



مقاله پژوهشی

شناسایی و بیماری‌زایی گونه‌های *Fusarium sensu lato* عامل پژمردگی و لکه برگ بوته‌های موز در جنوب ایران

عادل پردل^{۱*}، کوثر دهقانی^۲، امیررضا امیرمیجانی^۲، خالد میری^۳

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۴/۳۱)

چکیده

طی بازدید از باغات موز در سال‌های ۱۴۰۰ تا ۱۴۰۱، نمونه‌برداری از برخی بوته‌های موز دارای علائم لکه برگ و پژمردگی در مناطق موز کاری استان‌های سیستان و بلوچستان و هرمزگان انجام شد. پس از انتقال نمونه‌های آلوده به آزمایشگاه، تعداد ۳۱ جدایه متعلق به جنس *Fusarium sensu lato* جداسازی شد. به منظور شناسایی جدایه‌ها از محیط کشت برگ میخک-آگار (Carnation leaf agar) و SNA تحت شرایط ۱۲ ساعت نور نزدیک یو وی (near UV) و ۱۲ ساعت تاریکی استفاده گردید. نتایج حاصل از بررسی ریخت‌شناختی و واکاوی فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه ژنی *Elongation factor 1-α (EF 1-α)* نشان داد که جدایه‌ها به گونه‌های *Fusarium oxysporum* (جدایه ۱۲)، *Fusarium incarnatum* (۱۰ جدایه)، *Neocosmospora sp.* (۷ جدایه) و *Fusarium sp.* (۲ جدایه) تعلق دارند. آزمون بیماری‌زایی به منظور تایید بیماری‌زایی گونه‌ها روی رقم موز Dwarf Cavendish انجام شد. نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد گونه‌های بدست آمده توانایی ایجاد لکه برگ (*Fusarium sp.* و *Fusarium incarnatum*) و پژمردگی (*Fusarium oxysporum*، *Fusarium incarnatum* و *Neocosmospora sp.*) روی گیاه موز را در شرایط گلخانه نیز دارند. بر اساس اطلاعات موجود، این اولین گزارش از بیماری‌زایی *F. incarnatum* و *Neocosmospora sp.* روی موز در ایران است.

کلمات کلیدی: *Neocosmospora*، بیمارگر، تنوع‌زیستی، میوه گرمسیری

^δ بخش از پروژه تحقیقاتی به شماره ۰۰۰۵۴۷-۹۹۰۵۴-۹۷۰۱-۹۷-۰۴۷-۱۶-۶۵-۰۱۴۸ می‌باشد.

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: a_pordel@areo.ac.ir

۱ استادیار پژوهش، بخش گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان، ایرانشهر، ایران.

۲ دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران.

۳ استادیار پژوهش، بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان، ایرانشهر، ایران.



DOI: 10.22034/ijpp.2023.2003442.410

Research Article

Identification and pathogenicity of *Fusarium sensu lato* species causing wilting and leaf spot of Banana in South of Iran

A. Pordel^{1*} ^δ, K. Deghani², A. Amirmijani², Kh. Miri³

(Received: 31.5.2023; Accepted: 22.7.2023)

Abstract

During the visit of some banana cultivation areas in 2021 and 2022, sampling of leaves and roots with symptoms of leaf spot and wilting was done in Sistan and Baluchistan, and Hormozgan provinces. After being transferred to the laboratory, twenty-eight isolates belonging to the genus *Fusarium sensu lato* were isolated from the infected samples.. The isolates were identified by carnation leaf agar and SNA under 12 hours of near UV light and 12 hours of darkness. The results of the morphological investigation and phylogenetic analysis based on *Elongation factor 1- α* (*EF 1- α*) gene region showed that isolates belonged to *Fusarium oxysporum* (12 isolates), *Fusarium incarnatum* (10 isolates), *Neocosmospora sp.* (7 isolates), and two unknown isolates of *Fusarium*. The pathogenicity test was conducted to compare the pathogenicity of the species on the Dwarf Cavendish banana variety. Pathogenicity test results showed the isolates could cause leaf spot (*Fusarium sp.* and *Fusarium incarnatum*) and wilting (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium incarnatum* and *Neocosmospora sp.*) in banana plants under greenhouse conditions. Based on our knowledge, this is the first report of *F. incarnatum* and *Neocosmospora sp.* pathogenicity of banana in Iran.

Key words: *Neocosmospora*, Pathogen, Biodiversity, Tropical fruits.

^δ A part of research project number: 0148-65-16-047-9701-99054-000547

1 Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Baluchestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Iranshahr, Iran.

*Corresponding Author, Email: a_pordel@areeo.ac.ir

2 MSc Student and Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran.

3 Assistant professor, Seed and Plant Improvement Research Department, Baluchestan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, (AREEO), Iranshahr, Iran.

مقدمه

گونه *Fusarium oxysporum*، تاکنون گونه‌های دیگری از قبیل *F. camptoceras*، *Neocosmospora solani*، *F. chlamydosporum*، *F. stiloides pallidoroseum*، *F. concentricum*، *F. proliferatum*، *verticillioides*، *Fusarium fujikuroi*، *F. sacchari*، *Fusarium sambucinum* و *incarnatum-equiseti* نیز به عنوان عوامل دخیل در پژمردگی موز گزارش شده‌اند (Li-Sha et al. 2013; Maryani et al. 2019).

در این پژوهش، به منظور بررسی بیماری‌های درختان موز، نمونه برداری از درختان دارای علائم پژمردگی و لکه برگی انجام شد و جدایه‌های قارچی متعلق به جنس *Fusarium sensu lato* به لحاظ ریخت‌شناختی، مولکولی و بیماری‌زایی مورد بررسی قرار گرفتند.

