



وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور

نشریه فنی

شناسایی و مدیریت پوسیدگی سفید پیاز با عامل
Sclerotium cepivorum

نگارندگان:

فاطمه خلعتی بناء، کسری شریفی

و علیرضا جوادی

شماره ثبت:

۶۲۰۹۷

۱۴۰۱

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور

شناسایی و مدیریت پوسیدگی سفید پیاز با عامل
Sclerotium cepivorum

نگارندگان:

فاطمه خلعتی بناء، کسری شریفی و علیرضا جوادى

مخاطبان نشریه فنی: کارشناسان سازمان حفظ نباتات و مراکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، نشریه فنی

شناسایی و مدیریت پوسیدگی سفید پیاز با عامل *Sclerotium cepivorum*

نگارندگان: فاطمه خلقتی بناء، کسری شریفی و علیرضا جوادی

ناشر: مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور

سال نشر: ۱۴۰۱

شماره و تاریخ ثبت نشریه: ۶۲۰۹۷ مورخ ۱۴۰۱/۰۶/۰۸

نشانی مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی:

تهران، بزرگراه شهید چمران، خیابان یمن، پلاک ۱، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
۱	پیشگفتار
۲	مقدمه
۳	عامل بیماری
۳	جنس <i>Sclerotium</i>
۶	مناطق پراکنش
۶	علائم بیماری
۸	چرخه بیماری و همه گیری شناسی
۱۰	تنوع ژنتیکی
۱۱	صفات ریخت شناختی بیمارگر
۱۳	جداسازی، شناسایی و ردیابی عامل بیماری
۱۴	ردیابی مولکولی
۱۶	آنالیز محصول PCR
۲۱	مدیریت بیماری
۲۲	مواد شیمیایی خاک کاربرد
۲۴	مواد شیمیایی برگ کاربرد
۲۵	کنترل بیولوژیکی
۲۷	بهنجادی پیاز برای مقاومت به <i>S. cepivorum</i>
۲۹	فهرست منابع

پیشگفتار

پیاز (*Allium cepa* L.)، محصولی باستانی، با سابقه کشتی بیش از ۵۰۰۰ سال است که تصور می‌شود منشأ آن آسیای مرکزی باشد (۸). پیاز به دلیل برخورداری از ویتامین‌ها به ویژه ویتامین C و مواد معدنی به ویژه کلسیم، فسفر و پتاسیم دارای ارزش غذایی فراوانی است. از سوی دیگر می‌تواند با تقویت سیستم ایمنی بدن در پیشگیری از بیماری‌ها موثر باشد. پیاز دارای آنتی‌اکسیدان‌های ضد سرطان مانند کرسٹین و آنتوسیانین بوده و مصرف آن در پیشگیری از ابتلا به برخی از سرطان‌ها مانند سرطان معده مفید است. سطح زیر کشت پیاز در ایران در حدود ۵۴ هزار هکتار با متوسط عملکرد حدود ۴۳ تن در هکتار است. بیشترین سطح زیر کشت پیاز به ترتیب متعلق به استان‌های هرمزگان (۸۳۷۸ هکتار)، جنوب استان کرمان (۵۷۳۲ هکتار) و اصفهان (۴۲۶۸ هکتار) است (۲). چندین آفت و بیمارگر کشت محصول پیاز را تهدید می‌کند که از میان آن‌ها بیماری پوسیدگی سفید طبق از شیوع و اهمیت بالایی برخوردار است. این بیماری در اغلب مناطق کاشت سیر و پیاز دیده می‌شود. به ویژه در استان همدان میزان گسترش، شیوع و خسارت بیماری بیشتر است. ردیابی و شناسایی دقیق بیماری، آگاهی از چرخه بیماری و شرایط مساعد برای توسعه آن به عنوان پیش‌نیازی اساسی در اتخاذ روش‌های مناسب در برنامه‌های پیش‌آگاهی و مدیریت بیماری شناخته می‌شود. در این نوشتار به طور اجمالی به معرفی بیماری، شناسایی بیمارگر از نظر جایگاه تبارشناسی^۱ و تنوع ژنتیکی،

اصول مهم در همه گیری شناسی^۱ این بیماری، روش های شناسایی و ردیابی آن در اندام های گیاهی و سرانجام مدیریت بیماری پرداخته می شود.

مقدمه

بیماری پوسیدگی سفید پیاز با عامل *Sclerotium cepivorum* یکی از بیماری های مهم جنس *Allium cepa* است. این بیمارگر در همه گونه های جنس *Allium* به ویژه پیاز، سیر و تره فرنگی، بیماری زا است. این به دلیل اهمیت و گسترش جهانی، بیش از هر بیماری دیگری محصول پیاز را در دنیا تهدید می کند (۴،۳،۵). پوسیدگی سفید در مراحل اولیه محدود به سیستم ریشه و صفحه قاعده ای است و با گذشت زمان از آلودگی، علائم بیماری در بخش های هوایی پدیدار می شود. علائم هوایی معمولاً تا زمان پیشرفت بیماری و بروز پوسیدگی در ساقه و غلاف برگ ها ظاهر نمی شود. رشد و توسعه افقی ریشه های آلوده به میسلیم های قارچ بیمارگر، بیماری را به گیاهان مجاور منتقل می کند. بنابراین آلودگی در مزرعه به صورت لکه ای و در بوته های نزدیک به هم مشاهده می شود (۶). خاکزاد بودن این بیمارگر نیز استفاده از تیمارهای شیمیایی رابی اثر یا کم اثر می سازد. بنابراین مدیریت این بیماری اغلب بسیار دشوار و نیازمند تلفیقی از راهبردهای مختلف زراعی و بیولوژیکی است. تاکنون تلاش های بهنژادی برای دستیابی به منابع مقاومت به این بیماری چندان موفقیت آمیز نبوده به طوری که در حال حاضر هیچ رقم مقاومی برای این بیماری وجود ندارد.

عامل بیماری

عامل این بیماری قارچ *Sclerotium cepivorum* است که در منابع با نام تلومورف *Stromatinia cepivora* نیز شناخته می‌شود (۷). مطالعات فیلوژنتیکی *S. cepivorum* را به *Sclerotinia sclerotiorum* مرتبط دانسته و این فرضیه را تقویت می‌کند که *S. cepivorum* یکی از اعضای غیر جنسی خانواده *Sclerotiniaceae* و از قارچ‌های آسکومیست است (۸۴). گونه *S. cepivorum* یک گونه غیر جنسی است و منشاء گونه‌های قارچی غیر جنسی^۱ را از دست رفتن مرحله جنسی در اجداد یک گونه قارچی می‌دانند (۷۷، ۷۱). این فرضیه را مطالعه جنس‌های *Penicillium* و *Aspergillus* نیز تایید می‌کند (۳۵، ۵۲). در این گونه‌ها نیز مرحله جنسی قارچ در طول تکامل حذف شده‌است.

جنس *Sclerotium*

گونه‌های متعلق به جنس *Sclerotium* تنها اسکروت^۲ و ریشه‌های نازیا^۳ تولید کرده و اسپور^۴ تولید نمی‌کنند. این جنس شامل بیش از ۴۰ گونه بیماری‌زای گیاهی است که بسیاری از آن‌ها تولید مثل جنسی نداشته و تنها در تعداد کمی از این گونه‌ها تولید مثل جنسی مشاهده می‌شود (۴۷، ۶۷). از آن جا که بیشتر گونه‌های جنس *Sclerotium* فاقد تولید مثل جنسی هستند، تاکسونومی این گونه‌ها پیچیده و در طول زمان دستخوش تغییرات زیادی شده است. نام جنس *Sclerotium* نخستین بار توسط Tode در سال ۱۷۹۰ پیشنهاد شد و گونه *Sclerotium complanatum*

