علوم و تحقیقات بذر ایران
سال هشتم/ شماره دوم/ ۱۴۰۰ (۱۳۰ - ۱۱۳)
مقاله پژوهشی
DOI: 10.22124/jms.2021.5215

ارزیابی تأثیر قارچ‌های بذرزاد روی جوانه‌زنی، سلامت و کیفیت توده‌های بذری بومی رازیانه

نیما خالدی[1*]، عباس دهشیری[2]، فرشید حسنی[3]، لیلا زارع[4]

تاریخ دریافت: ۹۹/۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۹/۸/۲۱

چکیده

قارچ‌های بذرزاد می‌توانند با تأثیر روی سلامت بذر، منجر به کاهش کیفیت و کمیت محصول شوند. هدف از این مطالعه ارزیابی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه توده‌های بذر بومی رازیانه، جداسازی و شناسایی قارچ‌های بذرزاد بوده و در ادامه نیز میزان بیماری‌زایی، قدرت تهاجم و فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی تولیدشده توسط این جدایه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. به‌منظور شناسایی قارچ‌های بذرزاد توده‌های بذری رازیانه از برخی مزارع استان‌های گلستان، زنجان، کردستان و همدان بر اساس ضوابط انجمن بین المللی آزمون بذر نمونه‌برداری شد. جدایه‌های قارچی پس از جداسازی و خالص‌سازی، بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی، شناسایی شدند. سپس میزان فعالیت آنزیم‌های سلولاز، زایلاناز، پکتیناز و لیپاز به‌عنوان اصلی‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی ترشح‌شده توسط جدایه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین، پتانسیل بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌ها با آزمون بیماری‌زایی روی گیاهچه بررسی شد. در مجموع ۳۳ جدایه بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی که متعلق به گونه‌های *Alternaria alternate* و *Fusarium oxysporum* شناسایی شدند. نتایج آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که در میان توده‌های بومی بذر مورد بررسی، اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه وجود دارد. آلودگی بذر به قارچ‌های بذرزاد به‌طور قابل‌توجهی روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی بذر تأثیر گذاشته و موجب کاهش کیفیت بذر می‌شوند. نتایج نشان داد که کم‌ترین شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی در توده بذری گلستان و پس از آن به‌ترتیب در توده‌های بذری همدان، زنجان و کردستان مشاهده شد. نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد که حدود ۸۵ درصد جدایه‌ها بیماری‌زا و کم بیماری‌زا و ۱۵ درصد جدایه‌های بیماری‌زا نبودند. همچنین میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌های مختلف گونه‌های *Alternaria* و *Fusarium* متفاوت بود. تجزیه و تحلیل فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی نشان داد که سلولاز و زایلاناز در مقایسه با پکتیناز و لیپاز اهمیت بیش‌تری در بیماری‌زایی جدایه‌ها داشته و میزان فعالیت آنزیم‌ها روی میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌ها تأثیر داشت. بنابراین، این یافته‌ها نشان می‌دهد که میزان فعالیت سلولاز و زایلاناز با میزان تغییرات بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌ها روی گیاهچه مرتبط می‌باشد. این اولین گزارش در مورد شناسایی قارچ‌های بذرزاد رازیانه در توده‌های بذر بومی ایران به‌همراه بررسی ارتباط میان میزان بیماری‌زایی، قدرت تهاجم و فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی تولیدشده توسط جدایه‌ها بود.

واژه‌های کلیدی: آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی، بیماری‌زایی، رازیانه، زایلاناز، سلولاز، قدرت تهاجم

۱- موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. khnm13@gmail.com
۲- موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. ab_dehshiri@yahoo.com
۳- موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. farshid.shz@gmail.com
۴- موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران. zare_l@yahoo.com
*نویسنده مسئول: khnm13@gmail.com

مقدمه

گیاه رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* Mill. از خانواده چتریان (Apiaceae) یکی از مهم‌ترین و پرمصرف‌ترین گیاهان ادویه‌ای و دارویی می‌باشد (Khalaj *et al*., 2019). ایران با تولید حدود ۵ درصد از کل تولید رازیانه جهان به‌عنوان یکی از مهم‌ترین کشورهای تولید و صادرکننده رازیانه شناخته می‌شود. اسانس رازیانه از ترکیبات مختلفی ترپنوئیدی و فنیل پروپانوئیدها تشکیل شده است که در صنایع مختلف دارویی، غذایی، آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرد (Diao *et al*., 2014; Younesian *et al*., 2012). با توجه به اهمیت اقتصادی رازیانه در تجارت جهانی و وجود تنوع ژنتیکی، نیاز آبی کم و مقاومت به خشکی بر اهمیت آن می‌افزاید (Maghsudi Kelardashti *et al*., 2014). رازیانه گیاهی علفی دو ساله یا چند ساله و بومی کشورهای مدیترانه و جنوب اروپا می‌باشد. عمده تولیدکننده رازیانه در کشور شامل استان‌های همدان، گلستان، کردستان، لرستان، تبریز، کرمان، خراسان رضوی، گیلان، کهگیلویه و بویراحمد، مازندران و تهران می‌باشد (Ehsanipour *et al*., 2012; Darzi *et al*., 2007).

بذر مهم‌ترین اندام گیاهی می‌باشد که عامل تکثیر و حفظ ذخایر توارثی گیاهی بوده و در پراکنش گیاه در مناطق مختلف، حفظ، تکثیر و بقای نسل گیاه در شرایط سخت و طولانی‌مدت، نقش به‌سزایی دارد (Nasiri, 2018). سلامت آن نقش مهمی در تعیین کیفیت بذر و افزایش بالقوه عملکرد محصول دارند. همچنین در انتقال بیماری به مناطق دیگر و فصل زراعی بعد بذر نقش مهمی دارند (Mahapatra *et al*., 2019; Singh *et al*., 2011; Singh and Mathur, 2004). سلامت بذر تحت تأثیر وجود یا عدم وجود هرگونه عوامل بیماری‌زایی که درون و یا روی سطح بذر وجود دارند، قرار می‌گیرد. تاکنون قارچ‌های *Alternaria alternate* و *Fusarium oxysporum* f. sp. *funiculi* به‌عنوان قارچ‌های بذزاد و همراه بذر رازیانه در جهان گزارش شده است که این عوامل بیماری‌زای قارچی به‌صورت بذرزاد و یا همراه بذر موجب کاهش یا از بین‌بردن جوانه‌زنی و بنیه بذر، پوسیدگی و نکروز بذر، پژمردگی و سوختگی گیاهچه می‌شوند (Khare *et al*., 2014; Singh *et al*., 2011). با توجه به نتایج گزارش شده توسط سایر محققان قارچ‌های بذرزاد و همراه بذر موجب کاهش شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی رازیانه می‌شوند (Ben Salem *et al*., 2019; Gama *et al*., 2014). عوامل بیماری‌زای زیادی ممکن است در طی دوره رشد رازیانه به آن حمله کرده و موجب کاهش کمیت و کیفیت آن شوند. از مهم‌ترین بیماری‌های رازیانه می‌توان به پژمردگی فوزاریومی، سوختگی آلترناریایی، سوختگی رامولاریایی، لکه برگی سرکوسپورایی، لکه برگی زاویه‌ای، لکه برگی آسکوکیتایی، پوسیدگی فیتوفتورای، پوسیدگی رایزوکتونیایی ریشه و طوقه، پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه، زنگ، سفیدک پودری و داخلی اشاره کرد (Khare *et al*., 2014). تاکنون قارچ‌های *Leveillula umbelliferarum* عامل بیماری سفیدک پودری از اهواز، مرند و شیراز، *Passalora kirchneri* عامل بیماری لکه برگی زاویه‌ای از بابل و تنکابن و *Ramularia* sp. عامل بیماری سوختگی رامولاریایی از قائمشهر روی گیاه رازیانه گزارش شده است (Ershad, 2009). استراتژی‌های مختلفی از جمله استفاده از بذر سالم، رعایت اصول به‌زراعی و استفاده سموم شیمیایی برای مدیریت بیماری رازیانه توصیه شده است (Khare *et al*., 2014).

اطلاعات ما در مورد مکانیسم‌های درگیر در بیماری‌زایی قارچ‌های *Alternaria* و *Fusarium* روی رازیانه بسیار محدود است. قارچ‌های *Alternaria* و *Fusarium* ساختاری تخصصی برای نفوذ در سلول‌های گیاهی ندارد، اما از طریق منافذ طبیعی یا زخم‌ها وارد میزبان شده و یا به‌طور مستقیم توسط ساختار ویژه هیف آپرسوریوم (*Alternaria* spp.) و هیف کوتاه آلوده‌کننده (*Fusarium* spp.) در دیواره سلول‌های اپیدرمی نفوذ می‌کند (Boedo *et al*., 2007; Wanyoike *et al*., 2002; Pritsch *et al*., 2000). عوامل بیماری‌زایی گیاهی به‌ویژه قارچ‌های نکروتروف برای غلبه بر دیواره سلولی به‌عنوان اولین لایه دفاعی فیزیکی در گیاهان میزبان تکامل یافته است (Underwood, 2012). گونه‌های قارچ آلترناریا و فوزاریوم از طریق تولید و ترشح آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی به‌عنوان اصلی‌ترین فاکتورهای بیماری‌زایی قادر به نفوذ، توسعه و ایجاد آلودگی در بافت گیاه هستند (Taheri, 2019; Kikot *et al*., 2009; Cho *et al*., 2009). قدرت تهاجم عاملی مهم در سازگاری عوامل بیماری‌زا است که نشان‌دهنده

توانایی احتمالی آن‌ها در ظهور علایم بیماری روی میزبان در کوتاه‌ترین زمان ممکن و ایجاد اپیدمی بیماری است (Lannou, 2012; Sacristan and García-Arenal, 2008). مطالعات انجام‌شده در مورد قارچ‌های *Alternaria tenuissima*، *Fusarium graminearum*، *F. culmorum*، *F. proliferatum*، *F. subglutinans*، *Verticillium dahliae*، *Magnaporthe grisea* و *Rhizoctonia solani* و *Macrophomina phaseolina* نشان داد که رابطه مستقیمی بین آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی و میزان بیماری‌زایی این قارچ‌ها وجود دارد (Taheri, 2019; Khaledi *et al*., 2017; Khaledi *et al*., 2015; Gibson *et al*., 2011). کاهش تولید و فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی حاصل از بیمارگرها با کاهش قدرت تهاجم و بیماری‌زایی آن‌ها ارتباط مستقیمی دارد (Noda *et al*., 2010; Kikot *et al*., 2009; Voigt *et al*., 2005). سنجش و ارزیابی آنزیم‌های خارج سلولی ترشح شده توسط بیمارگرها می‌تواند به‌عنوان روش مفیدی جهت ارزیابی توان بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گیرد (Khaledi *et al*., 2017; Gibson *et al*., 2011). با وجود اهمیت اقتصادی گیاهان دارویی، اطلاعات ما در مورد بیماری‌های ناشی از قارچ‌های بذرزاد رازیانه در ایران بسیار محدود است. تحقیق حاضر با هدف شناسایی قارچ‌های بذرزاد در توده‌های بومی رازیانه و ارزیابی تأثیر آن‌ها روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی انجام شد. همچنین ارتباط بین میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه¬ها با فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح شده توسط آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در طی سال زراعی ۱۳۹۸ پس از رسیدگی کامل بذور و برداشت از توده‌های بذری رازیانه در استان‌های گلستان (شهرستان علی آباد)، زنجان (شهرستان خدابنده)، کردستان (شهرستان مریوان) و همدان (شهرستان نهاوند) که بیشترین سطح زیر کشت داشتند (جدول ۱)، بر اساس دستورالعمل انجمن بین-المللی آزمون بذر (ISTA, 2003) 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.