روش بررسی

جمع‌آوری، جداسازی و شناسایی جدایه‌های قارچی

در تابستان سال‌های ۱۴۰۰ و ۱۴۰۱ از باغات موز در شهرستان‌های زرآباد و کنارک در جنوب استان سیستان و بلوچستان و میناب در استان هرمزگان نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌برداری از بافت‌های ریشه درختان موز دارای علائم پژمردگی و برگ دارای علائم لکه‌برگی به صورت تصادفی انجام شد. اندام‌های گیاهی مشکوک به آلودگی درون پاکت‌های کاغذی جداگانه با ثبت مشخصات (مکان جمع‌آوری و تاریخ جمع‌آوری) به آزمایشگاه منتقل شدند، و درون یخچال با دمای چهار درجه سیلسیوس نگهداری شدند. به منظور جداسازی عامل یا عوامل ایجاد کننده آلودگی، ابتدا بخش‌هایی از بافت‌های آلوده به مدت ۱۰ دقیقه زیر جریان ملایم آب شسته شده و سپس با اسکالپل به قطعات کوچکتری بریده شدند و به مدت یک دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم نیم درصد ضد عفونی سطحی شدند. پس از رطوبت‌گیری نمونه‌ها در کاغذ صافی استریل، قطعات تقریبی به اندازه یک سانتی‌متر مربع از قسمت‌های

عوامل متعددی از بیمارگرهای مولد لکه‌برگی و پژمردگی قارچی، هر ساله باعث کاهش عملکرد محصول موز در مناطق جنوب و جنوب شرق ایران می‌شوند. بیماری‌های مهم قارچی مانند بیماری پاناما (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*)، سیگاتوکا (*Mycosphaerella musicola*)، لکه برگی کوردانا (*Cordana musae*) و آنتراکنوز (*Colletotrichum musae*) روی موز در سراسر جهان گزارش شده‌اند (Raut & Ranade, 2004). همچنین گونه‌های *Alternaria Fusarium equiseti*، *Fusarium oxysporum alternata* و *Colletotrichum musae* از گیاهان موز در مناطق سیستان و بلوچستان و هرمزگان گزارش شده‌اند (Amani & Avagyan 2014a, b).

بیماری پژمردگی فوزاریومی یا پانامایی موز یکی از خسارت‌زاترین بیماری‌های موز است (Stover & Simmonds 1987). این بیماری توسط *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* ایجاد می‌شود. این بیماری در برخی از نقاط دنیا به صورت اپیدمی با خسارت بسیار بالا ظهور و بروز پیدا کرده است (Ordonez et al. 2015). گونه قارچی عامل بیماری پاناما چهار نژاد دارد که هر کدام دامنه میزبانی متفاوتی را آلوده می‌کنند. نژاد ۴ این گونه توانایی ایجاد آلودگی شدید روی بوته‌های موز (رقم کاوندیش) را دارد که باعث نکروز حاشیه برگ و انسداد آوندی بوته‌های موز می‌گردد و در نهایت کل بوته به طور ناگهانی پژمرده می‌شود. قارچ عامل بیماری پاناما توسط پاجوش آلوده، ارتباط بین ریشه‌ای درخت آلوده و سالم، خاک آلوده و جریان آب منتقل می‌شود (Ordonez et al. 2015). تاثیر عوامل محیطی از قبیل تنش‌های دمایی می‌تواند در شدت بروز بیماری پاناما نقش بسزایی را ایفا نماید (Bosman 2016). علاوه بر

سپس ناحیه هدف براساس نوشته کایزر و همکاران (Geiser *et al.* 2004) تکثیر شد. خالص سازی و توالی یابی محصولات به دست آمده توسط شرکت Microsynth سوییس انجام گردید. همردیف سازی توالی ها با برنامه MUSCLE در نرم افزار Molecular Evolutionary (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, v 6.0) انجام شد (Edgar 2004; Tamura *et al.* 2011). روابط فیلوژنتیکی میان جدایه های بدست آمده همراه با توالی تعداد دیگری از جدایه های تیپ گرفته شده از مقالات معتبر به روش حداکثر صرفه جویی (Maximum Parsimony) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و تبارنمای مربوط به آنها رسم شد (Crous *et al.* 2021). اعتبار شاخه ها با انجام اعتبارسنجی (Bootstrap) در ۱۰۰۰ تکرار مورد سنجش قرار گرفت و ارزش بیشتر از ۹۰ روی درخت فیلوژنتیکی نشان داده شد.

آزمون بیماری زایی

در فروردین ماه سال ۱۴۰۲ تعداد ۲۰ نهال موز کشت بافتی رقم Dwarf Cavendish از آزمایشگاه تحقیقاتی کشت بافت و ژنومیکس، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان تهیه شد. پس از پر کردن گلدان ها با کمپوست، به درون گلخانه با محدوده دمایی ۲۰-۳۰ درجه سلسیوس منتقل و هر دو روز یکبار آبیاری شدند. نهال های موز رشد یافته در اتاق رشد پس از انتقال و استقرار آنها در شرایط گلخانه، برای بیماری زایی مورد استفاده قرار گرفتند. به منظور مایه زنی دو گونه *Fusarium incarnatum* و *Fusarium sp.* جدا شده از برگ دارای علائم لکه برگ و گونه های *Neocosmospora sp.* و *F. incarnatum*، *F. oxysporum* جدا شده از ریشه بوته های موز دارای علائم پژمردگی روی ریشه، قطعاتی از کاغذ صافی جدایه های انتخاب شده (هر گونه سه جدایه و برای هر جدایه سه تکرار) روی محیط کشت برگ میخک-آگار قرار گرفتند. تشتک ها

آلوده برگ های دارای علائم لکه برگی به همراه نواحی سالم بافت گیاهی در تشتک های پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شد (Pordel *et al.* 2015) و سپس تحت شرایط تاریکی یا نور نزدیک به فرابنفش و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. همچنین قطعاتی یک سانتی متری از ریشه های آلوده نیز پس از ضد عفونی روی محیط کشت آب-آگار قرار داده شد. قارچ های رشد کرده به روش نوک ریشه و تک کنیدیوم روی محیط کشت آب-آگار دو درصد خالص سازی شدند و به منظور تهیه پرگنه خالص قارچ، قطعاتی از میسیلیوم های قارچ به دست آمده از روش نوک ریشه به محیط سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) منتقل شد (Pordel *et al.* 2015).