1-asexual fungal spesies

2-sclerotium

3-sterile mycelium

4-spore

به عنوان گونه تیپ توسط کلمنتس و شیر (۹) و به عنوان شکل آنامورف گونه *Typhula phacorrhiza* معرفی شد. اسکروت در این گونه بازیدیوکارپ تولید می کند (۲۳). گونه *S. rolfsii* شناخته شده ترین گونه در این دسته است که شکل جنسی یا تلومورف^۱ آن با نام *Athelia rolfsii* شناخته می شود. اسکروت ها در این گونه از ریشه های رشته ای تشکیل شده و بازیدیوکارپ ها از نوع واژگون^۲ هستند (۷۸). گرچه در گونه *S. cepivorum* مرحله جنسی مشاهده نشده است، اما بر اساس تشابه اسکروت در این گونه با اسکروت گونه های آسکومیست *Stromatinia gladioli*، گونه *S. cepivorum* به تلومورف *Stromatinia* Boud مرتبط دانسته شد (۸۳). هرچند انتخاب این تلومورف که بر اساس مرفولوژی اسکروت انجام شده بود، مورد انتقاد است (۴۹). گونه های جنس *Stromatinia*، دو نوع اسکروت تولید می کنند. اسکروت هایی که نازک، سیاه، زیر کوتیکولی، فاقد پوشش یا مانند^۳ هستند و آپوتسیوم^۴ تولید می کنند و اسکروت هایی که سیاه، کوچک و مدور بوده و آپوتسیوم تولید نمی کنند (۸۳). در گونه *S. cepivorum* تنها نوع دوم اسکروت تولید می شود. کن و گرنویل (۱۹۸۹) دریافتند که اسکروت های *S. cepivorum* بر اساس صفات ریخت شناسی و بافت شناسی^۵ بسیار به اسکروت های جنس *Botrytis* شباهت دارند (۷). همان طور که پیش تر اشاره شد نتایج آنالیز توالی rDNA نزدیکی *S. cepivorum* را به گونه *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) Debary یکی از گونه های مهم در خانواده *Sclerotiniaceae* را تایید می کند (۴۴). علاوه بر این آنالیز پروتیین های اسکروت نیز نزدیکی *S. cepivorum* به

1-telomorph

2- resupinate

3-mantel

4-apothecium

5-histopathology

خانواده *Sclerotiniaceae* ، را تایید می‌کند (۶۳). برخی از گونه‌های جنس *Sclerotium* ممکن است با آنامورف جنس *Rhizoctonia* در ارتباط باشند. جنس *Rhizoctonia* نیز اسکروت‌ها و ریشه‌های استریل تولید می‌کند (۲۳). گونه *Rhizoctonia solani*، به عنوان آنامورف گونه بازیدیومیست *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk شناخته می‌شود. اما بیشتر تاکسونومیست‌ها گونه *R. solani* را گونه‌ای کمپلکس می‌دانند که بیشتر از ۳۰ قارچ همنام برای آن در منابع ذکر شده است (۶، ۳۸، ۸۲). برخی از گونه‌های *R. solani* دو هسته‌ای دارای تلومورف از جنس *Ceratobasidium* هستند در حالی که برای تلومورف برخی از گونه‌های دو هسته‌ای در کمپلکس *R. solani* در جنس *Thanatephorus* شناسایی شده است. اما این تلومورف‌ها، مونوفیلیک^۱ نیستند (۷۴). گونه *Sclerotium oryzae-sativae* (Saw) به عنوان آنامورف گونه تلومورف *Ceratobasidium oryzae-sativae* (Gunnell and Gunnell) شناخته می‌شود (۶۱). در پژوهشی، جایگاه تبارشناسی گونه‌های مهم بیماریزا در جنس *Sclerotium* شامل *Sclerotium cepivorum*، *S. coffeicola*، *S. denigrans*، *S. rhizodes*، *S. perniciosum*، *Ceratohiza oryzae-sativae*، *hydrophilum* و *S. rolfsii* var. *delphinii*، به کمک آنالیز پارسیمونی توالی زیر واحد بزرگ rDNA^۲-LSU و ناحیه ITS-rDNA^۳ مورد بررسی قرار گرفت (۸۴). نتایج این پژوهش نشان داد که دو گونه *S. denigrans* و *S. perniciosum* که پیش از این در بازیدیومیست‌ها جای داده می‌شدند، به آسکومیکوت‌ها تعلق دارند. همچنین این گونه‌ها با گونه‌های تلومورف *Sclerotinia* و *Stromatinia* و آنامورف

1-monophyletic

2-Larg subunit ribosomal DNA

3-Internal Transcribed Spacer ribosomal DNA

Sclerotium cepivorum نزدیکی دارند. گونه‌های دیگر جنس *Sclerotium* در یکی از دو جنس بازیدیومیستی *Athelia* یا *Ceratobasidium* گروه‌بندی شدند. بر اساس نتایج آنالیز tDNA، دو گونه بازیدیومیستی *Sclerotium hydrophilum* و *S. rhizodes* به جنس *Ceratohiza* که آنامورف گونه‌های *Ceratobasidium* است، منتقل شدند. گونه *Sclerotium coffeicola* به گونه‌های *S. rolfsii* var. *delphinii* و *S. rolfsii* var. *rolfsii* که دارای تلومورف *Atelia* هستند، نزدیک است.

مناطق پراکنش

این بیماری در اغلب مناطق کاشت سیر و پیاز در دنیا گزارش شده‌است در ایران نیز در اغلب مناطق کشت این محصول در کشور دیده می‌شود اما در استان همدان میزان گسترش، شیوع و خسارت بیماری شدیدتر است (۱).

علائم بیماری

در مراحل اولیه پیشرفت، بیماری محدود به سیستم ریشه و صفحه قاعده‌ای است و تا زمان رشد قارچ در پیازها علائم بیماری در برگ‌ها ظاهر نمی‌شود. با گذشت زمان، نوک برگ‌ها زرد شده و به تدریج علائم زردی تمام بخش‌های هوایی گیاه را فرا می‌گیرد (شکل ۱). در بوته‌های جوانتر به دلیل رشد کمتر و توسعه نیافتگی سیستم ریشه، بروز زردی ممکن است به پژمردگی، افتادن بوته و حتی مرگ بوته منجر شود (۱۵). در مراحل پایانی بیماری، پوشش پنبه‌ای میسلیم‌های قارچ در سطح اندام‌های هوایی گیاه قابل مشاهده است. ریشه‌ها نیز به تدریج تخریب شده و در اثر فعالیت آنزیمی قارچ صفحه اتصالی در قاعده پیاز دچار پوسیدگی نرم می‌شود.

بوته‌های آلوده را می‌توان به راحتی از خاک بیرون کشید. با پیشرفت بیماری بافت‌های پنبه‌ای قارچ فشرده شده و اسکروت‌های سیاه رنگ (به اندازه ته سنجاق) به قطر تقریبی ۳۰۰ تا ۶۰۰ میکرومتر روی پوشش میسلیمی قارچ در قاعده پیاز، ریشه‌های پوسیده و بافت ساقه تشکیل می‌شوند. ممکن است بافت اسکروتی بزرگتری نیز به عنوان پوششی برای اسکروت‌های کوچکتر تشکیل شود (۵۸).



شکل ۱- علائم بیماری در سیر (راست) و پیاز (چپ) در مقایسه با گیاه سالم
(عکس از علیرضا جوادی)

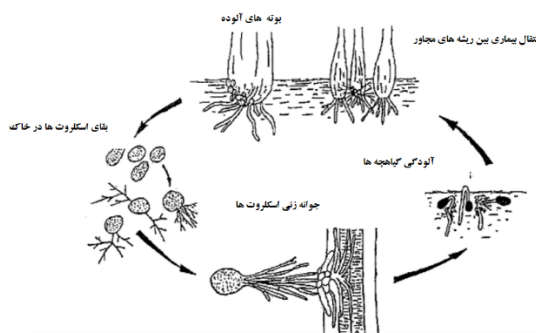
چرخه بیماری و همه‌گیری شناسی

این بیماری یکی از عوامل محدود کننده کشت اقتصادی پیاز در برخی از مناطق آلوده به شمار می‌رود (۷۳). در صورت مساعد بودن شرایط محیطی مانند هوای سرد (دمای ۱۴ تا ۱۸ درجه سلسیوس) و رطوبت مناسب برای جوانه‌زنی اسکروت‌ها (رطوبت متوسط تا بالای خاک)، آلودگی ممکن است در همه مراحل رشدی میزبان و حتی در مرحله گیاهچه‌ای نیز رخ دهد (۵، ۶۰، ۵۴، ۱۷). این بیماری از نمونه‌های شناخته شده بیماری‌های تک چرخه‌ای^۱ است و اسکروت‌های قارچ بیمارگر در یک فصل کشت برای مدت ۱-۳ ماه پس از تشکیل به صورت غیرفعال^۲ باقی می‌ماند. اسکروت‌ها تا بیشتر از ۲۰ سال در خاک قدرت ماندگاری داشته (۲۰) و به همراه آب، باد و وسایل و ادوات کشاورزی از مزارع آلوده به فواصل نزدیک منتقل می‌شود. اما انتقال بیماری به فواصل دور به وسیله مواد گیاهی آلوده انجام می‌شود (۷۱). پس از جوانه‌زنی، شدت بیماری به دمای خاک و اندازه جمعیت اسکروت‌های بیمارگر در خاک بستگی دارد. وجود تنها یک اسکروت در ۱۰ کیلوگرم از خاک مزرعه برای شروع آلودگی میزبان کافی است و با وجود تنها ۱ اسکروت در هر کیلوگرم خاک مزرعه، می‌توان انتظار وقوع بیماری به میزان ۵۰٪ را داشت و وجود ۱۰ تا ۲۰ اسکروت در هر کیلوگرم خاک مزرعه، زاد مایه اولیه را برای آلودگی تمام گیاهان مزرعه فراهم می‌کند (۶). اسکروت‌ها در نبود میزبان به حالت غیر فعال باقی‌مانده و ترشحات ریشه پیاز یا سایر محصولات جنس *Allium* برای تحریک جوانه‌زنی اسکروت‌ها ضروری است. این ترشحات معمولاً در خاک تا فاصله ۱/۵ سانتی متر از ریشه منتشر می‌شوند. چرخه زندگی قارچ در شکل ۲ نشان