جدول ۱- مشخصات جغرافیایی نمونه‌های جمع آوری‌شده

Table 1. Geographic characteristics of collected samples

استان Province	شهرستان County	طول جغرافیایی (شرقی) Longitude	عرض جغرافیایی (شمالی) Latitude
گلستان Golestan	علی آباد Aliabad	54° 50' 23.0"	36° 55' 02.2"
زنجان Zanjan	خدابنده Khodabandeh	48° 34' 59.2"	36° 06' 07.4"
کردستان Kordestan	مریوان Marivan	46° 09' 52.8"	35° 30' 39.1"
همدان Hamadan	نهاوند Nahavand	48° 21' 40.4"	34° 12' 35.2"

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی ریخت‌شناسی جدایه‌های قارچی

جهت جداسازی جدایه‌های قارچی پس از ضدعفونی بذور با محلول رقیق‌شده هیپوکلریت سدیم (حاوی یک درصد کلر فعال) به‌مدت یک دقیقه غوطه‌ور شدند و در نهایت، سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو شدند. پس از خشک‌شدن بذور روی کاغذ صافی سترون، بذور در سطح تشتک‌های پتری (به قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت عمومی سیب‌زمینی دکستروز آگار (Booth, 1977) کشت و در اتاقک رشد با دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و دوره نوری متناوب، ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی قرار گرفت (Nirenberg, 1976) و بدین ترتیب جدایه‌ها جداسازی شدند. جدایه‌های قارچی با استفاده از روش نوک ریسه و تک اسپور کردن روی محیط کشت آب آگار دو درصد خالص‌سازی شدند (Nelson *et al*., 2006; Booth, 1977). شناسایی قارچ‌ها بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی، میکروسکوپی و کلیدهای شناسایی معتبر انجام گردید (Simmons, 2007; Leslie and Summerell, 2006).

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای تأیید گونه‌های شناسایی‌شده بر اساس مشخصات ریخت‌شناختی از آغازگرهای اختصاصی گونه‌ها که در

جدول ۲ ارائه شده‌اند، استفاده شد (Kordalewska *et al*., 2015; Mishra *et al*., 2003). اختصاصی‌بودن هر آغازگر به‌وسیله انجام تجزیه و تحلیل BLAST در NCBI مورد تأیید قرار گرفت. برای تهیه میسلیوم مورد نیاز جهت استخراج DNA، جدایه‌های قارچی در ظروف ارلن مایر محتوی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز براث به‌مدت ۱۰ روز در داخل دستگاه انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵±۲ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. توده میسلیومی رشدیافته با پمپ خلاء، قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن سترون جمع‌آوری و با آب مقطر سترون شستشو شدند. پس از آبگیری کامل، توده میسلیومی برداشت و به درون میکروتیوب‌های استریل ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل شد. میکروتیوب‌های حاوی میسلیوم تا مرحله استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای استخراج DNA از جدایه‌های قارچ از کیت Genomic DNA isolation kit IV ساخت شرکت DENA Zist Asia ایران با توجه به دستورالعمل شرکت سازنده استفاده شد. به‌منظور تعیین کمیت و کیفیت DNA استخراج‌شده، از دستگاه نانودراب اسپکتروفتومتری (NanoDrop 2000; Spectophotometer, Thermo Scientific, Wilmington, USA) و ژل آگارز استفاده شد. چرخه دمایی مورد استفاده به‌طور کلی با توجه به نوع آغازگرها تعیین گردید (جدول ۲). اجزای واکنش زنجیره‌ای پلیمراز شامل ۷/۵ میکرولیتر آب، ۱۲/۵ میکرولیتر PCR Master Mix (Pars Tous, Iran)، DNA با غلظت ۵۰ $ng.\mu L^{-1}$ و ۱۰ Pmol آغازگر رو به جلو و آغازگر برگشتی در حجم کل ۲۵ میکرولیتر بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از دستگاه ترموسایکلر مدل Biometra (Germany) انجام شد. هر آزمایش شامل کنترل مثبت (DNA یک جدایه شناخته‌شده) و کنترل‌های منفی (یک واکنش PCR بدون DNA) بود. در نهایت محصولات واکنش زنجیره‌ای پلیمراز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد و از طریق الکتروفورز به‌مدت ۴۰ دقیقه با ولتاژ ۸۰ ولت عبور داده شدند. ردیابی باندها DNA با استفاده از رنگ آمیزی با فلورسنت سایبرگرین (SYBR® Green) و سپس عکس‌برداری از ژل با استفاده از دستگاه Gel Documentation مدل Syngene Gene Flash Bio (USA) انجام شد. بر اساس طول قطعات حاصل از تکثیر قطعات DNA روی ژل، جدایه‌های مختلف از نظر ژنتیکی تفکیک شدند.

جدول ۲- توالی آغازگرها، اندازه محصول و دمای اتصال مورد استفاده برای شناسایی گونه‌های *Alternaria* و *Fusarium*

Table 2. Primers sequences, product sizes and annealing temperatures used for identify species of *Alternaria* and *Fusarium*

گونه‌ها **Species**	آغازگر **Primer**	توالی آغازگر (۳'→۵') **Sequences (5'-3')**	اندازه قطعه **Product size (bp)**	شرایط واکنش زنجیره‌ای پلیمراز **PCR conditions**	منبع **Reference**
Alternaria alternata	AaF	GTGCCTTCCCCCAAGGTCTCCG	184	65°C / 30s	(Kordalewska *et al*., 2015)
	AaR	CGGAAACGAGGTGGTTCAGGTC			
Fusarium oxysporum	FOF	ACATACCACTTGTTGCCTCG	340	58 °C / 30 s	(Mishra *et al*., 2003)
	FOR	CGCCAATCAATTTGAGGAACG			

ارزیابی قارچ‌های بذرزاد روی شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه بذر

آزمون جوانه‌زنی استاندارد بر اساس دستورالعمل انجمن بین المللی آزمون بذر انجام شد (Anonumous, 2014). برای این منظور تعداد ۴۰۰ بذر (چهار تکرار با ۱۰۰ عدد بذر) از نمونه‌های بذری علی آباد، نهاوند، خدابنده و مریوان به‌صورت تصادفی انتخاب و روی کاغذ صافی واتمن در داخل تشتک‌های پتری قرار داده شده و به اتاقک رشد در دمای ۱±۲۴ درجه سلسیوس و با دوره نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی منتقل شدند (Moradi and Rezvani-Moghadam, 2010). پس از ۱۴ روز، میانگین درصد جوانه‌زنی (خروج ریشه‌چه حداقل دو میلی‌متر یا بیش‌تر به‌عنوان معیار جوانه‌زنی)، میانگین درصد گیاهچه‌های عادی و غیرعادی (تغییر شکل‌یافته و بیمار)، میانگین ارتفاع گیاهچه و ریشه‌چه، میانگین وزن‌تر و وزن خشک (با قراردادن در آون به‌مدت ۲۴ ساعت در ۷۵ درجه سلسیوس) اندازه‌گیری شد. همچنین شاخص طولی و وزنی بنیه با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه گردید (Nautiyal, 2007).

$$SVIL=(Sl+Rl)\times GP \quad \text{(رابطه ۱)}$$

که در این رابطه SVIL شاخص طولی بنیه، Sl و Rl به‌ترتیب میانگین طول ساقه‌چه و ریشه‌چه و GP، درصد جوانه‌زنی نهایی می‌باشند.

SVIW=(Sw)×GP (رابطه ۲)

که در این رابطه SVIW شاخص وزنی بنیه، Sw وزن خشک گیاهچه و GP، درصد جوانه‌زنی نهایی می‌باشند.

آزمون‌های بیماری‌زایی و سنجش قدرت تهاجم جدایه‌ها

مواد گیاهی و آماده‌سازی مایه تلقیح حاوی جدایه‌های قارچ

جهت ارزیابی بیماری‌زایی جدایه‌ها، بذر توده‌ی بومی رازیانه که فاقد هر گونه آلودگی طبیعی بود از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال تهیه شد. پس از ضدعفونی سطحی، بذور به‌مدت ۵ روز در انکوباتور روی کاغذ صافی سترون مرطوب در دمای ۱±۲۴ درجه سلسیوس قرار گرفتند. هر تیمار دارای چهار تکرار در هر بار انجام آزمایش بود و آزمایش دو بار تکرار شد. سپس در هر گلدان پلاستیکی (قطر ۱۵ سانتی‌متر) پنج بذر جوانه‌زده کشت و در شرایط دمایی ۳±۲۷ 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. مایه تلقیح جدایه‌های *Alternaria* و *Fusarium* با استفاده از روش شرح داده‌شده توسط مولر و همکاران (Müller *et al*., 2012) تهیه شد.

اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها

جهت اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی، اسپورپاشی روی گیاهچه به‌میزان ۵۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور (۱×۱۰^{۵} اسپور در هر میلی‌لیتر) حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۲۰ در مرحله گیاهچه چهار هفته‌ای رازیانه بر اساس روش شرح داده‌شده توسط شی و همکاران (Shi *et al*., 2016) و کویک و همکاران (Koike *et al*., 2011) انجام شد. گیاهان شاهد با آب مقطر سترون اسپری شدند. پس از مایه‌زنی، گیاهان به مدت ۴۸ ساعت در محفظه‌ای با رطوبت ۹۸ درصد نگهداری و سپس به گلخانه با دمای ۱۸ تا ۲۵ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از هفت روز علایم آلودگی ناشی از جدایه‌های *Alternaria* به‌صورت نکروز در برگ و ساقه و ناشی از جدایه‌های *Fusarium* به‌صورت پوسیدگی قهوه‌ای در ساقه و کلروز برگی مشاهده و شدت بیماری‌ها درجه‌بندی شد (Pryor and Gilbertson, 2002; Gour and Agrawal, 1988) و شاخص بیماری‌زایی با رابطه زیر محاسبه گردید.

