس از برداشت معرفی شده‌است (Chakroun et al., 2022). بررسی مطالعات گذشته گزارشی از این گونه را از گیاه زعفران در دنیا نشان نداد.

***Fusarium oxysporum* Schlechtendahl emend. Snyder & Hansen**

از این گونه ۸ جدایه به دست آمد.

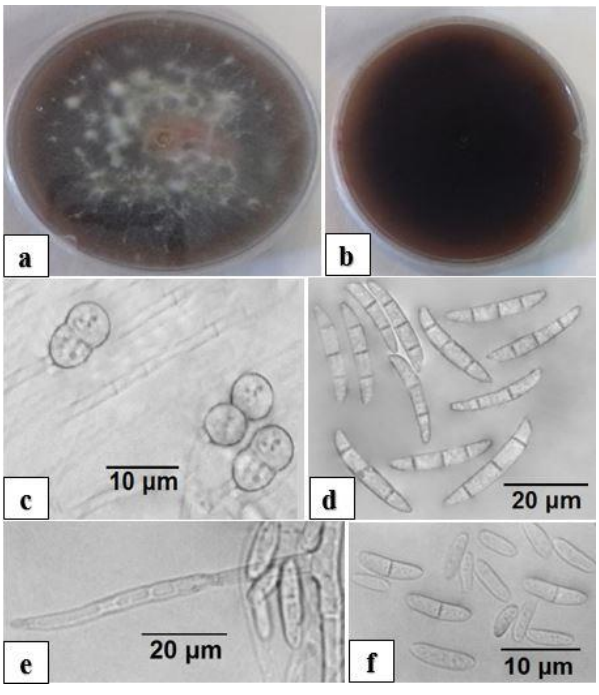
میزان رشد پرگنه قارچ بعد از ۱۰ روز روی محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، ۱۰ سانتی‌متر بود. رنگ سطح زیرین پرگنه از شفاف تا ارغوانی متغیر بود و میسلیوم هوایی به رنگ سفید تا بنفش تولید کرد. در جدایه‌های این گونه میکروکنیدی‌ها فراوان، غالباً تک سلولی و بندرت دو سلولی بود. به اشکال بیضی، تخم‌مرغی و روی مونوفیالیدهای کوتاه و در اندازه‌ی (۳-۲)۲/۵× (۱۱-۵) ۸ تشکیل شدند. ماکروکنیدی‌ها به فراوانی تولید شده، به شکل سیلندری و نسبتاً خمیده، سلول پایه پاشنه‌ای، سلول انتهایی نوک تیز و کمی انحنادار، اغلب دارای ۳ تا ۵ دیواره عرضی بودند. اندازه ماکروکنیدی‌ها (۴/۵-۳/۵)×۳/۶ (۲۰-۳۵) ۳۰ میکرومتر بود. کلامیدوسپور در جدایه‌ها به صورت منفرد و جفتی در بین هیف و انتهای هیف تشکیل گردید (شکل ۳).

مشخصات این گونه با توصیف نلسون و همکاران (Nelson et al, 1983)، برجیس و همکاران (Burgess et al., 1994) و ویژگی‌های ذکر شده در مونوگراف لزلی و سامرل (Leslie & Summerell, 2006) کاملاً مطابقت داشت. این گونه از روی گیاهان تیره‌های مختلف گیاهی گزارش شده‌است (Habibi et al., 2018; Rostami et al., 2017). اثبات اصول کخ در مورد جدایه‌های این گونه در بررسی گلخانه‌ای نشان داد که بیشترین شدت بیماریزایی در مقایسه با سایر گونه‌ها را روی زعفران ایجاد کرد(شکل ۵-c). این گونه به عنوان عامل اصلی پوسیدگی بنه زعفران در مناطق مختلف جهان گزارش شده‌است (Yamamoto et al., 1954; Di Primo & Cappelli, 2000; Hassan & Devi, 2003; Aymani et al., 2019; Gupta et al., 2021).