پس از جداسازی و خالص سازی جدایه های قارچی ویژگی های ریخت شناختی اعم از صفات ماکروسکوپی نظیر رنگ، نحوه و سرعت رشد شعاعی پرگنه قارچ روی محیط غذایی PDA پس از یک تا دو هفته نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی و صفات میکروسکوپی نظیر وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم و شکل آنها و همچنین نحوه تولید آنها به صورت زنجیری یا سر دروغی و نوع فیالید (مونوفیالید یا پلی فیالید) پس از رشد روی محیط کشت SNA در شرایط تاریکی و دمای ۲۰-۲۲ درجه سلسیوس و اندازه و شکل ماکروکنیدیوم و وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور پس از ۱۰-۵ روز روی محیط کشت CLA در دمای ۲۰ درجه سلسیوس بررسی شد. شناسایی ریخت شناختی جدایه ها براساس منابع علمی معتبر انجام پذیرفت (Nelson *et al.* 1983, 1987, 1994; Leslie & Summerell 2006; Crous *et al.* 2021).

واکاوای فیلوژنتیکی جدایه های بدست آمده از بوته های موز

برای واکاوای فیلوژنتیکی، از توالی ناحیه ژنی *Elongation factor-1a (EF-1a)* استفاده شد. برای این منظور ابتدا DNA ژنومی با روش ژنگ و استفنسن (Zhong & Stephenson 2002) استخراج شد.

۶۰ درصد نگهداری شدند (Alwahshi et al. 2011; Maryani et al. 2019). بعد از هفت روز، بیماری‌زا یا غیر بیماری‌زا بودن جدایه‌ها روی گیاهان تحت آزمایش بررسی شد.

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی جدایه‌های قارچی

طی بررسی باغات موز، در برخی از درختان موز علائم پژمردگی و لکه برگی مشاهده شد. ریشه درختان با علائم شدید پژمردگی، به طور کامل پوسیده شده بود و در برش عرضی نیز علائم قرمز شدن آوند و لهیدگی ساقه به خوبی قابل مشاهده بود (شکل ۱). در این تحقیق، تعداد ۳۱ جدایه از مناطق کشت موز در استان سیستان و بلوچستان و هرمزگان جداسازی گردید. جدایه‌ها به گونه‌های *Fusarium oxysporum* (۱۲ جدایه)، *Fusarium incarnatum* (۹ جدایه)، *Neocosmospora* sp. (۷ جدایه) (از ریشه بوته‌های موز دارای علائم پژمردگی) و دو گونه *Fusarium incarnatum* (یک جدایه) و *Fusarium* sp. (۲ جدایه) (از برگ بوته‌های موز دارای علائم لکه برگی) تعلق دارد. پرگنه گونه *Fusarium oxysporum*، روی محیط کشت PDA رشد سریعی داشت. قطر پرگنه بعد از هفت روز در شرایط ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی ۸-۷/۵ سانتیمتر بود. رنگ پرگنه سفید با مرکز ارغوانی کم رنگ، اسپوردوکیوم‌ها در محیط کشت CLA به رنگ نارنجی کم رنگ (شکل ۲-A) و ماکروکنیدیوم‌ها تقریباً پهن و به صورت راست و کشیده شکل، سلول راسی خمیده و اندکی قلاب مانند با سلول پایه پاشنه‌ای شکل، ابعاد ۵-۴×۳۵-۲۵ میکرومتر و معمولاً دارای ۳ دیواره عرضی دیده شد (شکل ۲-B-C). میکروکنیدیوم‌ها به شکل بیضوی، دوکی، تخم مرغی با پایه بریده، بدون دیواره عرضی و به ندرت ۲-۱ دیواره، با ابعاد ۱-۳×۵-۲۵ میکرومتر اندازه‌گیری شدند (شکل ۲-D-E).

درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس مجهز به نور فلورسنت با تناوب ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی به مدت هفت روز نگهداری شدند. پس از رشد پرگنه قارچ، ابتدا مقداری آب مقطر استریل داخل تشتک پتری روی پرگنه واجد اسپور ریخته شد و اسپور و میسلیوم با خراش دادن سطح پرگنه توسط اسکالپل جمع آوری و پس از عبور دادن از توری، درون استوانه مدرج ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته شد. غلظت سوسپانسیون با کمک لام هموسیتومتر تعیین شد، بدین ترتیب که با سمپلر استریل ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون برداشته و روی لام هموسیتومتر قرار داده شد و پس از قرار دادن لام روی آن، زیر میکروسکوپ و با بزرگنمایی ۱۰ شمارش اسپور انجام شد و در پایان سوسپانسیون اسپوری با غلظت 2×10^5 اسپور در میلی‌لیتر آب تهیه شد. به منظور آزمون بیماری‌زای گونه *Fusarium* sp. و *Fusarium incarnatum* روی برگ، اسپورپاشی با ۱۰ میلی‌لیتر (۱ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور و ۹ میلی‌لیتر توپین ۲۰) روی برگ هر گیاه انجام شد (Abdalla et al. 2000). گلدان‌های شاهد نیز با آب مقطر استریل مایه‌زنی شدند. بعد از مایه‌زنی، گلدانها به مدت ۲۴ ساعت داخل اتاقکی با دمای ۲۴ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۹۵ قرار گرفتند و پس از گذشت این مدت، به گلخانه منتقل و روزانه آبیاری شدند. همچنین برای مایه‌زنی ریشه نهال موز با گونه‌های *F. oxysporum*، *F. incarnatum* و *Neocosmospora* sp.، ریشه نهال‌ها درون ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور و ریشه نهال‌های شاهد درون آب مقطر استریل به مدت یک ساعت قرار گرفتند. سپس نهال‌ها به درون گلدان‌هایی با محتوی خاک استریل (حاوی نسبت ۳:۲:۱ خاک، کوکو پیت و شن) قرار داده شدند. نهال‌های مایه زنی شده و شاهد با پوشش پلی‌اتیلن برای ۷۲ ساعت پوشانده شدند و پس از گذشت این مدت، در شرایط دمایی ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت