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

n_0: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۰ آلودگی، n_1: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۱ آلودگی، n_2: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۲ آلودگی؛ n_3: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۳ آلودگی؛ n_4: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۴ آلودگی؛ n_5: تعداد گیاهچه‌ها با درجه ۵ آلودگی؛ N: تعداد کل گیاهچه‌ها

سنجش قدرت تهاجم جدایه‌ها

میزان قدرت تهاجم جدایه‌های قارچی روی گیاهچه با استفاده از روش شرح داده‌شده توسط طاهری (Taheri, 2019) و خالدی و همکاران (Khaledi *et al*., 2017) مورد بررسی قرار گرفت. میزان قدرت تهاجم جدایه‌ها بر اساس مدت زمان ظهور علایم بیماری پس از مایه‌زنی توسط جدایه‌ها تعیین شد.

سنجش فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده توسط جدایه‌ها

میزان فعالیت آنزیم‌های پکتیناز، سلولاز، زایلاناز و لیپاز تولیدشده توسط جدایه‌های قارچی‌مورد ارزیابی قرار می گیرد. برای استخراج آنزیم پکتیناز توسط جدایه‌های قارچی از محیط کشت مایع حاوی پکتین (Khairy *et al*., 1964; MacMillan and Voughin, 1964) استفاده و میزان فعالیت آنزیم در طول موج ۵۴۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. شاهد منفی شامل محیط کشت بدون پکتین به‌همراه هر کدام از جدایه‌های قارچی می‌باشد. فعالیت پکتیناز بر اساس میزان کاهش اسید D-گالاکترونیک اندازه‌گیری شده و تعیین مقدار اسید D-گالاکترونیک با استفاده از روش رنگ‌سنجی اسید دی-نیتروسالیسیلیک انجام شد. واحد فعالیت آنزیمی پکتیناز، با توجه به منحنی استاندارد، تحت عنوان مقدار آنزیمی که یک میکرومول اسید گالاکترونیک را در هر دقیقه از پکتین‌های دیواره آزاد می‌کند، در نظر گرفته شد (Colowich, 1995).

برای استخراج آنزیم سلولاز توسط جدایه‌های قارچی از محیط کشت مایع کربوکسی متیل سلولز (Abdel-Razik, 1970)، استفاده و میزان فعالیت آنزیم در طول موج ۵۵۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. شاهد منفی

شامل محیط کشت بدون کربوکسی‌متیل سلولز به‌همراه هر کدام از جدایه‌های قارچی می‌باشد. میزان فعالیت آنزیم سلولاز بر اساس جذب در غلظت‌های مختلف گلوکز با معرف اسید دی‌نیتروسالیسیلیک اندازه‌گیری شد و یک واحد از فعالیت سلولاز به‌عنوان مقدار آنزیمی که ۰/۱ میکرومول گلوکز را در هر دقیقه طی واکنش هیدرولیز تولید می‌کند، تعیین شد (Wood and Bhat, 1998).

برای استخراج آنزیم پکتیناز توسط جدایه‌های قارچی از محیط کشت مایع زایلان جودوسر (Miller, 1959) استفاده و میزان فعالیت آنزیم در طول موج ۵۴۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. شاهد منفی شامل محیط کشت بدون زایلان جودوسر به‌همراه هر کدام از جدایه‌های قارچی می‌باشد. یک واحد از فعالیت زایلاناز به‌صورت مقدار آنزیمی که ۱ میکرومول زایلوز را در هر دقیقه تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس آزاد می‌کند، اندازه-گیری شد (Bailey and Biely 1992).

برای استخراج آنزیم لیپاز توسط جدایه‌های قارچی از محیط کشت مایع روغن زیتون (Ortega *et al*., 2013) استفاده و میزان فعالیت آنزیم در طول موج ۴۴۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفت. شاهد منفی شامل محیط کشت بدون روغن زیتون به‌همراه هر کدام از جدایه‌های قارچی می‌باشد. میزان فعالیت آنزیم لیپاز بر اساس جذب در غلظت‌های مختلف پی‌نیتروفنل‌پالمیتات در ۳۷ درجه سلسیوس در ۵۰ میلی‌مولار بافر Tris-HCl (pH 7) اندازه‌گیری‌شده و یک واحد از فعالیت لیپاز به‌عنوان مقدار آنزیمی که ۱ میکرومول پی نیتروفنل‌پالمیتات را در هر دقیقه طی واکنش هیدرولیز کاتالیز تولید می‌کند، مشخص گردید (Ortega *et al*., 2013).

ویال‌ها به‌مدت ۱۰ روز در دمای ۱±۲۷ درجه سلسیوس روی شیکر دوار با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. با توجه به مطالعات قبلی، فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی در شرایط آزمایشگاهی در مدت ۱۰ روز پس از تلقیح مورد بررسی قرار گرفت (Ortega *et al*., 2013; Zhao *et al*., 2013; Kikot *et al*., 2009). میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ۲۴ ساعت پس از تلقیح مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش برای هر آنزیم چهار تکرار داشت و آزمایش دو بار تکرار شد.

محاسبات آماری

آنالیز آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف پس از نرمال‌سازی داده‌ها با تبدیل لگاریتمی در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار با استفاده از نرم‌افزار SAS (version 9.2) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار در سطح $P < 0.05$ مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Office Excel 2013 استفاده گردید.

نتایج

نتایج درصد جوانه‌زنی بذور تحت تأثیر قارچ‌های بذرزاد در آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که درصد جوانه‌زنی بذور در نمونه‌ها از ۲۸/۲۵ تا ۶۴ درصد متغیر بود (جدول ۳). میانگین درصد گیاهچه‌های غیرعادی تغییر شکل‌یافته و بیمار در نمونه‌ها به‌ترتیب کم‌تر از ۸/۵ درصد و ۴/۲۵ درصد است. بالاترین درصد گیاهچه عادی مربوط به نمونه بذرهای مزارع مریوان استان کردستان با میزان آلودگی طبیعی کم‌تر از ۱۰ درصد می‌باشد. نتایج حاصل از آزمون استاندارد جوانه‌زنی نشان داد که شاخص بنیه گیاهچه از جمله شاخص طولی بنیه از ۲۰۴/۱۳ تا ۸۷۹/۶۸ و شاخص وزنی بنیه از ۰/۶۴ تا ۲/۱۸ متغیر بود (جدول ۳). بالاترین و کم‌ترین شاخص بنیه گیاهچه به-ترتیب متعلق به نمونه‌های بذر علی‌آباد و مریوان از استان گلستان و کردستان بود. در میان توده‌های بذری مختلف مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه مورد ارزیابی مشاهده شد. میانگین طول ساقه‌چه از ۳/۴۷ تا ۶/۱۲ سانتی‌متر و طول ریشه‌چه از ۳/۷۵ تا ۶/۶۰ سانتی‌متر متغیر بود. همچنین وزن‌تر گیاهچه از ۰/۲۵ تا ۰/۳۷ گرم و وزن خشک از ۰/۰۲۲ تا ۰/۰۳۷ گرم متغیر بود (جدول ۳).

بر اساس مشاهدات ریخت‌شناسی در مجموع ۳۳ جدایه از توده‌های بذری رازیانه در استان‌های گلستان، زنجان، همدان و کردستان جداسازی شدند که متعلق به دو جنس قارچ *Alternaria* و *Fusarium* بودند. بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی به‌ترتیب با استفاده از کلیدهای شناسایی و آغازگرهای اختصاصی، بیست جدایه متعلق به *A. alternata* و سیزده جدایه متعلق به *F. oxysporum* شناسایی شدند (جدول ۴). نتایج اولیه شناسایی ریخت‌شناسی جدایه‌ها توسط آغازگرهای اختصاصی تأیید شد (شکل ۱، جدول ۴).

گونه‌های *A. alternate* و *F. oxysporum* برای اولین بار به‌عنوان قارچ‌های بذرزاد رازیانه در ایران جداسازی و گزارش می‌شوند.

جدول ۳- مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه در توده‌های بذری رازیانه تحت تأثیر آلودگی طبیعی قارچی

Table 3. Means comparison of germination and vigor indices as affected by natural fungal infection in fennel seed populations

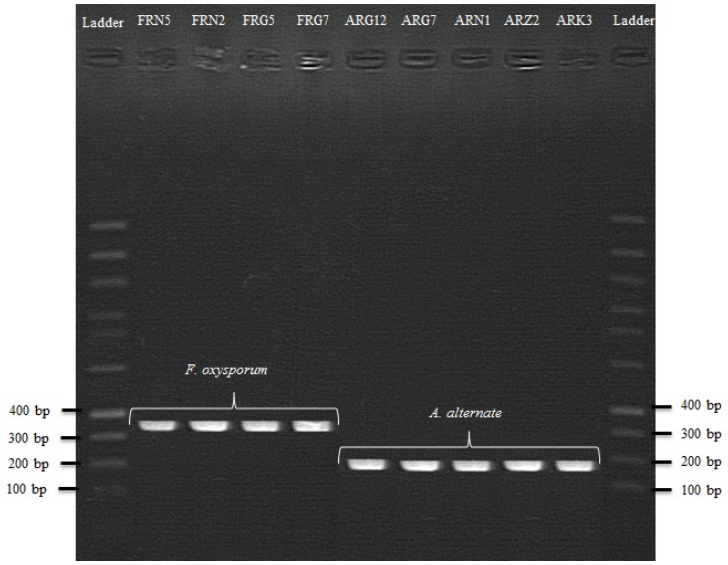
محل نمونه‌برداری Sample site	NFI	GP	DS	SD	SL	RL	FW	DW	SLVI	SWVI
Aliabad	20	28.25 d	4.25 a	8.50 a	3.47 d	3.75 d	0.25 d	0.022 d	204.13 d	0.64 d
Mariwan	3	70.50 a	0.25 b	0.50 b	6.12 a	6.60 a	0.37 a	0.037 a	879.68 a	2.64 a
Nahavand	6	55.50 c	0.75 b	1.00 b	4.42 c	4.90 c	0.31 d	0.031 c	518.03 c	1.75 c
Khodabandeh	4	64.00 b	0.50 b	0.75 b	5.42 b	6.07 b	0.35 b	0.034 b	740.95 b	2.18 b
LSD (0.05)	-	3.63	1.01	1.82	2.92	2.18	0.01	0.002	-	-

NFI = Number of fungal isolates, GP = Germination percent, DS = Deformed seedling, SD = Seedling disease, SL = Shoot length, RL = Root length, FW = Fresh weight, DW = Dry weight, SLVI = Seedling length vigor index and SWVI = Seedling weight vigor index. Different letters indicate significant differences according to LSD analysis using SAS software (p = 0.05). Each experiment was repeated two times with similar results.