1-monocyclic

2-dormant

داده شده است. پیشرفت بیماری در خاک سرد (۱۰ تا ۲۰ درجه سلسیوس) و مرطوب بیشتر است و بیماری در دمای بیشتر از ۲۵ درجه سلسیوس متوقف می شود. در *S. cepivorum* افزون بر اسکروت، مانند آن چه در برخی از جنس های خانواده *Sclerotiniaceae* مشاهده می شود، تشکیل میکروکنیدی نیز گزارش شده است (۳۶). تشکیل این میکروکنیدی ها با تغییر دما و افزایش سطح رطوبت، کشت قارچ روی محیط های آزمایشگاهی ضعیف مانند آب-آگار یا در مراحل پایانی رشد قارچ تحریک می شود (۴۰). مشاهدات میکروسکوپ الکترونی نشان داد که میکروکنیدی های *S. cepivorum* در حضور میزبان جوانه زده و ریشه های جوان توانایی نفوذ به کوتیکول میزبان را دارند. این توانایی به وجود فعالیت فنول اکسیداز و استرازی در میکروکنیدی ها نسبت داده می شود (۱۰، ۵۰، ۳۶). از آن جا که تولید تعداد زیاد این میکروکنیدی ها پس از غوطه وری قارچ در آب تحریک می شود، این احتمال وجود دارد که میکروکنیدی ها نقشی حیاتی در ماندگاری و انتقال بیماری در شرایط رطوبت بالا داشته باشند (۳۶).



شکل ۲- چرخه زندگی *Sclerotium cepivorum*

تنوع ژنتیکی

در سال‌های اخیر از چند شکلی‌های DNA به عنوان نشانگر برای شناسایی، تعیین ویژگی‌ها، تنوع ژنتیکی و کشف روابط فیلوژنتیکی بین جدایه‌های میکروارگانیسم‌ها استفاده شده‌است. وجود تنوع ژنتیکی و پتانسیل تغییر در جمعیت یک بیمارگر می‌تواند با ویژگی‌هایی از بیمارگر مانند پرازاری، مقاومت به قارچ‌کش‌ها، ماندگاری، توانایی جوانه‌زنی اسکروت و مقاومت در برابر عوامل کنترل بیولوژیکی و در نتیجه کنترل بیمارگر پیوستگی داشته باشد (۷۹). ارانشا و همکاران (۲۰۰۰)، دریافتند که تفاوت پرازاری جدایه‌های مختلف با گروه‌های متفاوت ژنتیکی مرتبط است (۲۷). تفاوت میان پاسخ جدایه‌های مختلف *S. cepivorum* به قارچ‌کش‌ها، وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت نیوزلندی این بیمارگر را پیشنهاد می‌کند (۷۹). در پژوهشی وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت *S. cepivorum* به کمک هشت نشانگر ژنی و گروه‌های سازگاری رویشی^۱ مورد بررسی و ارزیابی قراگرفت. در این مطالعه شش ژنوتیپ مالتی لوکوس و ۱۲ گروه سازگاری رویشی در جدایه‌های مورد آزمون شناسایی شد. اعضای یک گروه VCG، از نظر ژنوتیپ یکسان بودند اما برخی از ژنوتیپ‌های شناسایی شده در بیش از یک گروه VCG قرار گرفتند (۱۶). وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت *S. cepivorum* در آزمایشات دیگر و به کمک نشانگرهای مولکولی دیگری مانند نشانگرهای رپید^۲ نیز تایید شد (۶۲). وجود تنوع ژنتیکی در جمعیت مصری *S. cepivorum* و نیز وجود هفت گروه VCG در این جمعیت پیشنهاد می‌کند که ممکن است این بیمارگر در چندین نوبت به کشور وارد شده باشد (۷۱). در مجموع با توجه به زیست‌شناسی *S. cepivorum*

1- vegetative compatibility groups, VCGs

2- Random Amplified Polymorphic DNA ,RAPD

فقدان تولید مثل جنسی و محدود بودن روش انتقال آلودگی، انتظار می‌رود که این گونه به صورت کلونال و با تنوع ژنتیکی نسبتاً کم در جمعیت میزبان گسترش یافته باشد. *S. cepivorum* نوعی میکروکنیدی تولید می‌کند که از میکروکنیدی‌هایی که نقش اسپرماتی را در خانواده *Sclerotiniaceae* به عهده دارند، قابل تشخیص نیست (۳۳). اگرچه تشکیل این میکروکنیدی‌ها در قارچ‌ها می‌تواند به بروز تنوع ژنتیکی بالا منجر شود، اما ممکن است تشخیص اثر این نوترکیبی در تاریخچه این گونه از بررسی الگوی غالب از تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت محلی این بیمارگر دشوار باشد (۱۵، ۱۶).

صفات ریخت‌شناختی بیمارگر

پرگنه قارچ روی محیط کشت سفید یا قهوه‌ای متمایل به خاکستری روشن، ریشه-های هوایی کم پشت یا گاهی بصورت پرزهای بلندتر در قسمتهایی از پرگنه مشاهده می‌شود. اسکروت‌ها با آرایش شعاعی یا در بعضی جدایه‌ها پراکنده در محیط کشت، تقریباً کروی شکل، به قطر ۰/۳-۰/۶ میلی‌متر با سطح صاف یا منقوط به رنگ سیاه هستند. سلول‌های انتهایی در ریشه‌های در حال رشد دارای دیواره نازک و محتویات گرانولار و انشعاب دو شاخه قبل از دیواره عرضی هستند. ریشه-های جانبی ثانویه معمولاً باریکتر از ریشه‌های اصلی است. اسکروت‌ها از تجمع فشرده هیف رویشی تشکیل می‌شوند که به عوامل تخریب بیولوژیکی مانند سایر قارچ‌های ساپروفیت و باکتری‌ها بسیار مقاوم است (۷۶، ۱۳). تشکیل اسکروت در

مراحل نخستین از مجموعه‌ای از شاخه‌های جانبی از رشته‌های ریشه‌ای آغاز می‌شود. دیوار سلولی اسکروت از ۶۴٪ آلفا گلوکان^۱ و ۱۵٪ بتا گلوکان و کیتین^۲ تشکیل شده است (۳۷). مطالعه مقاطع بسیار نازک اسکروت بالغ با میکروسکوپ الکترونی، وجود یک لایه خارجی متراکم و ملانیزه به قطر ۰/۲ تا ۰/۳ میکرومتر و یک لایه داخلی شفاف به قطر ۲ تا ۳ میکرومتر را نشان می‌دهد (۵۰). جوانه‌زنی اسکروت‌ها با تولید ریشه به صورت مستقیم انجام می‌شود. قطر پرگنه پس از ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه ۹ سانتی‌متر و تراکم اسکروت‌ها در مرکز پرگنه بیشتر از حاشیه است (۱) (شکل ۳).



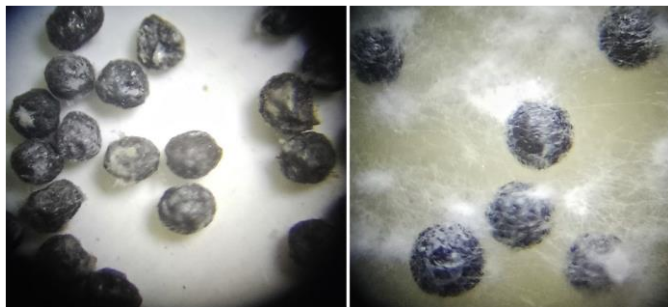
شکل ۳- پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA (عکس از علیرضا جوادی)

1- α -glucan

2- β -glucan-chitin complex

جداسازی، شناسایی و ردیابی عامل بیماری

جداسازی از اندام‌های آلوده گیاهی شامل غده یا پیاز آلوده و طوقه پوسیده، با برداشتن قطعاتی از اندام آلوده در مرز بین قسمت سالم و بیمار و ضد عفونی آن‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد انجام می‌شود. قطعات روی محیط کشت PDA^۱، دارای آنتی بیوتیک استرپتومایسین با غلظت ۰/۰۲ گرم در لیتر کشت داده شده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری می‌شود. پس از هفت تا ۱۰ روز، پرگنه سفید تا کرم رنگ قارچ به صورت چسبیده به سطح، بدون لبه یا برجستگی، ظاهر می‌شود. اسکروت‌های قارچ در محیط کشت به شکل دانه‌های گرد سیاه رنگ اغلب به قطر ۵/ تا ۱ میلی متر تشکیل می‌شوند (شکل ۴).