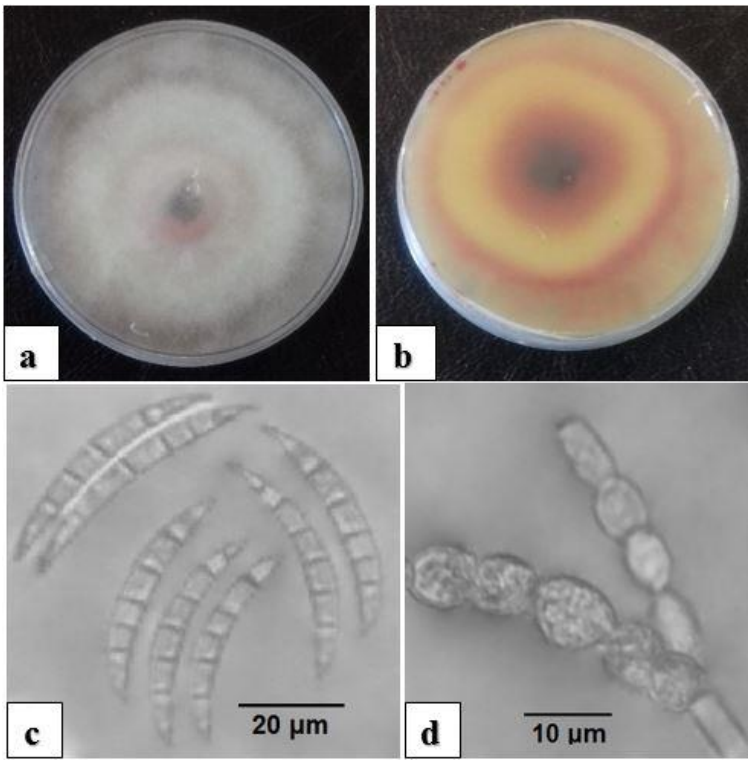
شکل۱.*Alternaria alternata*: a و b –پرگنه قارچ روی محیط کشت PCA، c و d–کنیدی‌بر و کنیدی، e– زنجیره کنیدی.

Fig 1. *Alternaria alternata*: a & b-colony on PCA, c & d-conidiophore & conidium, e-catenate conidium.



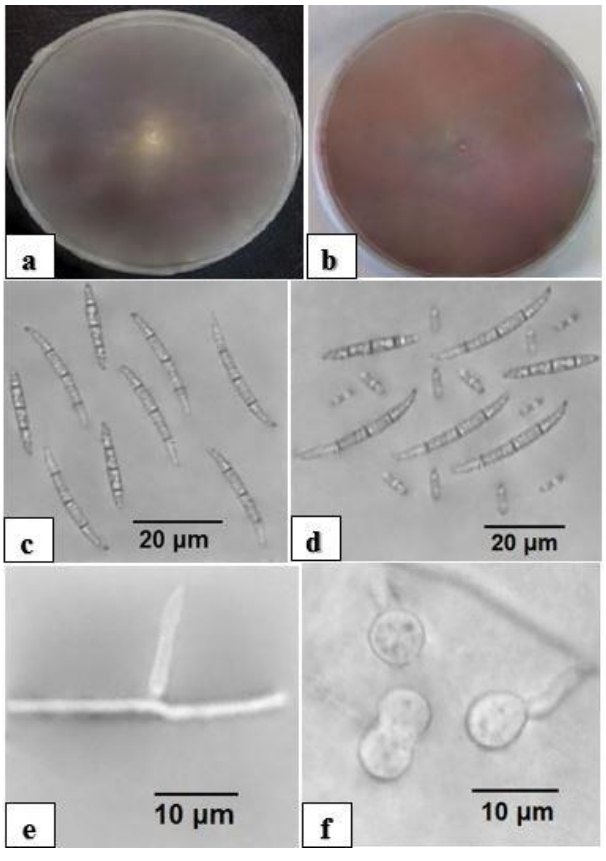
شکل۲.*Fusarium solani* : a و b – پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA، c–کلامیدوسپور، d– ماکروکنیدی، e– مونوفیالید، f– میکروکنیدی.

Fig 2. *Fusarium solani*: a & b- colony on PDA, c- chlamydospore, d-maroconidium, e-monophialid, f- microconidium.