تشخیص گونه *A. alternate* بر اساس ویژگی‌های کلیدی ذکرشده توسط سیمونز (Simmons, 2007) انجام گرفت. کنیدیوم‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن، مخروطی یا گلابی وارونه یا تخم‌مرغی شکل، کوچک به ابعاد ۱۸-۹ × ۶۳-۲۰ میکرومتر، فاقد نوک یا با نوکی کوتاه بودند. کنیدیوم بر قهوه‌ای روشن تا سبز زیتونی، به ابعاد ۳/۵-۳ × ۶۰-۲۵ میکرومتر، راست یا خمیده، دارای دیواره، با ۸-۳ کنیدیوم که در یک زنجیره روی یکدیگر تشکیل شده بودند. طبق بررسی‌های مورفولوژیک ۲۰ جدایه *A. alternate* از بذر رازیانه جداسازی و شناسایی‌شده بودند که با استفاده از آغازگرهای AaF/AaR به روش مولکولی تأیید شد (شکل ۱). این گونه برای اولین بار در ایران از بذر رازیانه گزارش شده است.

مشخصات گونه *F. oxysporum* منطبق بر مشخصات ذکر شده توسط لزلی و سومرل (Leslie and Summerell, 2006) بود. رنگ پرگنه قارچ از سفید تا بنفش کم‌رنگ متغیر بوده و اسپوردوکیوم‌ها به رنگ نارنجی کم‌رنگ به‌فراوانی تشکیل گردیدند. ماکروکنیدیوم‌ها به ابعاد ۵/۷-۳/۱ × ۵۶-۳۲ میکرومتر، معمولاً با سه دیواره عرضی بوده که سلول انتهایی به‌صورت منحنی و سلول پایه به‌شکل پا با پاشنه بود. میکروکنیدیوم ها معمولاً یک سلولی تخم‌مرغی و بر روی مونوفیالیدهای کوتاه در سرهای دروغین تشکیل شدند. کلامیدوسپورها به‌فراوانی در هیف‌ها معمولاً به‌صورت تکی یا جفتی تشکیل شدند. نتایج به‌دست‌آمده از تجزیه و تحلیل مولکولی با استفاده از آغازگرهای FOF/FOR نشان داد که ۱۳ جدایه جداسازی و شناسایی‌شده به‌روش ریخت‌شناسی از بذر رازیانه به‌عنوان *F. oxysporum* مورد تأیید است (شکل ۱). این گونه نیز برای اولین بار در ایران از بذر رازیانه گزارش شده است.

بذور آلوده به قارچ در تمامی نمونه‌های بذری رازیانه نمونه‌برداری‌شده از مناطق مختلف مشاهده شد. از نظر فراوانی جدایه‌های قارچی جداسازی‌شده در مناطق مورد بررسی، توده بذری علی‌آباد از استان گلستان بالاترین فراوانی را نشان دادند. نتایج نشان داد که در میان گونه‌های شناسایی‌شده در این مطالعه که به تفکیک با توجه به محل جمع‌آوری در جدول ۴ مشخص شده‌اند، گونه *A. alternate* در تمام توده‌های بذری نمونه‌برداری شده مشاهده و شایع‌ترین گونه شناسایی‌شده در مزارع رازیانه می‌باشد. جدایه‌های گونه *F. oxysporum* از توده‌های بذری علی‌آباد و نهاوند استان‌های گلستان و همدان جداسازی شدند. تراکم نسبی گونه‌های *A. alternate* و *F. oxysporum* شناسایی‌شده در نمونه‌های بذری رازیانه به‌ترتیب ۶۰/۶ درصد و ۳۹/۴ درصد بود. مقایسه داده‌های به‌دست‌آمده از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *Alternaria* و *Fusarium* روی گیاهچه در جدول ۴ ارائه شده است. تمامی جدایه‌های *Alternaria* و *Fusarium* شناسایی‌شده قادر به بیماری زایی روی گیاهچه‌های رازیانه نبودند. نتایج حاصل از بررسی بیماریزایی جدایه‌های مختلف *A. alternata* و *F. oxysporum* نشان داد که حدود ۸۵ درصد جدایه‌ها بیماریزا و ۱۵ درصد جدایه‌های بیماریزا نبودند.



شکل ۱- شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچ‌های *Alternaria alternate* و *Fusarium oxysporum* جداسازی‌شده از نمونه‌های بذری رازیانه

Figure 1. Molecular identification of fungal isolates *Alternaria alternate* and *Fusarium oxysporum* isolated from Fennel seed samples.

باندها به‌ترتیب ARG12، ARG7، ARN1، ARZ2 و ARK3 متعلق به *A. alternate* با آغازگر AaF/AaR؛ FRN5، FRN2، FRG5 و FRG7 متعلق به *F. oxysporum* با آغازگر FOF/FOR؛ (Ladder 100 bp فرمنتاز)

The bands ARG12, ARG7, ARN1, ARZ2 and ARK3 belonging to *A. alternate* with AaF/AaR primers, respectively; FRN5, FRN2, FRG5 and FRG7 belonging to *F. oxysporum* with FOF/FOR primers; (Ladder 100 bp Fermentas)

جدایه‌های مورد بررسی به گروه‌های بیماری‌زا، کم-بیماری‌زا و غیربیماری‌زا دسته‌بندی شدند. آزمون بیماری-زایی نشان داد که شاخص بیماری برای جدایه‌های بیماری‌زا گونه *A. alternate* از ۰/۱۴±۷۳/۵۸ تا ۰/۰۶±۶/۳۵ و برای جدایه‌های بیماری‌زا گونه *F. oxysporum* از ۰/۱۸±۵۷/۹۳ تا ۰/۰۷±۸/۳۰ متغیر بود. همچنین کم‌ترین شاخص بیماری مربوط به جدایه ARK2 (از گونه *A. alternate*) و همچنین بیش‌ترین میزان آن مربوط به جدایه ARG7 (از گونه *A. alternate*) بود (جدول ۴).

قدرت تهاجم جدایه‌های *Alternaria* و *Fusarium* مورد مطالعه متفاوت بود (جدول ۴). نتایج آزمون قدرت تهاجم روی گیاهچه‌ها نشان داد که بیش‌ترین میزان قدرت تهاجم مربوط به جدایه ARG7 بود که اولین علایم بیماری را ۱۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی به‌صورت لکه‌های کوچک نکروزی روی برگ و ساقه نشان می‌دهند (جدول ۴). اولین علایم بیماری ناشی از جدایه‌های *Fusarium* به‌صورت پوسیدگی قهوه‌ای در ساقه و کلروز برگی، ۱۳۲ ساعت پس از مایه‌زنی توسط جدایه FRG7 ظاهر می‌شود که نشان‌دهنده بیش‌ترین قدرت تهاجم این جدایه در مقایسه با سایر جدایه‌های *Fusarium* بود. کم‌ترین قدرت تهاجم در میان جدایه‌های *Alternaria* و *Fusarium* به-ترتیب مربوط به جدایه ARK2 (۱۹۸ ساعت پس از مایه‌زنی) و FRN2 (۱۹۲ ساعت پس از مایه‌زنی) بود.

بررسی فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده توسط جدایه‌های *Alternaria* و *Fusarium* نشان داد که تمامی جدایه‌های بیماری‌زا و کم بیماری‌زا قادر به تولید آنزیم‌های سلولز، زایلاناز، پکتیناز و لیپاز، به-عنوان اصلی‌ترین آنزیم‌های هیدرولیزکننده دیواره سلولی بودند. تمامی جدایه‌های بیماری‌زا و کم بیماری‌زا قادر به تولید آنزیم‌های سلولز و زایلاناز بودند در حالی‌که، جدایه‌های غیربیماری‌زا قادر به تولید آنزیم‌های سلولز و زایلاناز نبوده و فقط مقادیر کمی پکتیناز و لیپاز را در مقایسه با جدایه‌های بیماری‌زا تولید می‌کند. حداکثر سطح فعالیت سلولاز، زایلاناز، پکتیناز و لیپاز در بسیاری از جدایه‌های مورد بررسی به‌ترتیب در ۷۲، ۹۶، ۱۴۴ و ۱۹۲ ساعت پس از کشت در محیط مایع، مشاهده شد. پس از آن، با گذشت زمان فعالیت این آنزیم‌ها کاهش یافت (شکل ۲).

جدول ۴- مشخصات قارچ‌های بذرزاد جداسازی‌شده از نمونه‌های بذری رازیانه بر اساس محل نمونه‌برداری، میزان بیماری-زایی، قدرت تهاجم و حداکثر فعالیت آنزیم‌های ترشح‌شده

Table 4. Characteristics of seed-borne fungi isolated from Fennel seed samples based on sampling site, pathogenicity, aggressiveness and maximum of secreted enzymes activity