شکل ۴- ساختارهای اسکروت در محیط کشت PDA (راست) و در بقایای گیاهی (چپ) (عکس از علیرضا جوادی)

1-Potato Dextrose Agar

ردیابی مولکولی

روش‌های مبتنی بر واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرآز^۱ جزو روش‌های دقیق با تکرار پذیری بالا به شمار می‌آیند. از جمله این روش‌ها می‌توان به PCR براساس دو آغازگر اختصاصی و multiplex-PCR با چند آغازگر اختصاصی اشاره کرد این روش‌ها بسیار اختصاصی و دقیق و با هزینه نسبتاً کم قابل انجام است. ژن مناسب برای بارکد این گونه ناحیه ژنی ITS است (۸۴). جهت ردیابی مولکولی این گونه از مزارع مشکوک به بیماری تعدادی بوته را، از خاک جدا کرده و به آزمایشگاه منتقل و با آب مقطر استریل شستشو داده می‌شوند. بهترین قسمت گیاه برای استخراج DNA و ردیابی مولکولی بیمارگر، لایه‌های بیرونی پیاز و دیسک ریشه است (۳۹). بدین منظور پوسته‌های خشک پیاز حذف و از لایه‌های بیرونی چند لایه با اسکالپل ضد عفونی شده بریده و جدا می‌گردند. همچنین از قسمت تحتانی پیاز که ریشه‌ها از آنجا بیرون می‌آیند (دیسک ریشه) نیز قطعاتی با اسکالپل استریل جدا می‌شوند. DNA کل (گیاه + قارچ) بر اساس روش سمبروک و همکاران (۷۰) استخراج شده و با اسپکتروفتومتر مقدار و کیفیت DNA ارزیابی و سنجش می‌شود. آنالیز توالی‌های ITS1 و ITS2 در میان گونه‌های این جنس و *S. cepivorum* نشان داده که مقدار تشابه ژنی بین توالی این دو ناحیه صد در صد نیست (تا ۹۸ درصد) ولی با این حال هنوز هم با استفاده از آغازگرهای اختصاصی می‌توان گونه *S. cepivorum* را بطور دقیق شناسایی نمود. مشخصات آغازگرهای اختصاصی برای ردیابی *S. cepivorum* در جدول ۱ آورده شده است.

1- Polymerase Chain Reaction, PCR

جدول ۱- فهرست و مشخصات آغازگرهای مورد استفاده در آزمون PCR برای ردیابی

مولکولی *Sclerotium cepivorum*

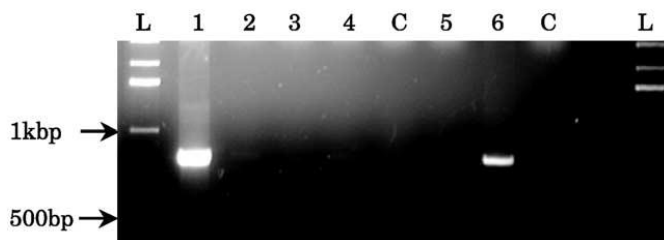
منبع	Tm (°C)	توالی 5' → 3'	آغازگر
۳۹	۵۶	GTCCACAGATTAAGTGGTATG	SCAF
۳۹	۵۴	AGCTGCCTTTGGGGCCTC	ITS1S CF
۳۹	۵۴	TTAGGTTTTGACAGAAGCACAT	ITS2S CR
۵۱	۵۸	GCTGCCTTTGGGGCCTCGT	ITSK F
۵۱	۵۸	AGGGGCGCAATGTGCGTTCA	ITSK R
۵۱	۶۸	GGGGCCTCGTATGCTCGCCAGA	ITSLF
۵۱	۶۸	CCCGGAATACCAAGGGGCGCAAT	ITSL R

جدول ۲- شرایط آزمون PCR برای ردیابی مولکولی *S. cepivorum*

آغازگر	شروع	واسرشتگی	اتصال آغازگر	طولیل شدن رشته	تعداد چرخه	پایان
SCAF/ITS2SCR	۹۴C (۴ دقیقه)	۹۴ C (۱ دقیقه)	۶۰ C (۹۰ ثانیه)	۷۴ C (۶۰ ثانیه)	۳۳	۷۲ C (۱ دقیقه)
ITSKE/ITSKR	۹۴C (۴ دقیقه)	۹۴ C (۱ دقیقه)	۵۸ C (۹۰ ثانیه)	۷۲ C (۳۰ ثانیه)	۳۰	۷۲C (۴ دقیقه)
ITSLE/ITSLR	۹۴ C (۴ دقیقه)	۹۴ C (۱ دقیقه)	۶۸ C (۹۰ ثانیه)	۷۲C (۳۰ ثانیه)	۳۰	۷۲C (۴ دقیقه)

آنالیز محصول PCR

محصول PCR پس از تکثیر با آغازگرهای ذکر شده، روی ژل آگارز ۱/۵ درصد به کمک الکتروفورز افقی تفکیک شده و با کمک UV transilluminator و عکس برداری دیجیتال مورد مشاهده و بررسی قرار می گیرد (شکل های ۵ تا ۱۰).

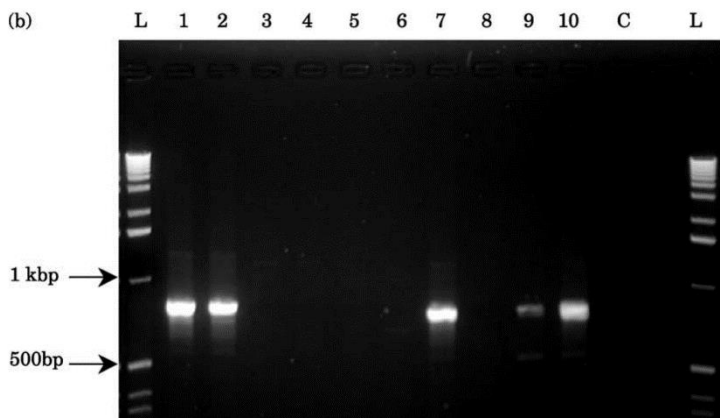


شکل ۵- نتایج بدست آمده از آزمون PCR با استفاده از آغازگر آغازگر SCAF و ITS2 روی ژل آگارز. ستون L نشانگر وزن مولکولی، ستون ۱: *S. cepivorum* جدایه A، ستون ۲: *S. cepivorum* جدایه IMI079155، ستون ۳: گونه *B. cinerea*، ستون ۴: گونه *M.*

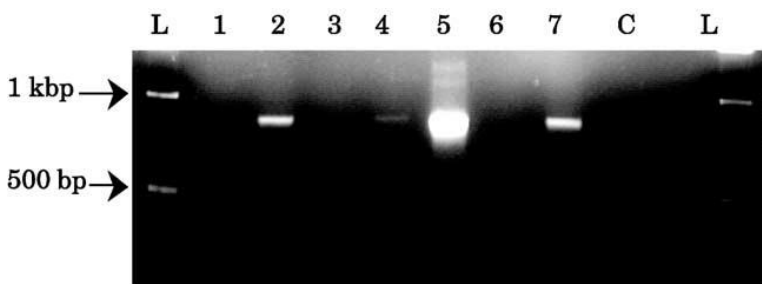
fructigena، ستون ۵: پیاز سالم، ستون ۶: پیاز آلوده به *S. cepivorum* جدایه A، ستون C: شاهد بدون DNA



شکل ۶- الگوی الکتروفورزی محصول PCR با آغازگرهای SCAF و ITS2 روی ژل آغاز حاصل از آزمون DNA استخراج شده از قسمت‌های مختلف گیاهچه‌های پیاز آلوده به *S. cepivorum* برای ارزیابی توزیع عمودی آلودگی. ستون L: نشانگر وزن مولکولی، ستون ۱: ریشه‌ها، ستون ۲: دیسک ریشه، ستون ۳: پایین پیاز، ستون ۴: بخش میانی پیاز، ستون ۵: بخش بالایی پیاز، ستون ۶: بخش پایینی ساقه، ستون ۷: ساقه‌های میانی، ستون ۸: ساقه‌های بالایی، ستون ۹: برگ‌های پایینی، ستون ۱۰: بخش میانی برگ‌های پایینی، ستون ۱۱: برگ، ستون ۱۲: DNA گرفته شده از قارچ *S. cepivorum* جدایه A (دمای اتصال آغازگر: ۶۰ درجه سلسیوس با انجام ۳۳ چرخه PCR).