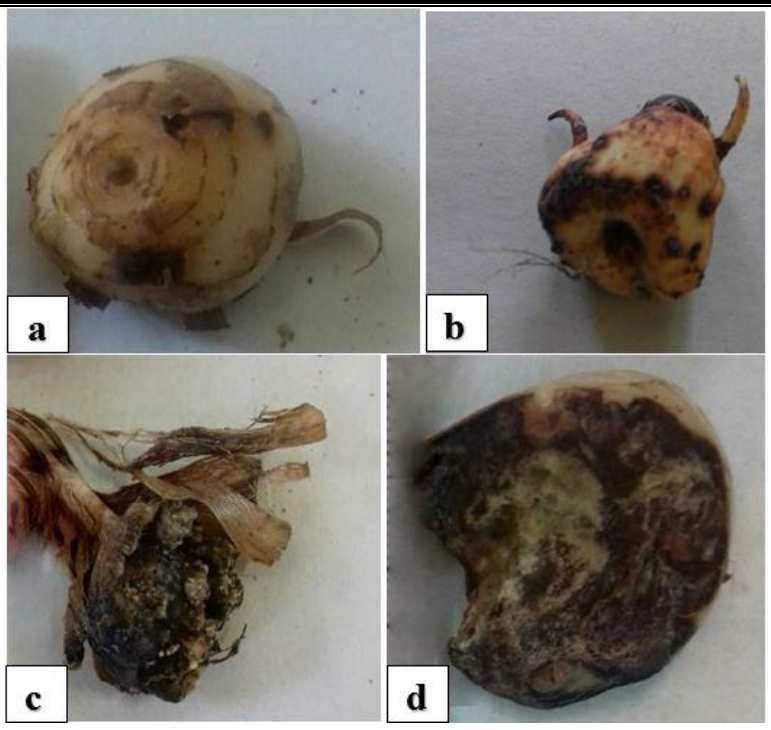
شکل ۳. *Fusarium acuminatum* : a و b – پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA، c– ماکروکنیدی، d– کلامیدوسپور.

Fig 3. *Fusarium acuminatum*: a & b- colony on PDA, c- maroconidium, d- chlamydospore.



شکل ۴. *Fusarium oxysporum* : a و b– پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA، c– ماکروکنیدی، d– ماکروکنیدی و میکروکنیدی، e– مونوفیالید، f– کلامیدوسپور.

Fig 4. *Fusarium oxysporum*: a & b- colony on PDA, c- maroconidium, d- maroconidium & microconidium, e- monophialid, f- chlamydospore.



شکل ۵. نتایج آزمون بیماریزایی قارچها بر روی بنه‌ی زعفران، a: *A.alternata*، b: *F. acuminatum*، c: *F. oxysporum*، d: *F. solani*

Fig 5. Results of pathogenicity tets of fungi on sffron corm, a: *A. alternate*, b: *F. acuminatum*, c: *F. oxysporum*, d: *F. solani*.

نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که پوسیدگی بنه محدودیت مهمی در زراعت زعفران است. در این بررسی اگرچه فقط جدایه‌های متعلق به ۴ گونه از دو جنس *Alternaria* و *Fusarium* شناسایی و از نظر بیماریزایی بررسی شدند، اما جداسازی جنس‌های دیگری از جمله *Aspergillus*، *Rhizopus* و *Penicillium* نشان داد که بنه زعفران به دلیل قرار گرفتن در محیط خاک و نگهداری در دوره انبارداری، پتانسیل آلودگی آن به قارچ‌های مختلف خاکزی و پوده‌رست بالاست. با وجود فراوانی جدایه و پراکنش جغرافیایی بیشتر گونه *A. alternata* در این تحقیق، گونه‌های فوزاریوم به ویژه *F. oxysporum* از نظر بیماریزایی تهاجمی‌تر بودند. پوسیدگی بنه بیماری مرکبی است و در بین قارچهای عامل پوسیدگی بنه گونه‌های فوزاریوم بیشتر به عنوان عامل پوسیدگی گزارش شده‌اند. به دلیل عدم وجود ارقام مقاوم و مشخص نبودن نقش عملیات زراعی در ایجاد و شیوع بیماری و ارتباط بیمارگرهای مختلف با پوسیدگی بنه زعفران، بررسی و مطالعه بیشتر و جزئی‌تر این بیماری ضروری است. نتایج این تحقیق در راستای همین ضرورت، می‌تواند در مدیریت زراعت زعفران مورد توجه قرار گیرد.