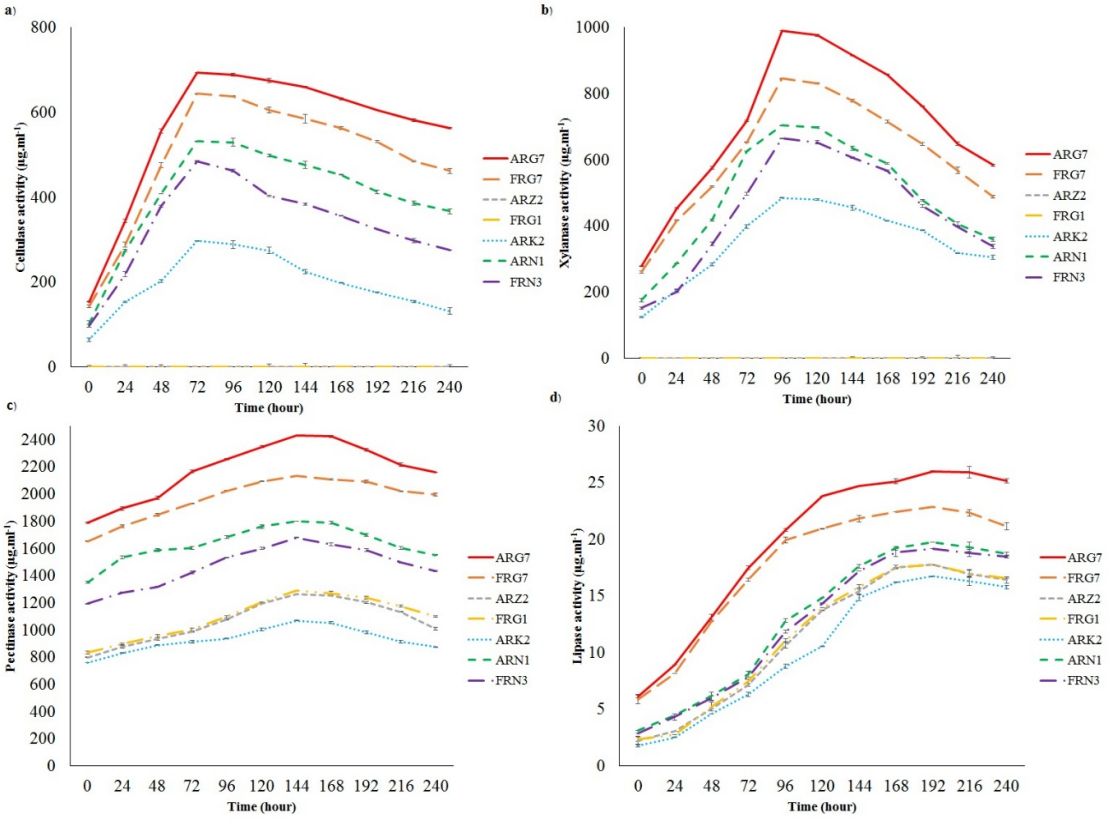
1	2	3	4	5	Maximum of enzyme activity (µg.mL^{-1}) حداکثر فعالیت آنزیمی			
					Cellulase سلولاز (72 hpc)	Xylanase زایلاناز (96 hpc)	Pectinase پکتیناز (144 hpc)	Lipase لیپاز (192 hpc)
ARG1	A	G	0 ± 0.0 x	0	0 ± 0.0 y	0 ± 0.0 w	1132 ± 1.29 y	17.04 ± 0.01 q
ARG2	A	G	0 ± 0.0 x	0	0 ± 0.0 y	0 ± 0.0 w	1268 ± 0.41 x	17.79 ± 0.01 p
ARG3	A	G	13.35 ± 0.06 s	180	355.5 ± 0.96 u	576.5 ± 0.65 s	1347.5 ± 0.29 u	18.27 ± 0.01 n
ARG4	A	G	38.55 ± 0.10 h	144	560.25 ± 0.63 g	737 ± 0.71 f	1846.25 ± 0.48 i	20.04 ± 0.01 fg
ARG5	A	G	24.13 ± 0.18 o	162	494 ± 0.91 o	691 ± 0.71 k	1686.25 ± 2.21 o	19.39 ± 0.02 i
ARG6	A	G	45.58 ± 0.17 e	144	606.25 ± 1.38 e	793 ± 0.91 d	2041.75 ± 0.48 e	21.49 ± 0.25 e
ARG7	A	G	73.58 ± 0.14 a	120	693.75 ± 0.63 a	990 ± 0.91 a	2431.75 ± 1.89 a	26.03 ± 0.02 a
ARG8	A	G	13.50 ± 0.12 s	180	362.25 ± 1.25 t	594.75 ± 0.25 q	1404.5 ± 0.96 t	18.30 ±0.01 m
ARG9	A	G	18.95 ±0.29 q	168	407.25 ± 0.85 q	640.5 ± 0.65 n	1597.5 ± 2.02 q	19.06 ± 0.01 k
ARG10	A	G	33.28 ± 0.20 k	150	535.75 ± 0.48 k	720.25 ± 0.25 h	1816.5 ± 0.65 k	19.92 ± 0.00 g
ARG11	A	G	35.78 ± 0.27 i	150	545.75 ± 0.48 i	721.25 ± 1.11 h	1844.5 ± 0.96 ij	19.94 ±0.00 g
ARG12	A	G	54.08 ± 0.17 c	132	638.5 ± 0.96 c	839 ± 0.71 c	2165 ± 1.08 b	22.53 ± 0.01 c
FRG1	F	G	0 ± 0.0 x	0	0 ± 0.0 y	0 ± 0.0 w	1294.25 ± 0.25 w	17.79 ± 0.01 p
FRG2	F	G	11.48 ± 0.14 t	180	354.75 ± 1.03 u	581.5 ± 1.55 r	1350.5 ± 1.19 u	18.15 ± 0.01 n
FRG3	F	G	27.95 ± 0.16 m	156	512 ± 0.71 m	696.25 ± 0.75 j	1762.75 ± 1.11 m	19.73 ± 0.01 h
FRG4	F	G	43.00 ± 0.20 f	144	598.25 ± 1.25 f	787.75 ± 0.48 e	2001 ± 2.86 f	19.95 ± 0.00 fg
FRG5	F	G	0 ± 0.0 x	0	0 ± 0.0 y	0 ± 0.0 w	1295.75 ± 0.25 w	17.81 ± 0.02 p
FRG6	F	G	38.35 ± 0.06 h	144	558 ± 0.91 h	722.25 ± 1.11 h	1890.5 ± 0.65 g	19.98 ± 0.00 fg
FRG7	F	G	57.93 ± 0.18 b	132	644 ± 0.71 b	845.5 ± 1.04 b	2135 ± 1.08 c	22.88 ±0.01 b
FRG8	F	G	26.28 ± 0.09 n	156	503 ± 0.41 n	671.75 ± 1.11 l	1701.25 ± 1.65 n	19.78 ±0.00 h
ARK1	A	M	10.55 ± 0.05 u	180	343.5 ± 0.65 v	572 ± 0.71 t	1301 ± 0.41 v	18.02 ±0.01 o
ARK2	A	M	6.35 ± 0.06 w	198	297.25 ± 1.31 x	485 ± 0.82 v	1070 ± 2.38 z	16.75 ±0.02 r
ARK3	A	M	18.78 ± 0.17 q	168	396.25 ± 1.03 r	635.75 ± 0.48 o	1593 ± 0.71 r	18.76 ±0.01 l
ARN1	A	N	31.23 ± 0.09 l	150	531.75 ± 0.25 l	704 ± 0.71 i	1802 ± 0.58 l	19.75 ± 0.00 h
FRN1	F	N	15.40 ± 0.06 r	174	368.75 ± 0.85 s	610.75 ± 1.11 p	1416 ± 1.08 s	18.36 ± 0.01 m
FRN2	F	N	8.30 ± 0.07 v	192	330.5 ± 0.65 w	544.25 ±0.48 u	1266.75 ± 0.63 x	17.76 ± 0.01 p
FRN3	F	N	21.20 ± 0.07 p	162	485.25 ± 0.63 p	664.75 ± 0.85 m	1680.75 ± 1.93 p	19.20 ±0.01 j
FRN4	F	N	34.28 ± 0.07 j	150	538 ± 0.41 j	720.25 ± 0.75 h	1841.5 ± 0.65 j	19.77 ±0.01 h
FRN5	F	N	47.33 ± 0.06 d	144	609.25 ± 0.63 d	795 ± 0.41 d	2047.75 ± 1.31 d	21.90 ±0.01 d
ARZ1	A	K	39.23 ± 0.09 g	144	561.25 ± 0.48 g	726 ± 0.41 g	1886.75 ± 0.85 h	20.06 ± 0.01 f
ARZ2	A	K	0 ± 0.0 x	0	0 ± 0.0 y	0 ± 0.0 w	1266.25 ± 0.75 x	17.77 ± 0.01 p
ARZ3	A	K	10.40 ± 0.11 u	180	343 ± 0.41 v	571.75 ± 0.63 t	1300.75 ± 0.48 v	18.01 ± 0.01 o
ARZ4	A	K	24.35 ± 0.06 o	162	495 ± 0.58 o	691.5 ± 0.29 k	1686 ± 0.91 o	19.41 ± 0.01 i
LSD (0.05)			1.98	-	2.12	2.04	3.45	0.12

A = *Alternaria alternate*, F = *Fusarium oxysporum*, G = Gorgan, M = Mariwan, N = Nahavand, K = Khodabandeh, DI = disease index, hpi = hours post inoculation, hpc = hours post-culturing, Average ± standard error, Different letters indicate significant differences according to LSD analysis using SAS software (p = 0.05). Each experiment was repeated two times with similar results.

۱- کد جدایه، ۲- قارچ، ۳- محل نمونه‌برداری، ۴- بیماری‌زایی، ۵- قدرت تهاجم

1. Isolate code, 2. Fungi, 3. Sample site, 4. Pathogenicity (DI), 5. Aggressiveness (hpi)

در زمانی که بیش‌تر جدایه‌ها حداکثر سطح فعالیت آنزیمی را نشان می‌دهند، سطح فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی در میان جدایه‌های *Alternaria* برای سلولاز از ۲۹۷/۲۵ تا ۶۹۳ $\mu g.ml^{-1}$، زایلاناز از ۴۸۵ تا ۹۹۰ $\mu g.ml^{-1}$، پکتیناز از ۱۰۷۰ تا ۲۴۳۱/۷۵ $\mu g.ml^{-1}$ و لیپاز از ۱۶/۷۵ تا ۲۶/۰۳ $\mu g.ml^{-1}$ مشاهده شد. همچنین سطح فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی در میان جدایه‌های *Fusarium* برای سلولاز از ۳۳۰/۵۰ تا ۶۴۴ $\mu g.ml^{-1}$، زایلاناز از ۵۴۴/۲۵ تا ۸۴۵/۵۰ $\mu g.ml^{-1}$، پکتیناز از ۱۲۶۶/۷۵ تا ۲۱۳۵ $\mu g.ml^{-1}$ و لیپاز از ۱۷/۷۶ تا ۲۲/۸۸ $\mu g.ml^{-1}$ مشاهده شد (جدول ۴). تجزیه و تحلیل آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی نشان داد که میزان حداکثر فعالیت هر آنزیم برای جدایه‌های مختلف قارچ‌های *Alternaria* و *Fusarium* متفاوت بود (شکل ۲).



شکل ۲- فعالیت‌های آنزیم مخرب دیواره سلولی ترشح شده توسط برخی جدایه‌های *Alternaria alternate* و *Fusarium oxysporum*، فعالیت سلولاز (a)، فعالیت زایلاناز (b)، فعالیت پکتیناز (c) و فعالیت لیپاز (d).

میانگین داده‌ها ± خطای استاندارد ارائه شده‌اند، آزمایش دو بار با نتایج مشابه تکرار شد. جدایه‌های ARG7، ARZ2، ARK2 و ARN1 متعلق به *A. alternate*؛ جدایه‌های FRG7، FRG1 و FRN3 متعلق به *F. oxysporum*؛ ARG7 ؛ ARZ2 ؛ ARK2 ؛ ARN1 ؛ FRG7 ؛ FRG1 ؛ FRN3

Figure 2. Activities of cell wall degrading enzymes secreted by some isolates of *Alternaria alternate* and *Fusarium oxysporum*, cellulase activity (a), xylanase activity (b), pectinase activity (c) and lipase activity (d).