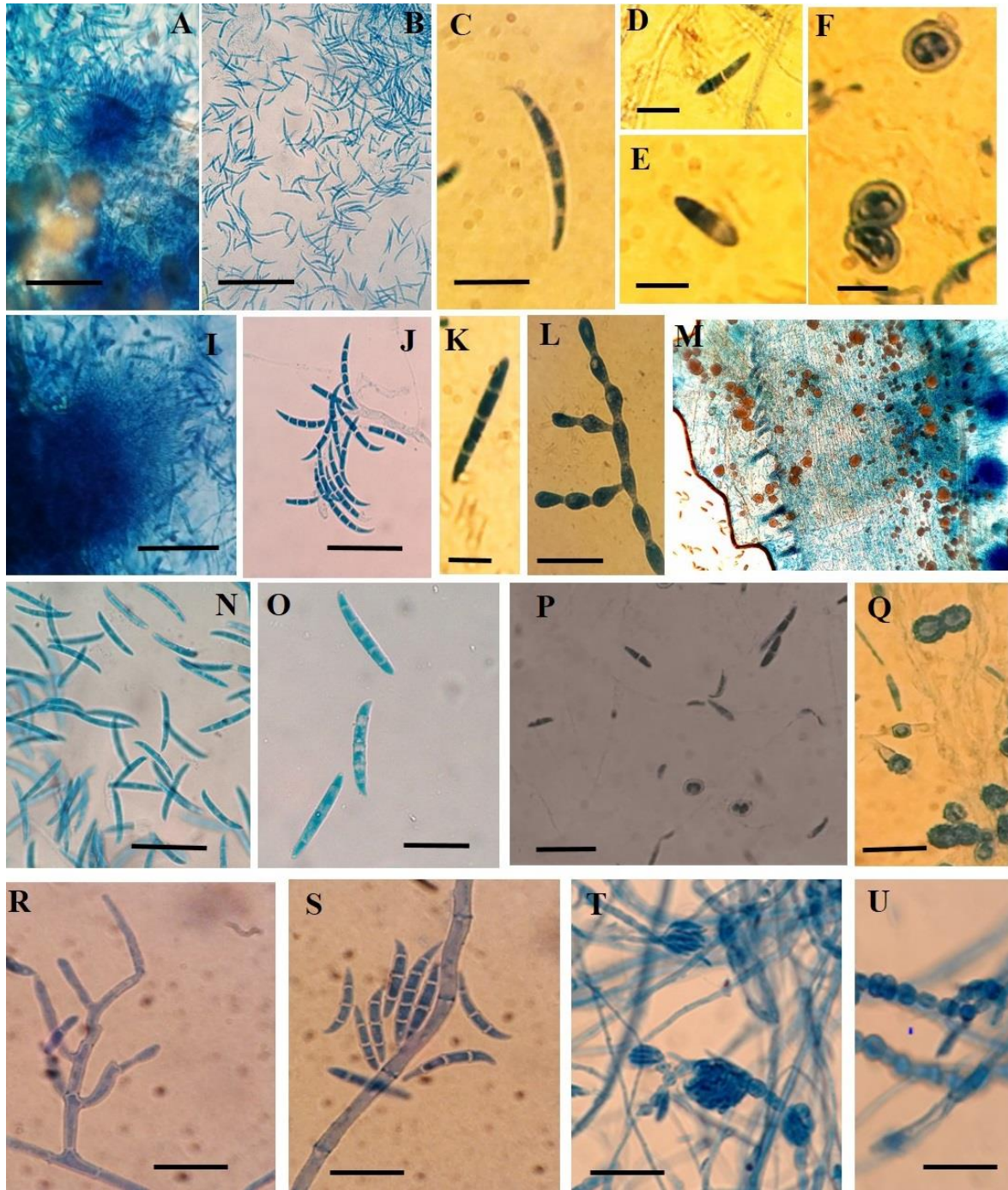
دارای کنیدیوم‌های حد واسط (مزوکنیدیوم) بود که شکلی مشابه ماکروکنیدیوم دارند به ابعاد $2-3 \times 15-22$ و دارای $2-3$ دیواره عرضی هستند (شکل ۲-K). سلول کنیدیوم‌ها در این گونه مونوفیالدهای کوتاه و منشعب است. قطر پرگنه گونه *Neocosmospora sp.* بعد از هفت روز در شرایط 25 درجه سلسیوس و تاریکی $6-8$ سانتیمتر اندازه‌گیری شد. رنگ پرگنه معمولاً سفید با مرکز پرگنه به رنگ قهوه‌ای روشن مشاهده شد. اسپوردوکیوم‌های در محیط کشت CLA به رنگ نارنجی و ماکروکنیدیوم‌ها با شکل کلی راست و سلول راسی دارای لبه ضخیم تا گرد و سلول پایه اندکی به شکل پاشنه توسعه یافته مشاهده گردید (شکل ۲-M)، به ابعاد $5-6 \times 30-45$ میکرومتر و دارای $3-5$ دیواره عرضی مشاهده شد (شکل ۲-N-O). میکروکنیدیوم‌ها به شکل‌های مختلف تخم مرغی، کلیوی، بیضوی، دوکی، دارای $1-2$ دیواره عرضی و به ندرت تا

سلول کنیدیوم‌ها از نوع مونوفیالید کوتاه مشاهده شد. کلامیدوسپورها به صورت دوتایی و تکی و به شکل کروی با دیواره‌های صاف دیده شدند (شکل ۲-F). پرگنه گونه *Fusarium incarnatum* روی محیط کشت PDA رشد سریع داشت. قطر پرگنه بعد از هفت روز در شرایط 25 درجه سلسیوس و تاریکی $6/5-7$ سانتیمتر اندازه‌گیری شد. رنگ پرگنه کرم با مرکز قهوه‌ای دیده شد. اسپوردوکیوم‌ها در محیط کشت CLA به رنگ نارنجی کم رنگ، لزج و پوشیده شده از میسیلیوم تشکیل شد (شکل ۲-I). ماکروکنیدیوم‌ها تقریباً پهن، راست با سلول راسی کمی نوک تیز و سلول پایه به شکل پاشنه ضعیف، به ابعاد $5-3 \times 27-50$ میکرومتر و دارای $3-5$ دیواره مشاهده شدند (شکل ۲-J). میکروکنیدیوم‌ها به شکل‌های بیضوی و دوکی، دارای $1-2$ دیواره عرضی و به ندرت تا 2 دیواره با ابعاد $2-3 \times 7-15$ میکرومتر اندازه‌گیری شدند. این گونه



شکل ۱- (A-C) لکه برگی و علائم پژمردگی درختان موز در مناطق نمونه‌برداری.