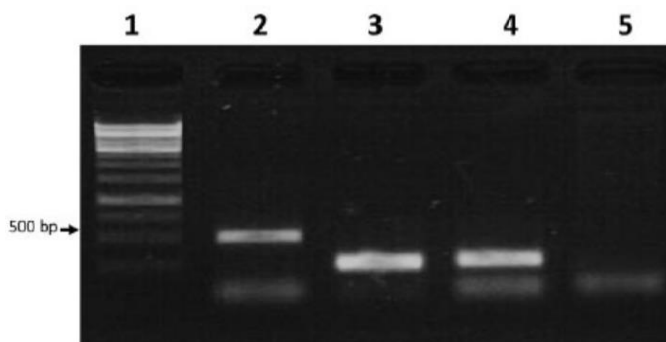


شکل ۷- نتایج آزمون PCR با استفاده از DNA استخراج شده از اندام‌های مختلف (از جمله فلس‌ها) گیاه پیاز آلوده به *S. cepivorum* با بهره‌گیری از آغازگرهای SCAF و ITS2 روی ژل آگارز به منظور ارزیابی توزیع افقی آلودگی در فلس‌های پیاز از لایه خارجی به داخل از فلس اول کاغذی و نخستین فلس گوشتی تا داخلی‌ترین فلس‌ها (فلس ۸ و بخش میانی پیاز). ستون L نشانگر وزن مولکولی، ستون ۱: فلس رویی (فلس ۱)، ستون ۲: فلس دوم، ستون ۳: فلس سوم، ستون ۴: فلس‌های چهارم و پنجم، ستون ۵: فلس‌های ششم و هفتم، ستون ۶: فلس هشتم و قسمت میانی پیاز، ستون: دیسک ریشه، ستون ۸: ریشه، ستون ۹: مخلوط یک به یک DNA به دست آمده از قارچ *S. cepivorum* و فلس پیاز، ستون ۱۰: DNA گرفته شده از قارچ *S. cepivorum* جدایه A، ستون C: شاهد بدون DNA، (دمای اتصال آغازگر: ۶۰ درجه سلسیوس با ۳۳ چرخه).

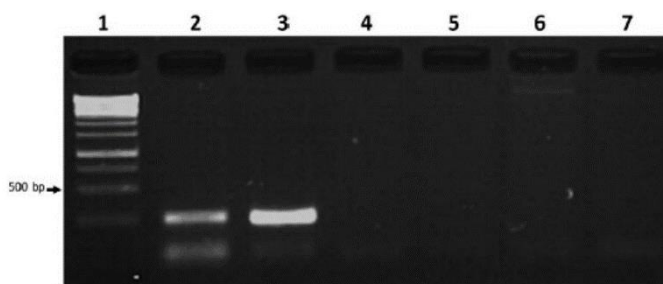


شکل ۸- نتایج آزمون PCR با استفاده از DNA حاصل از نمونه‌های گیاهی سالم و دارای علائم پوسیدگی سفید پیاز با کمک آغازگرهای SCAF و ITS2 روی ژل آگارز. ستون L: نشانگر وزن مولکولی، ستون ۱: پیاز سالم واریته Sturon، ستون ۲: پیاز دارای علائم پوسیدگی سفید واریته Sturon، ستون ۳: پیاز سالم واریته Turbo، ستون ۴: پیاز دارای علائم پوسیدگی سفید واریته Turbo، ستون ۵: DNA قارچی *S. cepivorum* جدایه A، ستون ۶: DNA قارچی *S. cepivorum* جدایه IMI079155، ستون ۷: مخلوط یک به یک DNA پیاز واریته Rijnsberger و قارچ *S. cepivorum* جدایه A (برای بررسی اثر عوامل بازدارنده گیاهی در موفقیت آزمون پی سی آر برای ردیابی قارچ بیمارگر) و ستون C: شاهد بدون DNA.

افزون بر آغازگرهای SCAF/ ITS2SCR، از آغازگرهای اختصاصی ITSKF/ITSKR و ITSFL/ITSLR نیز برای ردیابی مولکولی قارچ بیمارگر *S. cepivorum* استفاده شده است (شکل‌های ۹ و ۱۰). در مجموع برای ردیابی این بیمارگر، آزمون PCR با آغازگرهای ITSFL/ITSLR به دلیل اختصاصیت بالاتر و مدت زمان کوتاه‌تر توصیه می‌شود.



شکل ۹- نتایج آزمون PCR با استفاده از DNA حاصل از نمونه گیاه سیر سالم و دارای علائم پوسیدگی سفید با کمک آغازگرهای مختلف روی ژل آگارز. ستون: نشانگر وزن مولکولی ۱ kb، ستون ۲: ITS1SCF/ITS2SCR، ستون ۳: ITS1SF/ITS2SR، ستون ۴: ITS1SF/ITS2SR و ستون ۵: محصول DNA گرفته شده از سیر غیر آلوده با آغازگرهای ITS1SF/ITS2SR



شکل ۱۰- نتایج تکثیر ناحیه ITS در آزمون PCR با آغازگرهای ITS1SF/ITS2SR در DNA استخراج شده از گونه‌های دیگر قارچی برای ارزیابی اختصاصیت این آغازگرها در ردیابی قارچ *Sclerotium cepivorum*. ستون ۱: نشانگر وزن مولکولی ۱ kb، ستون ۲: ITS1SF/ITS2SR

DNA قارچی از سویه *Sclerotium cepivorum* C2، ستون ۳: DNA قارچی از سویه *Sclerotinia* K1، ستون ۴: DNA قارچی از گونه *sclerotiorum* و ستون ۵: DNA قارچی از گونه *Fusarium oxysporum*، ستون ۶: DNA قارچی از گونه *Phytophthora capsici*، ستون ۷: DNA گرفته شده از سیر غیر آلوده

مدیریت بیماری

روش های سنتی کنترل پوسیدگی سفید پیاز اغلب غیر اقتصادی یا غیر موثر هستند (۶۶). تنها روش موثر در کنترل بیماری پس از وقوع استفاده از مواد تدخینی مانند متیل بروماید است که با وجود از بین بردن ۹۹٪ اسکروت ها در خاک، سبب انهدام کامل بیمارگر نمی شود. از آن جا که وجود حتی تعداد بسیار کمی از اسکروت در خاک می تواند به وقوع بیماری و بروز خسارت اقتصادی به محصول شود، پیشگیری از بیماری و اتخاذ روش های تلفیقی در کنترل از اهمیت بسیاری برخوردار است. استفاده از روش های تدخینی گرچه در برخی مواقع اجتناب ناپذیر است اما ممکن است از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نباشد. گرچه خسارت بالا به محصول، اتخاذ تناوب را اجتناب ناپذیر می نماید. اما به دلیل ماندگاری بسیار طولانی اسکروت ها، تناوب به تنهایی برای کنترل بیماری کافی نیست و تنها به کاهش زادمایه اولیه کمک می نماید. قارچ خاکزاد *S. cepivorum* در پیاز به دلیل کشت بذرقیقی، بذرزاد نیست اما آلودگی حبه های سیر بذری به اسکروت در انتقال بیماری به نسل بعد نقش دارد. کاهش آبیاری در مزرعه آلوده، رعایت بهداشت مزرعه و معدوم کردن بقایای آلوده می تواند به کاهش آلودگی در مزرعه کمک کند. تلاش های بهتزادی برای انتخاب یا تولید ارقام مقاوم به بیمای پوسیدگی سفید پیاز یکی دیگر

از روش‌های امیدبخش در مدیریت این بیماری است اما این روش‌ها بسیار زمانبر و رسیدن به نتیجه پایدار در مزرعه اغلب دشوار است. مدیریت شیمیایی و استفاده از قارچ‌کش‌های خاک کاربرد^۱ می‌تواند در مراحل اولیه آلودگی مزرعه به کاهش زادمایه اولیه و کاهش خسارت کمک کند. در مجموع برای مدیریت تلفیقی بیماری پوسیدگی سفید پیاز از راهبردها و روش‌های مختلفی استفاده می‌شود که در ادامه به اجمال به آن پرداخته می‌گردد.