Average ± standard error, each experiment was repeated two times with similar results. ARG7, ARZ2, ARK2 and ARN1 isolates belonging to *A. alternate*; FRG7, FRG1 and FRN3 isolates belonging to *F. oxysporum*; ARG7 ; ARZ2 ; ARK2 ; ARN1 ; FRG7 ; FRG1 ; FRN3

همچنین برای یافتن ارتباط احتمالی بین نوع و میزان آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی و میزان بیماری‌زایی جدایه‌ها، فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی تولیدشده توسط جدایه‌ها که دارای حداکثر یا حداقلی از بیماری‌زایی روی گیاهچه بودند، در بین جدایه‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. جدایه‌های ARG7 و FRG7 که بیش‌ترین میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم را در سنجش زیست‌سنجی روی گیاهچه نشان دادند، دارای سطح قابل ملاحظه‌ای از

فعالیت آنزیمی بودند. در حالی‌که، جدایه‌های ARK2 و FRN2 که دارای کم‌ترین میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم در گیاهچه بودند، کم‌ترین سطح فعالیت آنزیمی را نشان دادند (جدول ۴). با توجه به آن‌که جدایه‌های بیماری‌زا سطح بالایی از فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی را دارند و از طرفی آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز فقط توسط جدایه‌های بیماری‌زا و کم‌بیماری‌زا تولید می‌شوند، احتمالاً ارتباطی بین میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی به‌ویژه سلولاز و زایلاناز با میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌ها وجود دارد. (جدول ۴). در میان جدایه‌های تولیدکننده آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده، بالاترین سطح فعالیت مربوط به پکتیناز و پس از آن به‌ترتیب مربوط به زایلاناز، سلولاز و لیپاز مشاهده شد (جدول ۴).

بحث

نتایج آزمون جوانه‌زنی استاندارد نشان داد که در میان توده‌های بذری مورد بررسی اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های جوانه‌زنی از جمله درصد جوانه‌زنی، میانگین درصد گیاهچه‌های غیرعادی، طول ساقه‌چه و ریشه‌چه، وزن‌تر و خشک گیاهچه وجود دارد. آلودگی بذر به قارچ‌های بذرزاد به‌طور قابل‌توجهی روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی بذر تأثیر گذاشته و موجب کاهش کیفیت بذر به‌ویژه سلامت بذر می‌شوند. گاما و همکاران (Gama *et al*., 2014) گزارش کردند که کیفیت فیزیولوژیک بذر رازیانه تحت تأثیر *Alternaria* قرار گرفته و شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی کاهش می‌یابد. نتایج نشان داد که هرچه میزان فراوانی قارچ‌های بذرزاد بیماری‌زا در توده‌های بذری بیش‌تر باشد، تعداد گیاهچه‌های غیرطبیعی (تغییر شکل و بیمار) به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. مانگوند و همکاران (Mangwende *et al*., 2018) مشاهده کردند که بین میزان وقوع *A. alternata* و درصد گیاهچه‌های غیرطبیعی همبستگی مثبت وجود دارد. آلودگی بذور رازیانه به قارچ‌ها موجب کاهش درصد جوانه‌زنی می‌شود (Ben Salem *et al*., 2019). وجود گیاهچه‌های کوچک، ضعیف و غیرعادی، نشان‌دهنده ضعیف‌بودن بنیه گیاهچه می‌باشد. یکی از شاخص‌های تعیین‌کننده کیفیت بذر، شاخص بنیه است. بذرهایی که دارای بنیه قوی‌تری باشند، توانایی بالایی در تحمل تنش‌های زنده و غیر زنده دارند و ضمن داشتن درصد بالایی از جوانه‌زنی، قادرند گیاهچه های قوی و عادی تولید نمایند. گزارش‌های متعدد نشان می‌دهد که با افزایش آلودگی‌های ناشی از قارچ‌ها در بذرهای گیاهان مختلف شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی کاهش می‌یابد (Fatima and Khot, 2015; Suthar *et al*., 2014; Pant, 2011; Hashem *et al*., 2010; Browne, 2007) که با مشاهدات ما مطابقت دارد. در این پژوهش، در مجموع ۳۳ جدایه قارچی بذرزاد از توده‌های بذری رازیانه در استان‌های گلستان، زنجان، همدان و کردستان جداسازی و براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی‌شدند. این اولین گزارش در مورد شناسایی گونه‌های قارچی بذرزاد در توده‌های بومی بذری رازیانه در ایران است. بر اساس مشاهدات ریخت‌شناسی و بررسی‌های مولکولی جدایه‌های شناسایی‌شده به گونه‌های *A. alternate* و *F. oxysporum* تعلق داشتندکه این مشاهدات با گزارش‌های سایر محققان در ایتالیا (Aiello *et al*., 2020; D'Amico *et al*., 2008)، هند (Khare *et al*., 2014; Dwivedi *et al*., 2008)، عراق (Shaker and Alhamadany, 2015) و جمهوری چک (Odstrčilová *et al*., 2002) مطابقت دارند. تمام توده‌های بذری رازیانه مورد بررسی به‌صورت طبیعی تحت تأثیر آلودگی قارچی بودند. بر اساس مشاهدات، توده‌های بذری خدابنده و مریوان فاقد آلودگی به قارچ *F. oxysporum* بوده و میزان آلودگی آن‌ها به *A. alternate* نسبت به توده‌های بذری گرگان و نهاوند کم‌تر بود. مشاهدات محققین نشان داد که بیش‌ترین میزان آلودگی طبیعی قارچی در توده‌های بذری در منطقه علی-آباد و پس از آن در مناطق نهاوند، خدابنده و مریوان مشاهده شد. وجود آلودگی بالا در توده‌های بذری علی‌آباد به قارچ‌های بذرزاد را می‌توان به حساسیت توده بذری، شرایط محیطی، تناوب زراعی با گیاهان حساس و همچنین عدم ضدعفونی بذر نسبت داد.

نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان وقوع قارچ‌های بذرزاد در توده‌های بذری رازیانه به‌میزان ۸/۲۵ درصد در توده‌های بذری مناطق مورد بررسی بود. بر اساس مشاهدات، برای *A. alternata* میزان درصد فراوانی، تراکم نسبی و وقوع به‌ترتیب ۱۰۰ درصد، ۶۰/۶ درصد و ۵ درصد و برای *F. oxysporum* به‌ترتیب ۷۵ درصد، ۳۹/۴ درصد و ۳/۲۵ درصد توده‌های بذری بود.

نتایج این پژوهش با مشاهدات دویوز و همکاران (Dwivedi *et al*., 2008) مطابقت داد. آن‌ها مشاهده کردند که در میان قارچ‌های جداسازی‌شده از بذر، بالاترین میزان درصد فراوانی، تراکم نسبی و وقوع قارچ‌های بیماری‌زای بذرزاد مربوط به *A. alternata* و *F. oxysporum* می‌باشد. نتایج نشان می‌دهد که *A. alternata* شایع‌ترین گونه در میان قارچ‌های جداسازی-شده از توده‌های بذری رازیانه در ایران است. این نتایج با گزارش دویوز و همکاران (Dwivedi *et al*., 2008) در مورد فراوانی بالای گونه *A. alternata* مطابقت دارد. در میان قارچ‌های جداسازی‌شده از بذور رازیانه در برزیل قارچ *Alternaria* sp. بالاترین میزان درصد وقوع را داشت (Gama *et al*., 2014). دآمیکو و همکاران (D'Amico *et al*., 2008) گزارش کردند که گونه *F. oxysporum* در مزارع رازیانه ایتالیا گونه غالب بود.

نتایج حاصل از بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *A. alternata* و *F. oxysporum* نشان داد که حدود ۸۵ درصد جدایه‌ها بیماری‌زا و ۱۵ درصد جدایه‌های بیماری‌زا نبودند. جدایه‌های مورد بررسی به گروه‌های بیماری‌زا، کم-بیماری‌زا و غیربیماری‌زا دسته‌بندی شدند. پژوهش حاضر نشان داد که جدایه‌های گونه‌های مختلف و همچنین جدایه‌های متفاوت از یک گونه، بیماری‌زایی و قدرت تهاجم متفاوتی دارند. نتایج این پژوهش مطابق با مشاهدات حسنی و همکاران (Hassani *et al*., 2019) و ساکر (Sakr, 2017) بود. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده، در میان تمام جدایه‌های *A. alternata*، بیش‌ترین پیشرفت بیماری و قدرت تهاجم مربوط به جدایه ARG7 به‌میزان ۰/۱۴±۷۳/۵۸ بود که اولین علایم بیماری ۱۲۰ ساعت پس از مایه‌زنی به‌صورت لکه‌های کوچک نکروزی روی برگ و ساقه مشاهده شد. همچنین بیش‌ترین پیشرفت بیماری و قدرت تهاجم در میان جدایه‌های *F. oxysporum*، مربوط به جدایه FRG7 به‌ترتیب به‌میزان ۰/۱۸±۵۷/۹۳ بود که اولین علایم بیماری ۱۳۲ ساعت پس از مایه‌زنی به‌صورت پوسیدگی قهوه‌ای در ساقه و کلروز برگی مشاهده شد.

دیواره سلول‌های گیاهی به‌طور عمده از پکتین، سلولز، همی‌سلولز، لیگنین، پلی‌ساکاریدها و پروتئین تشکیل‌شده است (Zhao *et al*., 2013). قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی جهت نفوذ در دیواره سلولی، آنزیم‌هایی را تولید می‌کنند که توانایی تخریب پلیمرهای دیواره سلولی از جمله سلولز، زایلان و پکتین را دارند. آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی به‌ویژه در بیمارگرهای نکروتروف مانند *A. alternata* و *F. oxysporum* که ساختارهای نفوذ تخصصی ندارند در حین مراحل نفوذ و گسترش در میزبان نیاز دارند (Gibson *et al*., 2011; Kikot *et al*., 2009; Stankovic *et al*., 2007). در طول مدت بررسی میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده مشاهده شد که حداکثر میزان فعالیت هر آنزیم برای جدایه‌های مختلف متفاوت و ولی زمان رسیدن به اوج این فعالیت برای اکثر جدایه‌های مشابه بود. سلولاز اولین آنزیمی بود که در زمان کوتاه‌تری فعالیت آن به اوج رسید، درحالی‌که پس از آن به‌ترتیب فعالیت حداکثر آنزیم‌های زایلاناز، پکتیناز و لیپاز با تأخیر بیش‌تر و در مقدار کم‌تری مشاهده شد که این نتایج مشابه با نتایج گزارش شده توسط طاهری (Taheri, 2019) و خالدی و همکاران (Khaledi *et al*., 2017) بود. اورتگا و همکاران (Ortega *et al*., 2013) گزارش کردند که فعالیت لیپاز با تأخیر بیش-تری نسبت به سایر آنزیم‌ها به‌میزان حداکثر می‌رسد. بررسی‌های انجام‌شده در این پژوهش نشان داد که ارتباط قوی بین شدت و شاخص بیماری‌های ناشی از جدایه‌های مختلف *A. alternata* و *F. oxysporum* و میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی وجود دارد. همچنین با آن‌که رابطه بین نوع و میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی و میزان بیماری‌زایی و تهاجم جدایه‌ها ساده نیست، اما جدایه‌هایی که سطح بالاتری از فعالیت آنزیم‌های سلولاز و زایلاناز را نشان می‌دادند، میزان بیماری‌زایی آن‌ها بیش‌تر بوده و تهاجمی‌تر از دیگر جدایه-ها بودند. با مقایسه فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی و بیماری‌زایی جدایه‌ها به‌نظر می‌رسد که پکتیناز و لیپاز تأثیری بر بیماری‌زایی جدایه‌ها در مقایسه با سلولاز و زایلاناز ندارند. فالیپ و همکاران (Phalip *et al*., 2005) گزارش کردند که سلولاز و زایلاناز در مقایسه با سایر آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی در بیماری‌زایی جدایه‌ها اهمیت بیش‌تری دارند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. سطح فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی در این پژوهش توسط جدایه‌های بیماری‌زا به‌میزان قابل توجهی بالاتر از جدایه‌های غیربیماری‌زا می‌باشد. جدایه‌های غیربیماری‌زا بدون توانایی تولید سلولز و زایلاناز قادر به ایجاد بیماری