منابع

Amiriyan, F., Mostafaie, A., & Kargar, S. M. A. 2021. The investigation of genetic diversity of saffron (*Crocus sativus* L.) ecotypes traits under chilling stress. *Journal of Saffron Research* 8(2):191-206. [In Persian].

Aymanni, I. E., Qostal, S., Mouden, N., Selmaoui, K., Touhami, A. O., Benkirane, R., & Douira, A. (2019). Fungi associated with saffron (*Crocus sativus*) in Morocco. *Plant Cell Biotechnology & Molecular Biology* 20(23-24):1180-1188.

Burgess, L.W., Summerell, B.A., Bullock, S., Gott, K.P., & Backhouse, D. (1994). Laboratory manual for fusarium research. *Fusarium* research, department of crop sciences, university of Sydnay & Royal Botanic Gardens Sydnay, 133pp.

Chakroun, Y., Oueslati, S., Pinson-Gadais, L., Abderrabba, M., & Savoie, J.M. (2022). Characterization of *Fusarium acuminatum*: A potential enniatins producer in Tunisian

wheat. *Journal of Fungi* 8, 458.https://doi.org/10.3390/jof8050458.

Di Primo, P., & Cappelli, C. (2000). Preliminary characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* causing *Fusarium* corm rot of saffron in Italy. *Plant Disease* 84:806-806.

El Midaoui, A., Ghzaiel, I., Verv&ier-Fasseur, D., Ksila, M., Zarrouk, A., Nury, T., Khallouki, F., El Hessni, A., Ibrahimi, S.O., Latruffe, N., et al. (2022). Saffron (*Crocus sativus* L.): A source of nutrients for health & for the treatment of neuropsychiatric and age-related diseases. *Nutrients* 14, 597. https://doi.org/ 10.3390/nu14030597.

Fiori, M., Ligios, V., & Schiaffino, A. (2011). Identification & characterization of *Burkholderia* isolates obtained from bacterial rot of saffron (*Crocus sativus* L.) grown in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 50:450-461.

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

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

Habibi, A., Mansouri, S. M., & Sadeghi, B. (2018). *Fusarium* species associated with medicinal plants of Lamiaceae & Asteraceae. *Mycologia Iranica* 5(2):91-101. DOI: 10.22043/MI.2019.120383.

Hammami, H., Jahani, M., Shoshtari, S., & Noferesti, F. (2021). Evaluation of allelopathic and antifungal effects of different concentrations of aqueous leaves and corm extracts of saffron (*Crocus sativus* L.) on common purslane and *Penicillium* sp. *Journal of Saffron Research* 8(2):255-267. [In Persian].

Hassan, M., & Devi, L.S. (2003). Corm rot diseases of saffron in Kashmir valley. *Indian Phytopathology* 56:122.

Hossainnia, A., & Mohammadi, A. (2018). Investigation of *Alternaria alternata* pathogenicity on corm & leaves of saffron in vitro & greenhouse conditions. *Saffron Agronomy* & *Technology* 6(1):61-72. [In Persian].

Hu, S., Wang, X., Sun, W., Wang, L., & Li, W. (2021). In vitro study of biocontrol potential of rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* against pathogenic fungi of saffron (*Crocus sativus* L.). *Pathogens*, 10, 1423. https://doi.org/10.3390/ pathogens10111423.

Javan, F., Naim Abadi, N., & Hojjat Shamami, S. (2022). Analysis of the effects of agricultural tourism on the development of local economy based on saffron farms (case study: darbeghazi village of Neishabour county). *Journal of Saffron Research* 9(2):194-213. [In Persian].

Kalha, C.S., Gupta, V., Gupta, D., & Priya, S. (2007). First report of sclerotial rot of saffron caused by *Sclerotium rolfsii* in India. *Plant Disease* 91(9):1203-1203.

Leslie, J.F., & Summerell, B.A. (2006). The *Fusarium* Laboratory Manual; Wiley & Sons: London, UK.399pp.