Figure 1-(A-C) Leaf spots and wilting symptoms on Banana in sampling regions.



شکل ۲- *Fusarium oxysporum* (A) اسپرودوکیوم، (B-C) ماکروکنیدیوم، (D-E) میکروکنیدیوم، (F) کلأمیدوسپور. *Fusarium incarnatum* (I) اسپرودوکیوم، (J) ماکروکنیدیوم، (K) مزوکنیدیوم، (L) کلأمیدوسپور. *Neocosmospora* sp. (M) اسپرودوکیوم، (N-O) ماکروکنیدیوم، (P) میکروکنیدیوم، (Q) کلأمیدوسپور. *Fusarium* sp. (R) مونوفیالیید و پلی فیالیید، (S) ماکروکنیدیوم، (T) سرکاذب، (U) کلأمیدوسپور. مقیاس ۱۰ میکرومتر.

Figure 2- *Fusarium oxysporum*, (A) Sporodochia, (B-C) Macroconidia, (D-E) Microconidia, (F) Chlamydospore. *Fusarium incarnatum*, (I) Sporodochia, (J) Macroconidia, (M) Mesocoindia, (L) Chlamydospore. *Neocosmospora* sp., (M) Sporodochia, (N-O) Macroconidia, (P) Microconidia, (Q) Chlamydospore. *Fusarium* sp. (R) Monophialid and Polyphialid, (S) Macroconidia, (T) False head, (U) Chlamydospore. Scale bar=10 µm.

و تعداد مکان‌های متغیر و حفاظت شده به ترتیب ۲۵۶ و ۲۴۰ و ۴۲۰ نوکلئوتید می‌باشد. نتایج حاصل از واکاوی فیلوژنتیکی نشان می‌دهد که اطلاعات بدست آمده از ترادف‌های این نواحی ژنومی با مقادیر اعتبارسنجی بالایی قادر به تفکیک گونه‌های جنس *Fusarium sensu lato* می‌باشد. باتوجه به نتایج حاصل از واکاوی فیلوژنتیکی، جدایه‌های مختلف مورد بررسی در این تحقیق در سه گروه متفاوت قرار گرفتند. بر اساس این نتایج گونه *Fusarium oxysporum* با مقدار اعتبارسنجی ۹۹ درصد در گروه *Fusarium Oxysporum*، جدایه‌های متعلق به گونه *Fusarium incarnatum* در گروه *incarnatum-equiseti* با مقدار اعتبارسنجی ۱۰۰ درصد و جدایه‌های متعلق به گونه *Neocosmospora sp.* در گروه *Neocosmospora sp.* اعتبارسنجی ۱۰۰ درصد قرار گرفتند (شکل ۳). نتایج حاصل از واکاوی فیلوژنتیکی و مقایسه توالی‌های بدست آمده از مقالات معتبر با توالی‌های گونه‌های *Fusarium incarnatum*، *oxysporum* و *Neocosmospora sp.* شناسایی گونه‌ها را براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی تایید کرد.

آزمون بیماری‌زایی

علائم ایجاد شده توسط گونه‌های *Fusarium oxysporum* (سه جدایه) (شکل ۳-A)، *Fusarium incarnatum* (سه جدایه) (شکل ۳-B-C) و *Neocosmospora sp.* (سه جدایه) (شکل ۳-D) جدا شده از ریشه بوته‌های موز دارای علائم پژمردگی، هفت روز پس از مایه زنی روی ریشه موز به صورت پژمردگی در برگ‌های بالایی ظاهر گردید که پس از بررسی ریشه‌های گیاهان تلقیح شده، پوسیدگی ریشه به خوبی مشهود بود. دو جدایه از گونه *Fusarium sp.* (شکل ۳-E) و یک جدایه از گونه *F. incarnatum* (علائم مشابه علائم گونه *Fusarium sp.* ایجاد شد) جدا شده از برگ دارای علائم لکه برگ، روی برگ موز مایه‌زنی شد که پس از گذشت