روی گیاهچه‌های رازیانه نبودند، اما همین جدایه‌ها آنزیم‌های پکتیناز و لیپاز تولید می‌کردند. نتایج این پژوهش با مشاهدات هوبلی و همکاران (Hubballi *et al*., 2011) مطابقت دارد. آن‌ها گزارش کردند که جدایه‌های غیربیماری‌زا آنزیم‌های پکتینولیتیک (پکتینازها) از جمله پکتین متیل استراز و پلی‌گالاکتوروناز را تولید می‌کنند.

با توجه به نتایج گزارش شده توسط سایر محققان در مورد بیمارگرهای مختلف مشاهده شد که ارتباط قوی بین میزان بیماری‌زایی و میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی وجود دارد (Taheri, 2019; Khaledi *et al*., 2017; Ortega *et al*., 2013) که با مشاهدات ما مطابقت دارد. حداکثر فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی متعلق به جدایه ARG7 بود، که بیش‌ترین میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم را نشان می‌دهد، که این نتایج مشابه با نتایج گزارش‌شده توسط سایر محققان می‌باشد (Taheri, 2019; Hassani *et al*., 2019; Khaledi *et al*., 2017). بنابراین، بین نوع و میزان آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاهی و یزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم جدایه‌ها روی گیاهچه‌ها ارتباط وجود دارد. این مطالعه نشان می‌دهد که قارچ‌های بیماری‌زا بذرزاد باعث کاهش شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه و در نتیجه کیفیت بذر می‌شوند. با توجه به آن‌که بیش‌ترین میزان آلودگی به قارچ‌های بذرزاد در توده‌ی بذری استان گلستان مشاهده شد و همچنین جدایه‌های قارچی جداسازی‌شده از این توده بذری نسبت به توده‌های بذری سایر استان‌ها میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم بیش‌تری داشتند، توده بذری استان گلستان جهت کشت در آن منطقه و سایر مناطق توصیه نمی گردد. همچنین با توجه به مقایسه میانگین شاخص‌های جوانه‌زنی و بنیه در توده‌های بذری مورد بررسی و میزان آلودگی به قارچ‌های بذرزاد، پیشنهاد می‌گردد از توده بذری استان کردستان جهت کشت در سایر مناطق استفاده شود. پیشنهاد می‌شود توده‌های بذری هر منطقه مورد بررسی و با توجه به اصالت و خلوص ژنتیکی، خلوص فیزیکی، کیفیت‌های فیزیولوژیک و سلامت بذر تصمیم‌گیری مناسب اتخاذ گردد. استفاده از بذور سالم ضمن حفظ ارزش زراعی و تنوع ژنتیکی توده‌های بومی رازیانه ایرانی، موجب کاهش آلودگی محصول در مزرعه به بیماری‌های قارچ‌های ناشی از بذر می‌شوند. در نتیجه شناخت قارچ‌های بذرزاد و بررسی تأثیر آن‌ها روی شاخص‌های بنیه و جوانه‌زنی می‌تواند در انتخاب راهکارهای مؤثر مدیریتی جهت کاهش اثرات مخرب بیماری‌های ناشی از بذر و افزایش میزان تولید و کیفیت محصول موثر باشد. علاوه بر این، ارزیابی میزان بیماری‌زایی جدایه‌ها و عوامل مؤثر بر آن می‌تواند به پرورش‌دهندگان گیاهان در انتخاب توده‌های بومی رازیانه در کشف منابع مقاومت در برابر تنش‌های ناشی از عوامل زنده مؤثر باشد.

تشکر و قدردانی

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

منابع

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 Persian) **(Book)**

Abdel-Razik, A.A. 1970. The parasitism of white *Sclerotium cepivorum* Berk. the incitant of white rot of onion. PhD thesis, Fac Agric, Assiut University, Assiut, Egypt. **(Thesis)**

Aiello, D., Vitale, A., Polizzi, G. and Voglmayr, H. 2020. Ochraceocephala foeniculi gen. et sp. nov., a new pathogen causing crown rot of fennel in Italy. Mycokeys, 66: 1-22 **(Journal)**

Anonumous, 2014. International rules for seed testing. International Seed Testing Association (ISTA), Zurich, Switzerland. **(Handbook)**

Bailey, M.J. and Biely, P., 1992. Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. Journal of Biotechnology, 23: 257-270. **(Journal)**

Ben Salem, I., Abdelkhalek, Y., Nabli, H., Tarchoun, N. and M'Hamdi, N. 2019. Screening and interaction between pathogens and antagonistic seed-borne fungi, associated with some organic

spices and vegetable crops in Tunisia. Novel Research in Microbiology Journal, 3(1): 232-242. **(Journal)**

Boedo, C., Le Clerc, V., Briard, M., Simoneau, P., Chevalier, M., Georgeault, S. and Poupard, P. 2007. Impact of carrot resistance on development of the Alternaria leaf blight pathogen (*Alternaria dauci*). European Journal of Plant Pathology, 121: 55-66. **(Journal)**

Booth, C. 1977. Fusarium Laboratory Guide to Identification of Major Species. Common wealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England, 55pp. **(Book)**

Brown, N.A., Antoniw, J. and Hammond-Kosack, K.H. 2012. The predicted secretome of the plant pathogenic fungus Fusarium graminearum: A refined comparative analysis. PLoS One 7(4): e33731. **(Journal)**

Cho, Y., Kim, K.H., Rota, M.L., Scott, D., Santopietro, G., Callihan, M., Mitchell, T.K. and Lawrenc, C.B. 2009. Identification of novel virulence factors associated with signal transduction pathways in *Alternaria brassicicola*. Journal of Molecular Microbiology, 72: 1316-1333. **(Journal)**

Colowich, S.P. 1995. Methods in Enzymology. London, Academic Prees INC. **(Book)**

D'Amico, M., Frisullo, S. and Cirulli, M. 2008. Endophytic fungi occurring in fennel, lettuce, chicory and celery-commercial crops in southern Italy. Mycological Researchm, 112: 100. **(Journal)**

Darzi, M.T., Ghalavand, A., Rejali, F. and Sefid kon, F. 2007. Investigating the application of bio fertilizers on yield and yield components of medicinal plant of Fennel. Research of Medicinal Plants and Aromatic Plants of Iran, 4 (22): 276-292. (In Persian) **(Journal)**

Diao, W.R., Hu, Q.P., Zhang, H. and Xu, J.G. 2014. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Food Control, 35(1): 109-116. **(Journal)**

Dwivedi, S.V., Sing, T. and Mishra, S.K. 2008. Association studies of yield with quantitative and qualitative characters of fennel. Journal of Progressive Horticulture, 40: 114-116. **(Journal)**

Ehsanipour, A., Zeinali, H. and Razmjoo, K. 2012. Effect of nitrogen levels on qualitative traits and seed yield of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) populations. Journal of Medicinal Plants, 2(42): 37-47. **(Journal)**

Ershad, J. 2009. Fungi of Iran. 3rd edition. Iranian Research Institution of Plant Protection, Tehran, Iran. 531 pp. (In Persian) **(Book)**

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. **(Journal)**

Franke, J.L., Geary, B., and Meyer, S.E. 2014. Identification of the infection route of a fusarium seed pathogen into Nondormant Bromus tectorum seeds. Phytopathology, 104: 1306-1313. **(Journal)**

Gama, J.S.N., Araujo Neto, A.C., Bruno, R.L.A., Pereira Junior, L.R., and Medeiros, J.G.F. 2014. Thermotherapy in treating fennel seeds (*Foeniculum vulgare* Mill.): effects on health and physiological quality. Revista Ciência Agronômica, 45(4): 842-849. **(Journal)**

Gibson, D.M., King, B.C., Hayes, M.L. and Bergstrom, G.C. 2011. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. Current Opinion in Microbiology, 14(3): 264-270. **(Journal)**

Gour, H.N. and Agrawal, S. 1988. A wilt toxin from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cumini* Patel and Prasad. Current Science, 57: 849-851. **(Journal)**

Hashem, M., Moharam, A.M. and Zaied, A.A. 2010. Efficacy of essential oils in the control of cumin root rot disease caused by *Fusarium* spp. Crop Protection, 29: 1111-1117. **(Journal)**

Hassani, F., Zare, L. and Khaledi, N. 2019. Evaluation of germination and vigor indices associated with fusarium-infected seeds in pre-basic seeds wheat fields. Journal of Plant Protection Research, 59 (1): 69-85. **(Journal)**

Hubballi, M., Sornakili, A., Nakkeeran, S., Anand, T. and Raguchander, T. 2011. Virulence of *Alternaria alternate* infecting noni associated with production of cell wall degrading enzymes. Journal of Plant Protection Research, 51: 87-92. **(Journal)**

ISTA (International Seed Testing Association). 2003. International rules for seed testing. International Seed Testing Association, Zurich, 333 pp. **(Book)**

Khairy, E.M., Sammour, H.M., Ragheb, A., Ghandour, M.F. and Aziz, K. 1964. A Laboratory Manual of Practical Chemistry. Cairo, Egypt: Dar El-Nahda El-Arabia, 1-142. **(Thesis)**

Khalaj, H., Labbafi Hossein abad, M.R., Hasan Abadi, T., Shaghaghi, J. and Hajiaghaee, R. 2019. Review on the botanical, ecological, agronomical and pharmacological properties of the Fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Journal of Medicinal Plants, 1-15. **(Journal)**

Khaledi, N., Taheri, P. and 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. **(Journal)**