Mirghasempour, S.A., Studholme, D.J., Chen, W., Cui, D., & Mao, B. (2022a). Identification and characterization of *Fusarium nirenbergiae* associated with saffron corm rot disease. Plant Disease 106:486-495.

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

Najjar, S., Mohammadi, A., Asgari, B., & Mohammadi, A.H. (2017). Aflatoxin-producing *Aspergillus* species from saffron field soils in the South Khorasan province of Iran. *Archive* of *Phytopathology* & *Plant Protection* 50:349-360.

Najari, G., Nourollahi, K., & Piri, M. (2018). The first report of *Fusarium oxysporum* causal agent of wild saffron corm rot disease in Iran. *Saffron Agronomy* & *Technology* 6:119-123. [In Persian].

Nelson, P.E, Toussoun, T.A, & Marasas, W.F.O. (1983). *Fusarium* Species, an illustrated manual for identifircation. Pennsylvania State University Press University Park. 193 pp.

Noorbakhsh, R., Bahrami, A. R., Mortazavi, S. A., & Bahreini, M. (2009). PCR-based identification of aflatoxigenic fungi associated with Iranian saffron. *Food Science* & *Biotechnology* 18:1018-1031. [In Persian].

Raj, P., Khan, S.S., Modak, M., Lone, Z.A., Rather, S.A., & Yaqoob, M. (2013). Biodiversity of endophytic fungi in saffron (*Crocus sativus*) & antimicrobial activity of their crude extract. *Indo American Journal* of *Pharm Research* 3(5):3702-3713.

Rostami, A., Saremi, H., & Javan-Nikkhah, M. (2017). Morphological & phylogenic analysis of *Fusarium* species associated with vertical system of *Orobanche* spp. *Mycologia Iranica* 4(1): 39-47.

Sad, A.K., Paul, Y.S., & Thakur, B.R. (1999). Corm rot of saffron & its management. *Journal of Mycology & Plant Pathology* 29:380-282.

Saeedizadeh, A. (2014). Identification of some saffron corm rot fungi & their control.

Saffron Agronomy & Technology 2:205-213. [In Persian].

Schenk, P. K. (1970). Root rot in crocus. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 76:159-164.

Simmons, E. G. (2007). *Alternaria*, an identification manual fully illustrated & with catalogue raisonne. CBS Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands, 757pp.

Thakur, R., Singh, C., & Kaul, B. 1992. First report of corm rot in *Crocus sativus*. *Indian Phytopathology* 45:278-282.

Trabelsi, R., Sellami, H., Gharbi, Y., Krid, S., Cheffi, M., Kammoun, S., Dammak, M., Mseddi, A., Gdoura, R., & Triki, M. ^ (2017). Morphological & molec ۲۹۴ characterization of *Fusarium* spp associated with olive trees dieback in Tunisia. *Biotechnology* 7:28. DOI 10.1007/s13205-016-0587-3.

Wani, M.A.S., & Dar, G. (2004). Studies on corm rot of saffron (*Crocus sativus* L.). Biology 23:130-148.

Woudenberg, J.H.C., Seid, M.F., Groenewald, J.Z., de Vries, Stielow, M. J.B., Thomma, B.P.H.J., & Crous, P. W. (2015). Alternaria section Alternaria: Species, formae speciales or pathotypes? *Studies in Mycology* 82:1-21.

Yamamoto, W., Omatsu, T., & Takami, K. (1954). Studies on the corm rot (*Crocus sativus* L.) On the saprophytic propagation (*Sclerotinia gladioli*) & (*Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli*) on various plants & soil. *Science Reports of the Hyogo University of Agriculture* 1:64-70.

Zhang, T., Huang, C., Deng, C., Zhang, Y., Feng, Y., Hu, J., Wang, R., Zhao, L., Wang, Y., & Kai, G. (2019). First report of corm rot on saffron caused by *Penicillium solitum* in China. Plant Disease 104, 579.

Zhao, N., Yang, J., Meng, Q., Fang, X., Zhang, W., Li, L., Yan, H., & Liu, D. (2021). First report of *Alternaria alternata* causing leaf spot on *Avena nuda* in Zhangbei, China. *Plant Disease* 105(1):2018.

COPYRIGHTS

© 2022-2023 by the authors. Published by University of Birjand – Saffron Research Group. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)