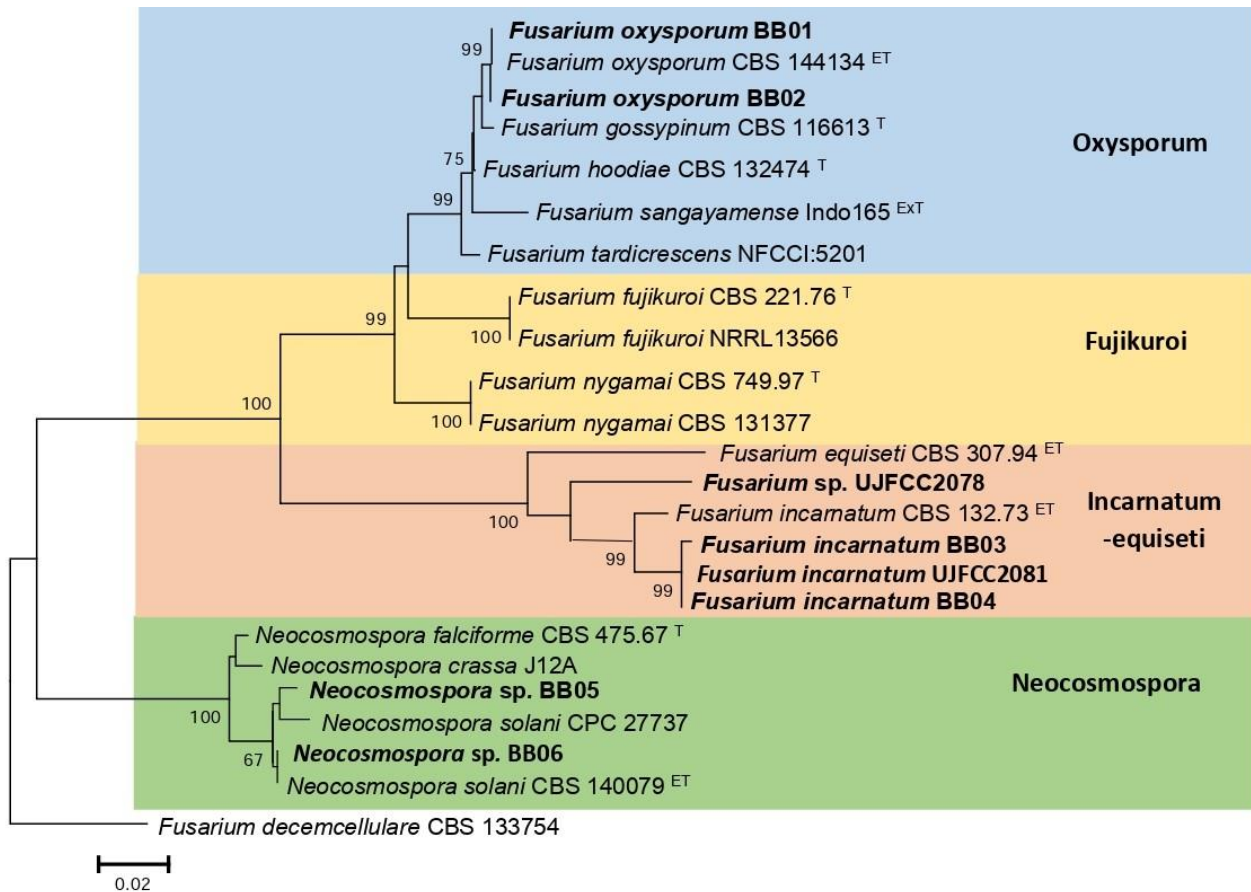
۲ دیواره و با ابعاد $2-3 \times 23-8$ میکرومتر مشاهده شد (شکل ۲-P). سلول کنیدیوم‌زا در این گونه مونوفیالید، بلند و غیر منشعب مشاهده شد. کلامیدوسپور به فراوانی به صورت خوشه‌ای، زنجیری، دوتایی و میانی تا انتهایی و به شکل کروی مشاهده شد (شکل ۲-Q). ویژگی‌های ریخت‌شناختی *Neocosmospora sp.* به گونه *Neocosmospora solani* شباهت بالا نشان داد. با وجود این، به دلیل آشفتگی‌های موجود در تاکسونومی این گونه، جدایه‌های این مطالعه به صورت گونه ناشناخته معرفی می‌شوند.

قطر پرگنه گونه *Fusarium sp.* روی محیط کشت PDA بعد از گذشت هفت روز در دمای ۲۴ درجه سلسیوس ۶۰ سانتیمتر است. پرگنه به رنگ سفید، و با بافت پنبه‌ای مشاهده شد. پرگنه از پشت تشتک پتری به رنگ زرد دیده شد. اسپوردوکیوم به فراوانی در محیط تولید شد. ماکروکنیدیوم‌ها بصورت کشیده کمی هلالی شکل، با ابعاد $2/5-3 \times 35-20$ میکرومتر دارای ۳-۵ بند عرضی با سلول انتهایی نوک تیز اندازه‌گیری شد (شکل ۲-S). میکروکنیدیوم‌ها کروی تا دوکی شکل با ابعاد ۲۰-۹ میکرومتر، داری ۲-۱ بند عرضی به صورت منوفیالید و پلی‌فیالید می‌باشند (شکل ۲-R). کلامیدوسپورها بعد از ۱۴ روز و به صورت زنجیری بین ریشه تشکیل می‌شود (شکل ۲-U).

نتایج واکاوی فیلوژنتیکی جدایه‌های *Fusarium sensu lato* بدست آمده از موز

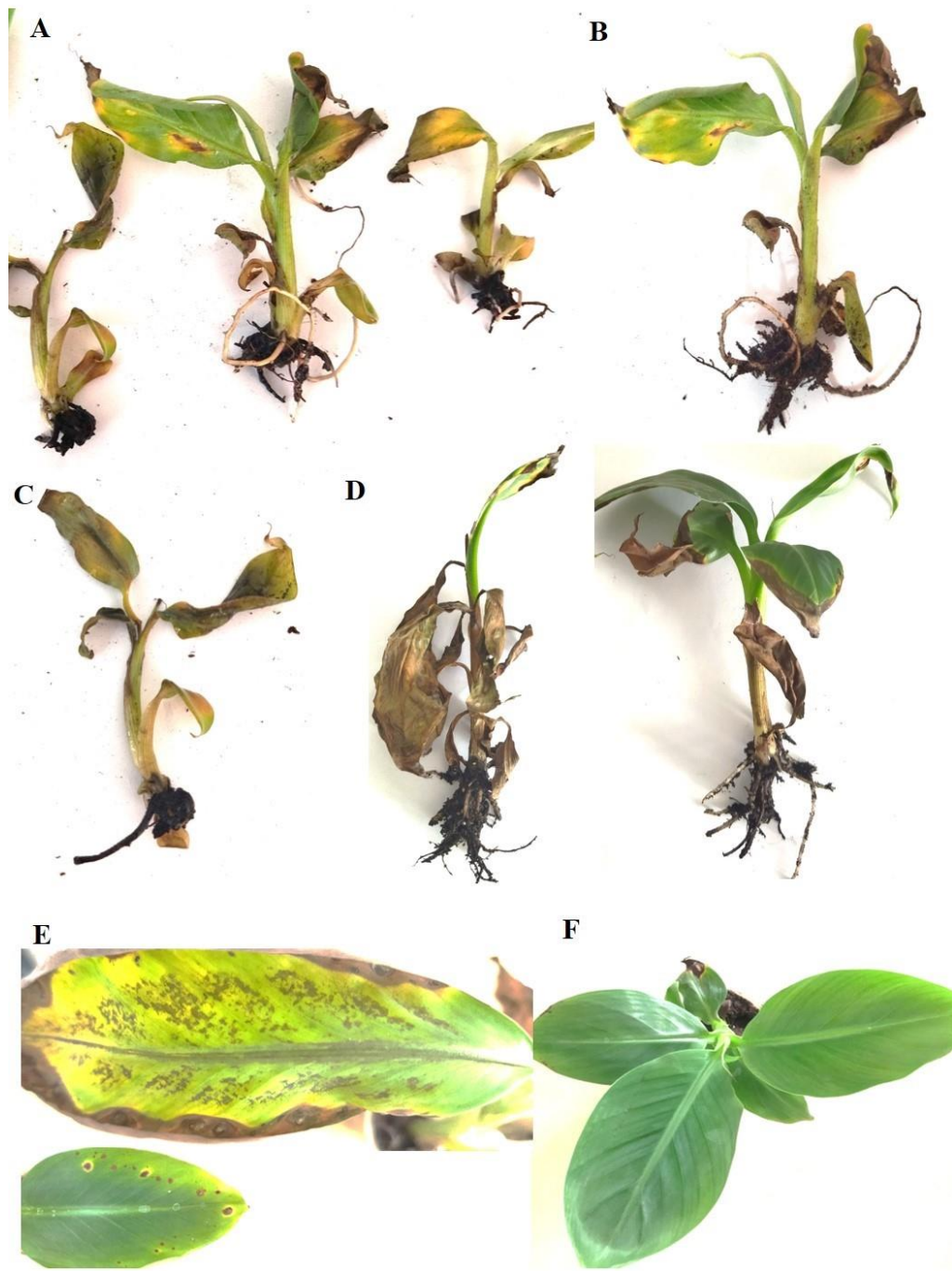
طول توالی نوکلئوتیدی ژن *EF-1 α* در بین ۸ جدایه توالی‌یابی شده از ۴۳۰ الی ۵۸۰ جفت باز متغیر بود. در شجره حاصل از روش MP (Maximum-Parsimony)، ضرایب مربوط به طول درخت، مقیاس استحکام و هماهنگی شجره، شاخص بازداری و شاخص واحدها به ترتیب ۱۰۹، ۰/۸۵، ۰/۹۰ و ۰/۷۸ بودند. تعداد مکان‌های مفید (Informative sites) ۲۴۰ نوکلئوتید از ۶۸۰ نوکلئوتید