مواد شیمیایی خاک کاربرد

ترشحات ریشه گیاهان جنس *Allium* دارای آلکیل و آلکنیل-ال سیستین سولفوکسیدهایی است که پس از فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک به تیول‌ها و سولفیدهای فرار تبدیل شده و جوانه‌زنی اسکروت‌های *S. cepivorum* را تحریک می‌کند (۴۲، ۱۰). در نبود میزبان، میسلیم‌هایی که از جوانه‌زنی اسکروت تشکیل شده‌اند، از چند روز تا چند هفته بسته به دمای خاک ماندگاری داشته و پس از اتمام مواد مغذی از بین می‌روند. کاربرد ترکیباتی مانند دی‌آلیل سولفیدها^۲، ترکیبات گرفته‌شده از حبه‌های سیر و نوعی ترکیب تیول دی‌آلیل دی‌سولفید^۳ فرار که از تقطیر ترکیبات نفتی به دست می‌آید، به عنوان تحریک کننده جوانه‌زنی اسکروت‌های *S. cepivorum* پیشنهاد می‌شوند (۲۱). در پژوهشی که در شرایط گلخانه و با آلوده‌سازی مصنوعی خاک به اسکروت‌های قارچ بیمارگر انجام شد، افزودن عصاره سیر و پیاز به خاک پیش از کشت سبب تحریک جوانه‌زنی اسکروت‌های بیمارگر شده (۹۰-۹۹ درصد) و به میزان ۷۰ درصد شدت بیماری را

1- Soil-applied

2- diallyl disulfide, DADS

3- thiol diallyl disulfide

کاهش داد. هر چند کاربرد این مواد در مزارع آلوده نتوانست به میزان معنی داری از بروز بیماری پوسیدگی ریشه در فصل بعد جلوگیری کند، اما کاربرد مواد آلی سولفیددار در کاهش درصد آلودگی خاک به اسکروت‌های این بیمارگر به دلیل اهمیت آلودگی خاک در انتقال بیماری به مزارع مجاور موثر و قابل توصیه است (۲۱). در تحقیقی دیگر کاربرد مکرر روغن پیاز، روغن سیر و بقایای سیر و پیاز به عنوان ترکیبات تحریک کننده جوانه‌زنی اسکروت‌های قارچ بیمارگر در خاک مزرعه آلوده به مدت شش ماه پیش از کشت توانست به میزان ۷۰٪ جمعیت اسکروت‌های قارچ را در خاک کاسته و در کشت بعدی بروز علائم بیماری را کاهش دهد. تیمار خاک آلوده به این مواد همزمان کاهش زادمایه بیمارگر سبب افزایش محصول پیاز نیز گردید. با وجود اثر بخشی مواد تحریک کننده جوانه‌زنی اسکروت‌های *S. cepivorum* در کاهش جمعیت اسکروت‌های زنده، در شرایطی که آلودگی خاک بالا باشد به طور مثال ۵۹۴/۷ اسکروت در هر کیلوگرم خاک، بیماری یک سال پس از تیمار خاک با این مواد، رخ داده و سبب کاهش محصول می‌شود (۲۹). استفاده از قارچ‌کش‌های تدخینی یکی از راهکارهای مدیریت بیماری در خاک‌های آلوده است که اگر بهنگام و بیش از یک نوبت به کار گرفته شود، می‌تواند در کاهش آلودگی خاک موثر باشد (۲۱).

مواد شیمیایی برگ کاربرد^۱

برخی گزارش‌ها از تاثیر قارچ‌کش‌های تبوکونازول^۲ به صورت برگ کاربرد در مدیریت بیماری پوسیدگی سفید پیاز وجود دارد (۲۲، ۶۴، ۵۶). گرچه برخی از گزارشات با مشاهده تاثیر کنترلی این قارچ‌کش‌ها در مزارع تجاری تایید شده است، اما داده‌های به دست آمده در این خصوص از قوت لازم برخوردار نیست و نتایج آزمایشاتی که در دنیا انجام شده تاثیر این قارچ‌کش‌ها را به صورت برگ کاربرد در مدیریت با بیماری تایید نمی‌کند (۴۶). این تفاوت در نتایج ممکن است در نتیجه عدم انتقال این ترکیبات شیمیایی از برگ‌ها به ریشه باشد. بهترین نتیجه در کنترل بیماری به کمک قارچ‌کش‌های برگ کاربرد، از ترکیب تیمار بذر با پروسیمیدون^۳ (یکی از قارچ‌کش‌های دی‌کربوکسیمید^۴)، به همراه محلول پاشی برگ‌ها با پروسیمیدون، تبوکونازول یا تریادیمنول^۵ به دست آمده است. لازم به ذکر است که تبوکونازول دارای اثر کشندگی بر بذر و گیاهچه بوده و برای تیمار بذری مناسب نیست (۷۱). البته هیچ یک از قارچ‌کش‌های نام برده شده برای کنترل این بیماری در کشور ثبت نشده است. قارچ‌کش‌های دی‌کربوکسیمید از قارچ‌کش‌های حفاظتی به شمار می‌روند که تا حدودی اثر درمانی و سیستمیک دارند (۴۱). هرچند در مقایسه با دیگر قارچ‌کش‌ها دامنه اثر آن‌ها روی جنس‌های مختلف قارچی محدود است اما روی *Sclerotium* spp. موثر است. با وجود معرفی قارچ‌کش‌های دی‌کربوکسیمید از دهه ۱۹۷۰، مکانیسم اثر آن‌ها هنوز به درستی روشن نیست.

1- leaf-applied chemicals

2-tebuconazole

3- procymidone

4-dicarboximide fungicide

5-triadimenol

فرض بر این است که آن‌ها در مسیرهای انتقال پیام مانند آبشارهای هیستیدین کیناز^۱ و MAP کیناز^۲ اختلال ایجاد می‌کنند (۸۵، ۲۴). شواهدی نیز مبنی بر دخالت سیستم تنظیم فشار اسمزی در بروز مقاومت در *Cochliobolus heterostrophus* به این قارچ‌کش‌ها وجود دارد (۸۶).

کنترل بیولوژیکی

ماندگاری طولانی، مدفون شدن و غیر قابل دسترس بودن اسکروت‌های قارچ بیمارگر سبب می‌شود تا اثر قارچ‌کش‌ها، ترکیبات ضدعفونی کننده خاک و اجرای تناوب با محصولات غیر میزبان، بر مدیریت بیماری با محدودیت مواجه شود. نبود کولتیوارهای مقاوم از میزبان و لزوم تبعیت از برنامه‌های کاهش مصرف سموم، بهره‌گیری از روش‌های کنترلی جایگزین و مناسب را اجتناب ناپذیر می‌سازد. اگرچه افزودن زادمایه قارچی عوامل بیوکنترلی مانند *Trichoderma harzianum* و *T. viride* به خاک سترون شده به شکل معنی‌داری رشد و وزن تر بوته پیاز را افزایش می‌دهد (۶۵)، اما میزان اثر این عوامل در کنترل بیماری پوسیدگی سفید سیر و پیاز به شرایط محیطی، نوع خاک، رقم میزبان و جدایه بیمارگر بستگی دارد. بهره‌گیری از عوامل بیوکنترل قارچی در کنترل بیماری پوسیدگی سفید پیاز سابقه- ای نسبتاً طولانی دارد (۵۷، ۵۹، ۴۶، ۷). در پژوهشی که برای ارزیابی اثر افزودن عصاره کشت مایع قارچ‌های بیوکنترل در کاهش جوانه‌زنی اسکروت انجام شده، افزودن عصاره *Penicillium simplicissimum* GP17-2 به محیط کشت اسکروت به میزان ۷۰/۸۵٪ و افزودن عصاره کشت مایع *asperellum* SKT-1