Khaledi, N., Taheri, P. and Tarighi, S. 2015. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. Journal of Applied Microbiology, 18: 704-717. **(Journal)**

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

Kikot, G.E., Hours, R.A. and Alconada, T.M. 2009. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: A review. Journal of Basic Microbiology, 49: 231-241. **(Journal)**

Koike, S.T., Gordon, T.R. and Kirkpatrick, S.C. 2011. First Report of Fusarium stem and crown rot of Fennel in Arizona Caused by *Fusarium avenaceum*. Plant disease, 96(1):145. **(Journal)**

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. **(Journal)**

Lannou, C. 2012. Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. Annual Review of Phytopathology, 50: 319-338. **(Journal)**

Leslie, J.F. and Summerell, A.B. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Ames: Blackwell Publishing Professional. 388 pp. **(Book)**

MacMillan, J.D. and Voughin, R.H. 1964. Purification and properties of a polyglacturonic acid-transeliminase produced by *Clastridium multiformentans*. Biochemistry, 3: 564-572. **(Journal)**

Maghsudi Kelardashti, H., Rahimmalek, M., Sabzalia, M.R. and Talebi, M. 2014. An assessment of morphological genetic variations and heritability of Iranian fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) accessions. Taxonomy and Biosystematics, 6(18): 77-86. **(Journal)**

Mahapatra, S.S., Arya, A., Kesarwani, A. and Verma, O. 2019. Influence on oilseeds and legume seed physiology under insect pest and pathogenic infestation. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 8: 671-676. **(Journal)**

Mangwende, E., Kritzinger, Q. and Aveling, A.S.T. 2018. Control of Alternaria leaf spot of coriander in organic farming. European Journal of Plant Pathology, 152: 409-416. **(Journal)**

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31: 426-428. **(Journal)**

Mishra, P.K., Fox, R.T.V. and Culham, A. 2003. Intersimple sequence repeat and aggressiveness analyses revealed high genetic diversity, recombination and long range dispersal in *Fusarium culmorum*. Annals of Applied Biology, 143: 291-301. **(Journal)**

Moradi, R. and Rezvani-Moghadam, P. 2010. The effect of priming with salicylic acid in terms of salt stress on germination and seedling growth properties of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill), Iranian Journal of Field Crops Research, 8(3): 489-500. (In Persian) **(Journal)**

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. **(Journal)**

Nasiri, M. 2018. Seed germination methods of some rangeland and medicinal species. Journal of Iran Nature, 42-48. (In Persian)**(Scientific Letters)**

Nautiyal, P.C. 2009. Seed and seedling vigor traits in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). Seed Science and Technology, 37: 721-735. **(Journal)**

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Marasas, W.F.O. 1983. *Fusarium* species, An Illustrated Mannual for Identification. Pennsylvania State University Press, University Park. **(Thesis)**

Nirenberg, H. 1976. Unterstructure uber die morphologische und biologische differnzierung in der Fusarium-Sektion Liseola. Mitteilungen aus der Biologischen Bundesansatlt fur Landund Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem, 169: 11-17. **(Journal)**

Noda, J., Brito, N. and Gonzalez, C. 2010. The *Botrytis cinerea* xylanase Xyn11A contributes to virulence with its necrotizing activity, not with its catalytic activity. BMC Plant Biology, 10: 38. **(Journal)**

Odstrčilová, L., Ondřej, M., Kocourková, B. and Růžičková, G. 2002. Monitoring of incidence and determination of fungi on caraway, fennel, coriander and anise, consideration of disease importance and possibility of chemical protection. Plant Protection Science, 38: 340-343. **(Journal)**

Ortega, L.M., Kikot, G.E., Astoreca, A.L. and Alconada, T.M. 2013. Screening of *Fusarium graminearum* isolates for enzymes extracellular and deoxynivalenol production. Journal of Mycology, 358140: 1-7. **(Journal)**

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. **(Journal)**

Phalip, V., Delande, F., Carapito, C., Goubet, F., Hatsch, D., Leize-Wagner, E., Dupree, P., Van Dorsselaer, A. and Jetsch, J. M. 2005. Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. Current Genetics, 48: 366-379. **(Journal)**

Pritsch, C., Muehlbauer, G.J., Bushnell, W.R., Somers, D.A. and Vance, C.P. 2000. Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 13: 159-169. **(Journal)**

Pryor, B.M. and Gilbertson, R.L. 2002. Relationship and taxonomic status of *Alternaria radicina*, A. carotiinclatae and *A. petroselini* based on morphological, biochemical and molecular characteristics. Mycologia, 94: 49-61. **(Journal)**

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

Sakr, N. 2017. *In vitro* assessment of Fusarium head blight on wheat cultivars. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 50: 254-261. **(Journal)**

Shaker, G.A. and Alhamadany, H.S. 2015. Isolation and identification of fungi which infect fennel *Foeniculum vulgare* Mill. and its impact as antifungal agent. Iraq Natural History Research Center and Museum, 13: 31-38. **(Journal)**

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(11): 2173. **(Journal)**

Simmons, E.G. 2007. Alternaria: an Identification Manual. CBS, Utrecht, 775 pp. **(Book)**

Singh, D. and Mathur, S.B. 2004. Location of fungal hyphae in seeds. In: Singh D, Mathur SB, editors. Histopathology of Seed-Borne Infections. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 101-168. **(Journal)**

Singh, J., Shikha, S.S., Sinha, A. and Bose, B. 2011. Studies on seed mycoflora of wheat (Triticum aestivum L.) treated with potassium nitrate and its effect on germination during storage. Research Journal of Seed Science, 4: 148-156. **(Journal)**

Stankovic, S., Levic, J., Petrovic, T., Logrieco, A. and Moretti, A. 2007. Pathogenicity and mycotoxin production by *Fusarium proliferatum* isolated from onion and garlic in Serbia. European Journal of Plant Pathology, 118: 165-172. **(Journal)**

Suthar, R.S., Bhatt, D.P. and Bhatt, P.N. 2014. Effect of culture filtrate of *Fusarium equiseti* on seed germination and seedling growth of cumin (*Cuminum cyminum*). Indian Phytopathol, 67: 193-194. **(Journal)**

Taheri, P. 2019. Disease resistance and virulence screen in *Solanum tuberosum-Alternaria tenuissima* interaction: the role of pathogenicity factors. Euphytica, 215: 15. **(Journal)**

Underwood, W. 2012. The plant cell wall: A dynamic barrier against pathogen invasion. Frontiers in Plant Science, 85: 1-6. **(Journal)**

Voigt, C.A., Schäfer, W. and Salomon, S. 2005. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a novel virulence factor during infection of cereals. The Plant Journal, 42: 364-375. **(Journal)**

Wanyoike, W.M., Kang, Z. and Buchenauer, H. 2002. Importance of cell wall degrading enzymes produced by *Fusarium graminearum* during infection of wheat head. European Journal of Plant Pathology, 108 (8): 803-810. **(Journal)**

Wood, T.M. and Bhat, M. 1998. Methods for measuring cellulase activities. Methods in Enzymology, 160: 87-112. **(Journal)**

Younesian, A., Taheri, S. and Rezvani Moghadam, P. 2012. The effect of organic and biological fertilizers on essential oil content of *Foeniculum vulgare* Mill. (Sweet Fennel). International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 5(18): 2141-2146. **(Journal)**

Zhao, Z., Liu, H., Wang, C. and Xu, J.R. 2013. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. BMC Genomics, 14: 274. **(Journal)**

Evaluation of effect of seed-borne fungi on germination, health and quality of native Fennel seed populations

Nima Khaledi[1*], Abbas Dehshiri[2], Farshid Hassani[3], Leila Zare[4]

Received: June 16, 2020 Accepted: November 11, 2020

Abstract

Seed-borne fungi can reduce reduce the quality and quantity of crop by affecting seed health. The aim of this study were to evaluate the germination and vigor indices of native fennel seed populations, isolate and identify the seed-borne fungi and then pathogenicity, aggressiveness, and activity of cell wall degrading enzymes (CWDEs) produced by these isolates were investigated. In order to identify of seed-borne fungi of fennel seed populations from some fields in provinces of Golestan, Zanjan, Kurdistan and Hamedan were sampled according to the International Rules for Seed Testing (ISTA). After isolation and purification, fungal isolates were identified based on morphological and molecular characteristics. Then the enzyme activity of cellulase, xylanase, pectinase and lipase as the main virulence factors secreted by isolates were evaluated. Also, pathogenicity potential and the aggressiveness of isolates were evaluated by pathogenicity test on seedlings. A total of 33 isolates were identified based on morphological and molecular characteristics that belonging to species, *Alternaria alternate* and *Fusarium oxysporum*. The results of the standard germination test showed that there was a significant difference among the native seed populations studied in the germination and vigor indices. Seed infected by seed-borne fungi significantly affects germination and vigor indices and reduces seed quality. The results showed that the lowest in the germination and vigor indices were observed by the seed population of Golestan, followed by the seed populations of Hamedan, Zanjan and Kurdistan. The results of pathogenicity test showed that about 85% of the isolates were pathogenic and weakly pathogenic and 15% were non-pathogenic isolates. Also, different levels of pathogenicity and aggressiveness were observed for various isolates of *Alternaria* and *Fusarium* species. Analyzing the activity of CWDEs produced by isolates revealed that cellulase and xylanase activities were more than important than pectinase and lipase activities for the pathogenicity of isolates and enzyme activities affects levels of pathogenicity and aggressiveness of isolates. Therefore, these findings suggested that activity levels of cellulase and xylanase are correlated with variation in pathogenicity and aggressiveness of seed-borne fungal isolates on seeding. This is the first report on identify the seed-borne fungi of Iranian native fennel seed populations, together with the investigation of the relationship among the levels of pathogenicity, aggressiveness and the activity of CWDEs produced by isolates.

Keywords: Aggressiveness; Cell wall degrading enzymes; Cellulase; Fennel; Pathogenicity; Xylanase

How to cite this article

Khaledi, N., Dehshiri, A., Hassani, F. and Zare, L. 2021. Evaluation of effect of seed-borne fungi on germination, health and quality of native Fennel seed populations. Iranian Journal of Seed Science and Research, 8(2): 113-130. (In Persian)**(Journal)**

DOI: 10.22124/jms.2021.5215

COPYRIGHTS

Copyrights for this article are retained by the author(s) with publishing rights granted to the Iranian Journal of Seed Science and Research

The content of this article is distributed under Iranian Journal of Seed Science and Research open access policy and the terms and conditions of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY4.0) License. For more information, please visit http://jms.guilan.ac.ir/

1. Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. khnm13@gmail.com
2. Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. ab_dehshiri@yahoo.com
3. Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. farshid.shz@gmail.com
4. Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. zare_l@yahoo.com

*Corresponding author: khnm13@gmail.com