هفت روز از مایه‌زنی علائم لکه برگگی به خوبی روی برگ موز قابل مشاهده بود. گیاهان شاهد فاقد علائم بودند (شکل ۳- F). از نمونه‌های دارای علائم پژمردگی و لکه برگگی مجدد گونه‌های ذکر شده جداسازی و شناسایی شد.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه *Elongation factor 1-α* با روش MP (Maximum Parsimony) برای ۲۳ تاکسون. اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی (bootstrap) از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. طول شاخه با تعداد تغییرات باز که به صورت مقیاس بار نشان داده شده است. متناسب می‌باشد. گونه *Fusarium decemcellulare* CBS 133754 به عنوان outgroup انتخاب شده است. T-گونه تیپ، ET-اپی تیپ، ExT-اکس تایپ.

Fig. 3. A Maximum Likelihood tree inferred from the *Elongation factor 1-α* sequences for 23 species. The numbers above the branches show the bootstrap values in 1000 replicates. The length of branches is proportional to the number of base changes, indicated by the scale bar. *Fusarium decemcellulare* CBS 133754. T-type species, ET- epitype, ExT-extype.



شکل ۴- (A) علائم پژمردگی و پوسیدگی ریشه ایجاد شده توسط گونه *Fusarium oxysporum* (B-C) *Fusarium incarnatum* (D) *Neocosmospora* sp.، (E) علائم لکه برگی ایجاد شده توسط گونه *Fusarium* sp.، (F) شاهد.

Figure 4- (A) Wilting and root rot caused by *Fusarium oxysporum*, (B-C) *Fusarium incarnatum*, (D) *Neocosmospora* sp., (E) Leaf spots caused by *Fusarium* sp. (F) Control.

جدول ۱. لیست جدایه‌های توالی یابی شده در این مطالعه

Table 1. New generated sequences used in this study.

Species	Culture collection no.	Geographic region	Genbank accession no. (<i>TEF1a</i>)
<i>Fusarium oxysporum</i>	BB01	Zar Abad-Sistan and Baluchestan	OR250291
<i>Fusarium oxysporum</i>	BB02	Zar Abad-Sistan and Baluchestan	OR250292
<i>Fusarium incarnatum</i>	BB03	Zar Abad-Sistan and Baluchestan	OR250295
<i>Fusarium incarnatum</i>	BB04	Zar Abad-Sistan and Baluchestan	OR250296
<i>Fusarium incarnatum</i>	UJFCC2081	Minab-Hormozgan	OR413785
<i>Fusarium</i> sp.	UJFCC2078	Zar Abad-Sistan and Baluchestan	OR413786
<i>Neocosmospora</i> sp.	BB05	Zar Abad-Sistan and Baluchestan	OR250293
<i>Neocosmospora</i> sp.	BB06	Zar Abad-Sistan and Baluchestan	OR250294

در سال‌های اخیر توجه محققان به بیماری‌های پژمردگی و لکه برگی موز خصوصاً در کشورهای اصلی تولید کننده موز افزایش یافته‌است (Olivares et al. 2021). تاکنون گونه‌های متعددی از جنس *Fusarium* از قسمت‌های مختلف گیاه موز نظیر ساقه، ریشه، برگ و بنه جداسازی و شناسایی شده است (Sing 2000; Jones 2000; Amani & Avagyan 2014b) و همکاران (Li-Sha & Avagyan 2013) و همکاران (۲۰۱۳) از میوه، بنه و ساقه‌های کاذب بوته‌های موز، گونه‌های *F. F. camptoceras*, *F. solani*, *F. oxysporum*, *F. F. chlamydosporum*, *F. stiloides pallidoroseum*, *F. F. concentricum*, *F. proliferatum verticillioides* را گزارش کردند (Li-Sha et al. 2013). ماریانی و همکاران (۲۰۱۹) سه گونه *Fusarium* را به عنوان عامل پژمردگی بوته موز در اندونزی گزارش کردند که این گونه‌ها به کمپلکس‌های *Fusarium fujikuroi*، *Fusarium sambucinum* و *incarnatum-equiseti* تعلق داشتند (Maryani et al. 2019). در سال ۲۰۱۹، نوزاوا و همکاران (Nozawa et al. 2019) علائم زردی و تغییر رنگ آوندهای بوته موز رقم کاوندیش را مشاهده کردند و گونه *F. mindanaoense* متعلق به کمپلکس *F. fujikuroi* را جداسازی کردند گونه‌های *Fusarium* شامل *F. F. subglutinans*, *F. semitectum*، *F. verticillioides*