1- histidine kinase cascade

2- MAP kinase cascade

Trichoderma به میزان ۶۶/۳۸٪، جوانه‌زنی اسکروت‌های قارچ *S. cepivorum* را کاهش داد. افزون بر این کاربرد سویه‌های GP17-2 و SKT-1 توانست شدت بیماری را به ترتیب به میزان ۷۹٪ و ۷۴٪ در گلخانه کاهش دهد. اثر کاهشی این عوامل بیوکنترل بر شدت بیماری در مزرعه نیز قابل توجه و به‌ترتیب به میزان ۶۲٪ و ۵۶٪ برای GP17-2 و SKT-1 برآورد گردید. از سوی دیگر، سطوح پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز در گیاهان پیاز تیمار شده نسبت به گیاهان تیمار نشده، ۷ روز پس از آلودگی افزایش یافت. همچنین، بیان زود هنگام و بالای ژن‌های دفاعی، PR1 و PR2، در گیاهان تیمار شده با این سویه‌های بیوکنترل نیز گزارش شده‌است (۳۰). کاربرد سویه محلی *Trichoderma asperellum* BCC1 در شرایط گلخانه توانست به میزان ۷۴٪ مرگ گیاهان میزبان را در مقایسه با کنترل کاهش دهد (۶۹). اگرچه کاربرد این سویه‌های بیوکنترل در مزرعه تنها به میزان ۳/۴۱٪ تا ۳/۶۱٪ در مقایسه با تیمار قارچ کش بیماری را کاهش داد، اما به میزان معنی‌داری (۲۰/۴٪) محصول پیاز را در شرایط آب و هوایی گرمسیری کاستاریکا افزایش داد. افزون بر این پتانسیل *T. asperellum* BCC1 برای القای دفاع سیستمیک در میزبان در برابر آلودگی به *S. cepivorum* با افزایش زودهنگام در بیان ژن‌های دفاعی *AcPAL1*، *AcPR1* در دوره زمانی ۱ تا ۷ روز پس از آلودگی و فعال شدن مسیرهای وابسته به اسید سالیسیلیک با افزایش دیر هنگام در بیان ژن *AcEIN3*، ۲۱ روز پس از آلودگی و نیز فعال شدن مسیرهای وابسته به اتیلن، به کمک آزمون real-PCR time تایید شد (۶۹).

بهنژادی پیاز برای مقاومت به *S. cepivorum*

برای بهبود عملکرد، کیفیت و مقاومت پیاز در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی، از روش‌های مختلف بهنژادی استفاده شده است. با وجود این، چرخه زندگی دوساله، طبیعت دگر گرده افشان^۱ پیاز و تلفات بالای نتاج اینبریدینگ^۲ کار بهنژادی و توسعه و استقرار نتاج بهبود یافته را در این محصول با چالش‌های زیادی رو به رو می‌سازد (۵۵). غربال ارقام و جستجو برای شناسایی منابع مقاومت به *S. cepivorum* از نخستین تلاش‌هایی است در این زمینه انجام شده است (۴۳، ۸۰). اگرچه تاکنون چند صد لاین پیاز مورد بررسی و آزمایش قرار گرفته اما هنوز در مورد وجود مقاومت معنی‌دار برای این بیمارگر در *A. cepa* اختلاف نظر وجود دارد و برخی از گزارش‌ها نشان از مقاومت کم یا فقدان مقاومت داشته و به نظر می‌رسد بیشتر ارقام *A. cepa* بسیار به بیماری حساس هستند (۶۸، ۷۱). تاکنون هیچ ژنوتیپی با سطح بالایی از مقاومت در این گونه یافت نشده است (۸). در کنار چشم انداز کم و بیش نا امیدکننده برای یافتن مقاومت *S. cepivorum* در *A. cepa*، تلاش‌های زیادی نیز برای یافتن مقاومت در سایر گونه‌های جنس *Allium* انجام شده است. برای نمونه مقاومت *A. porrum* به بیماری در مقایسه با *A. cepa* بیشتر است. در برخی از گونه‌ها مانند *A. sphaerocephalon* و *A. stipitatum* علائم بیماری ظاهر نمی‌شود و برخی گونه‌ها مانند *A. giganteum* و *A. christophil* علائم شدیدتری نسبت به *A. cepa* نشان می‌دهند (۱۲، ۳۲). از نظر تئوری حجم کم ترشحات ریشه در یک رقم پیاز یا دیگر گونه‌های آلیوم و ظرفیت پایین تحریکی آن در جوانه‌زنی اسکروت‌های قارچ بیمارگر، ممکن است به بروز

1- cross-pollinated nature

2-high inbreeding depression

مقاومت حاصل از عدم تحریک جوانه‌زنی^۱ اسکلروت‌ها منجر شود که به کاهش محل‌های آلودگی در ریشه و جلوگیری از بروز آلودگی کمک می‌کند. با وجود این مطالعات نشان می‌دهد که برخی از گونه‌ها با وجود کم بودن اثر تحریکی ترشحات ریشه در آن‌ها بر جوانه‌زنی اسکلروت، نسبت به بیماری بسیار حساس هستند (۳۱، ۱۱). افزون بر این القای واکنش‌های مقاومت سیستمیک در میزبان پس از بروز آلودگی، پیشرفت آلودگی را در گیاه محدود می‌کند (۵۳). ژرم پلاسماهای تراریخته ژنتیکی مقاوم به بیماری، به عنوان بخشی از یک استراتژی مدیریت تلفیقی برای مدیریت بیماری به شمار می‌رود. ژن اکسالات اکسیداز^۲ که به هنگام نفوذ ریشه *S. cepivorum* بیان می‌شود و ژن ماگائین سینتتیک^۳ که بیان پتید ضد میکروبی با توانایی تخریب ریشه قارچ بیمارگر را در جریان آلودگی کد می‌کند، دو ژن از ژن‌هایی هستند که برای بهبود مقاومت به پوسیدگی سفید در پیاز مورد بررسی و آزمون قرار گرفته‌اند. با وجود پتانسیل این گیاهان تراریخته برای بهبود مقاومت به بیماری، به ویژه با در نظر گرفتن مسائلی مانند خاموشی تراژن از یک سو و از سویی دیگر مخالفت افکار عمومی با محصولات تراریخته راهی بسیار طولانی تا موفقیت این ارقام در مزرعه وجود دارد (۲۵، ۸۱). به کمک فناوری‌های جدید، به ویژه توالی‌یابی نسل بعدی^۴، توسعه نشانگرهای مولکولی و بهره‌گیری از آن‌ها در آنالیز ژرم پلاسما، نقشه‌یابی ژنوم پیاز با سرعت بیشتری رو به پیشرفت است. امید است تا در سایه پیشرفت‌های اخیر در ژنومیک پیاز، ژنتیک مولکولی و ادغام بهژن‌ادی کلاسیک و مولکولی، برنامه‌های بهژن‌ادی کمی و کیفی پیاز سرعت یابد.

1-non-stimulatory resistance

2-oxalate oxidase, OXO

3-synthetic magainin

1-next-generation sequencing

فهرست منابع

- ۱-ارجمندیان امیر، ۱۳۹۴. بررسی وضعیت آلودگی سیراستان همدان به بیماری قارچی پوسیدگی سفید سیر و مدیریت کنترل آن. اولین همایش گیاهان دارویی و داروهای گیاهی، دانشگاه شهید بهشتی. ۱۰ صفحه.
- ۲- آمار نامه وزارت جهاد کشاورزی ۱۳۹۹. آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۹۹-۱۳۹۸. جلد اول: محصولات زراعی. معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات وزارت جهاد کشاورزی. تهران. ۸۹ صفحه.
- 3-Amin, M., Tadele, S., and Selvaraj, T. (2014). White rot (*Sclerotium cepivorum* Berk)-an aggressive pest of onion and garlic in Ethiopia: An overview. *Journal of Agricultural Biotechnology and Sustainable Development*, 6(1), 6-15.
- 4-Lourenço Jr, V., Vieira, B. S., Lopes, E. A., and Villalta, O. N. (2018). Etiology, epidemiology, and management of white rot on onion and garlic: current knowledge and future directions for Brazil. *Cientifica*, 46(3), 241-256.
- 5-Hunger, S. A., McLean, K. L., Eady, C. C., and Stewart, A. (2002). Seedling infection assay for resistance to *Sclerotium cepivorum* in *Allium* species. *New Zealand Plant Protection*, 55, 193-196.
- 6-Crowe, F. J., Hall, D. H., Greathead, A. S., and Baghott, K. G. (1980). Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology*, 70(1), 64-69.
- 7-Kohn, L. M., and Grenville, D. J. (1989). Anatomy and histochemistry of stromatal anamorphs in the Sclerotiniaceae. *Canadian journal of Botany*, 67(2), 371-393.
- 8-Khosa, J. S., McCallum, J., Dhatt, A. S., and Macknight, R. C. (2016). Enhancing onion breeding using molecular tools. *Plant Breeding*, 135(1), 9-20.
- 9-Clements, F. E., and Shear, C. L. (1973). *The genera of fungi*. 5th printing. New York: Hafner.
- 10-Coley-Smith, J. R. (1960). Studies of the biology of *Sclerotium cepivorum* Berk. IV. Germination of sclerotia. *Annals of Applied Biology*, 48(1), 8-18.