به عنوان عامل بیماری *F. moniliforme* و *sambucinum* روی میوه و گونه *F. oxysporum* به عنوان مهم‌ترین عامل پژمردگی موز در ایران گزارش شده است (Amani & Avagyan 2014b) در بررسی حاضر نیز سه گونه از جنس *Fusarium* و یک گونه از جنس *Neocosmospora* به دست آمد که در آزمون بیماری‌زایی قادر به ایجاد لکه‌برگی (*Fusarium* و *Fusarium* sp. و *incarnatum*) و پژمردگی بوته و پوسیدگی ریشه (*Neocosmospora* و *F. incarnatum*، *F. oxysporum* sp.) گیاه موز بودند. بر اساس اطلاعات موجود، این اولین گزارش از بیماری‌زایی *F. incarnatum* و *Neocosmospora* sp. روی موز در ایران می‌باشد.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی بنیاد ملی نخبگان ایران، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان و دانشگاه جیرفت انجام گردید که بدینوسیله از آنها تشکر و قدردانی می‌شود. همچنین از آقای دکتر هادی درودی مسول آزمایشگاه کشت بافت مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی بلوچستان به دلیل در اختیار گذاشتن نهال موز، تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- آمارنامه کشاورزی محصول باغی سال ۱۳۹۹ (چاپ ۱۴۰۰)، محصولات باغی، وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات، تهران.
- Abdalla M. Y., Al-Rokibah A., Moretti A., Mule G. 2000. Pathogenicity of toxigenic *Fusarium proliferatum* from date palm in Saudi Arabia. *Plant Disease* 84: 321-324.
- Alwahshi K. J. et al. 2019. Molecular identification and disease management of date palm sudden decline syndrome in the United Arab Emirates. *International Journal of Molecular Sciences* 20: 923.
- Amani M., Avagyan, G. 2014a. Effect of polyethylene bunch cover on fungal diseases control of banana (*Musa acuminata* L.) in Iran. *International Journal of Farming and Allied Sciences* 310: 1054-1057.
- Amani M., Avagyan G. 2014b. Isolation and identification of fungal pathogens on banana trees (*Musa acuminata* L.) in Iran. *International Journal of AgriScience*, 48: 409-413.
- Bosman M. 2016. Role of the Environment on the Incidence of Panama Disease in Bananas; Wageningen University: Wageningen, The Netherlands, 12–68.
- Crous P. W., Lombard L., Sandoval-Denis M., Seifert K. A., Schroers H. J., et al. 2021. *Fusarium*: more than a node or a foot-shaped basal cell. *Studies in Mycology* 98:100116. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2021.100116>.
- Edgar R. C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5:113.
- Geiser D. M., Jimenez-Gasco M. M., Kang S., Makalowski I., Veeraraghavan N., Ward T. J., Zhang N., Kuldau G. A. O'Donnell K. 2004. FUSARIUM-ID v.1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 473–479.
- Jones D. R. 2000. Diseases of Banana, Abaca & Enset. CAB International. 544pp.
- Leslie J. F., Summerell B. A. 2006. The *Fusarium* laboratory manual. Ames, Blackwell Publishing Professional. 388 pp.
- Li-Sha Z., Zhi-Hui Z., Shun L., Zhuo-Jun X., Min-Hui L., Ping-Gen X., Zi-De J. 2013. The *Fusarium* species isolated from banana and their phylogenetic relationships. *Mycosystema* 32: 617–632.
- Maryani N., Lombard L., Poerba Y. S., et al. 2019. Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology* 92: 155–194.
- Nelson P. E., Dignani M. C., Anaissie E. J. 1994. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clinical Microbiology Reviews* 7: 479–504.
- Nelson P. E., Toussoun T. A., Burgess L. W. 1987. Characterization of *Fusarium beomiforme* sp. nov. *Mycologia* 79: 884–889.
- Nelson P. E., Toussoun T. A., Marasas W. F. O. 1983. *Fusarium* species: An illustrated manual for identification. Pennsylvania State University Press, USA.
- Nozawa S.; Seto Y.; Takata Y.; Narreto L. A.; Valle R. R.; Okui K.; Taida S.; Alwindia D. G.; Reyes R.G.; Watanabe K. 2023. *Fusarium mindanaoense* sp. nov., a New *Fusarium* Wilt Pathogen of Cavendish Banana from the Philippines Belonging to the *F. fujikuroi* Species Complex. *Journal of Fungi* 9, 443. <https://doi.org/10.3390/jof9040443>
- Olivares B. O., Rey J. C., Lobo D., Navas-Cortes J. A., Gomez J. A., Landa B. B. 2021. *Fusarium* Wilt of Bananas: A review of sgroenvironmental factors in the venezuelan production system affecting its development. *Agronomy* 11: 986.
- Ordóñez N., Seidl M. F., Waalwijk C., Andre D., Kilian A., Thomma B. P. H., Ploetz, R. C., Kema, G. H. J. 2015. "Worse Comes to Worst: Bananas and Panama disease- when plant and pathogen clones meet." *PLOS Pathogens*, 11: 1–7.
- Pordel A., Javan-Nikkhah M., and Khodaparast S. A. 2015. Revision of *Pyricularia oryzae* and occurrence of new hosts for the pathogen Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology* 52: 67–83.
- Thangamani P. R., Kuppusamy P., Peeran M. F., Gandhi K., Raguchander T. 2011. Morphological and physiological characterization of *Colletotrichum musae* the causal organism of banana anthracnose.

- World Journal of Agricultural Sciences 76: 743–754.
- Raut S., Ranade S. 2004. Diseases of banana and their management. Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II: Diagnosis and Management, 37–52.
- Sing R. S. 2000. Diseases of Fruit Crops. Published by Scince Publisher, Inc., Enfield, NH, USA
- Stover R. H., Simmonds, N. W. 1987. *Bananas*. Longman Scientific & Technical.
- Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., and Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729.
- Zhong S., Steffenson B. J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 915: 469–476.