- 11-Coley-Smith, J. R. (1985). Methods for the production and use of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in field germination studies. *Plant Pathology*, 34(3), 380-384.
- 12-Coley-Smith, J. R. (1986). Interactions between *Sclerotium cepivorum* and cultivars of onion, leek, garlic and *Allium fistulosum*. *Plant Pathology*, 35(3), 362-369.
- 13-Coley-Smith, J. R., and Cooke, R. C. (1971). Survival and germination of fungal sclerotia. *Annual review of phytopathology*, 9(1), 65-92.
- 14-Coley-Smith, J. R., and ESLFR, G. (1983). Infection of cultivars of onion, leek, garlic and *Allium fistulosum* by *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathology*, 32(4), 373-376.
- 15-Couch, B. C. (1999). Population biology of *Sclerotium cepivorum* (Doctoral dissertation).100pp
- 16-Couch, B. C., and Kohn, L. M. (2000). Clonal spread of *Sclerotium cepivorum* in onion production with evidence of past recombination events. *Phytopathology*, 90(5), 514-521.
- 17-Crowe, F. J., and Hall, D. H. (1980). Soil temperature and moisture effects on sclerotium germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology*, 70(1), 74-78.
- 18-Crowe, F. J., Debons, J., Darnell, T., Thornton, M., McGrath, D., Koepsell, P., . and Redondo, E. (1994). Control of *Allium* white rot with DADS and related products. In *Proceedings of the 5th International Workshop on Allium White Rot* (pp. 7-22).
- 19-Carling D.E. and Sumner D.R. (2001). Rhizoctonia. In: Singleton L.L., Mihail JD, Rush CM, eds. *Methods for research on Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi* (No. 632.4072 M4).
- 20-Davis, J. M. L. (1990). Onion white rots control sterilant or stimulant, Brighton crop protection conference, pest and disease, 1, 103.
- 21-Davis, R. M., Hao, J. J., Romberg, M. K., Nunez, J. J., and Smith, R. F. (2007). Efficacy of germination stimulants of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* for management of white rot of garlic. *Plant Disease*, 91(2), 204-208.
- 22-Dennis, J. (1997). Progress towards an integrated control strategy for onion white root rot disease, including the use of artificial

- germination stimulants. In II International Symposium on Edible *Alliaceae* .555 (pp. 117-121).
- 23-Donk, M. A. (1962). The Generic Names Proposed for Hymenomycetes–XII: Deuteromycetes. *Taxon*, 11(3), 75-104.
 - 24-Dry, I. B., Yuan, K. H., and Hutton, D. G. (2004). Dicarboximide resistance in field isolates of *Alternaria alternata* is mediated by a mutation in a two-component histidine kinase gene. *Fungal Genetics and Biology*, 41(1), 102-108.
 - 25-Eady, C. C. (2002). Genetic transformation of onions. *Allium Crop Science: Recent Advances*. CAB International, Wallingford, UK, 119-144.
 - 26-Eady, C. C., Weld, R. J., and Lister, C. E. (2000). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.). *Plant cell reports*, 19(4), 376-381.
 - 27-Earnshaw, D. M., McDonald, M. R., and Boland, G. J. (2000). Interactions among isolates and mycelial compatibility groups of *Sclerotium cepivorum* and cultivars of onion (*Allium cepa*). *Canadian Journal of Plant Pathology*, 22(4), 387-391.
 - 28-Earnshaw, D., and Boland, G. J. (1997). Mycelial compatibility groups in *Sclerotium cepivorum*. *Plant pathology*, 46(2), 229-238.
 - 29-Elshahawy, I. E., Morsy, A. A., Abd-El-Kareem, F., and Saied, N. M. (2019). Reduction of *Stromatinia cepivora* inocula and control of white rot disease in onion and garlic crops by repeated soil applications with sclerotial germination stimulants. *Heliyon*, 5(1), e01168.
 - 30-Elsharkawy, M. M., and El-Khateeb, N. M. M. (2019). Antifungal activity and resistance induction against *Sclerotium cepivorum* by plant growth-promoting fungi in onion plants. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 29(1), 1-9.
 - 31-Esler, G., and Coley-Smith, J. R. (1983). Flavor and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. *Plant pathology*, 32(1), 13-22.
 - 32-Esler, G., and Coley-Smith, J. R. (1984). Resistance to *Sclerotium cepivorum* in *Allium* and other genera. *Plant pathology*, 33(2), 199-204.

- 33-Fujii, H., and Uhm, J. Y. (1988). *Sclerotinia trifoliorum*, cause of rots of *Trifolium* spp. In *Advances in Plant Pathology* (Vol. 6, pp. 233-240). Academic Press.
- 34-Stewart, A., and Slade, E. A. (1995). Use of demethylation inhibiting fungicides (DMIs) for the control of onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) in New Zealand. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 23(2), 121-125.
- 35-Geiser, D. M., Arnold, M. L., and Timberlake, W. E. (1994). Sexual origins of British *Aspergillus nidulans* isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(6), 2349-2352.
- 36-Gindro, C., and L'Hoste, G. (1997). Germination and infectious potential of microconidia of *Sclerotium cepivorum*. *Journal of Phytopathology*, 145(4), 171-175.
- 37-Gomez-Miranda, B., and Leal, J. A. (1981). Extracellular and cell wall polysaccharides of *Aspergillus alliaceus*. *Transactions of the British Mycological Society*, 76(2), 249-253.
- 38-Gonzalez, D., Carling, D. E., Kuninaga, S., Vilgalys, R., and Cubeta, M. A. (2001). Ribosomal DNA systematics of *Ceratobasidium* and *Thanatephorus* with *Rhizoctonia* anamorphs. *Mycologia*, 93(6), 1138-1150.
- 39-Haq, M. A., Collin, H. A., Tomsett, A. B., and Jones, M. G. (2003). Detection of *Sclerotium cepivorum* within onion plants using PCR primers. *Physiological and molecular plant pathology*, 62(3), 185-189.
- 40-Harrison, J. G., and Hargreaves, A. J. (1977). Production and germination in vitro of *Botrytis fabae* microconidia. *Transactions of the British Mycological Society*, 69(2), 332-335.
- 41-Hisada, Y., Kato, T., and Kawase, Y. (1977). Systemic movement in cucumber plants and control of cucumber gray mould by a new fungicide, S-7131. *Netherlands journal of plant pathology*, 83(1), 71-78.
- 42-Hovius, M. H. Y., and McDonald, M. R. (2002). Management of *Allium* white rot (*Sclerotium cepivorum*) in onions on organic soil with soil-applied diallyl disulfide and di-N-propyl disulfide. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 24(3), 281-286.
- 43-Hovius, M. H., and Goldman, I. L. (2004). Evaluation of long-day onions for resistance to white rot infection using greenhouse and

- laboratory techniques. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129(2), 258-265.
- 44-Carbone, I., and Kohn, L. M. (1993). Ribosomal DNA sequence divergence within internal transcribed spacer 1 of the Sclerotiniaceae. *Mycologia*, 85(3), 415-427.
- 45-Khosa, J. S., McCallum, J., Dhatt, A. S., and Macknight, R. C. (2016). Enhancing onion breeding using molecular tools. *Plant Breeding*, 135(1), 9-20.
- 46-Clarkson, J. P., Payne, T., Mead, A., and Whipps, J. M. (2002). Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. *Plant pathology*, 51(6), 735-745.
- 47-Kohn, L. (2004). Applying comparative genomics to plant disease epidemiology. *Phytoprotection*, 85(1), 45-48.
- 48-Kohn, L. M. (1993). What do we need to know about discomycetous anamorphs. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. Wallingford, UK: CAB International, 129-139.
- 49-Clarkson, J. P., Mead, A., Payne, T., and Whipps, J. M. (2004). Effect of environmental factors and *Sclerotium cepivorum* isolate on sclerotial degradation and biological control of white rot by *Trichoderma*. *Plant Pathology*, 53(3), 353-362. 19-
- 50-Leal, J. A., and Gil, R. (1982). Ultrastructure of sclerotia of *Aspergillus alliaceus*. *Trans Br Mycol Soc*, 78, 323-329.
- 51-Licona-Juárez, K. C., Acosta-García, G., Ramírez-Medina, H., Huanca-Mamani, W., and Guevara-Olvera, L. (2019). Rapid and accurate PCR-based and boiling DNA Isolation methodology for specific detection of *Sclerotium cepivorum* in garlic (*Allium sativum*) cloves. *Interciencia*, 44(2), 71-74.
- 52-LoBuglio, K. F., Pitt, J. I., and Taylor, J. W. (1993). Phylogenetic analysis of two ribosomal DNA regions indicates multiple independent losses of a sexual *Talaromyces* state among asexual *Penicillium* species in subgenus *Biverticillium*. *Mycologia*, 85(4), 592-604.
- 53-Brix, H. D., and Zinkernagel, V. (1992). Effects of cultivation, conditioning and isolate on sclerotium germination in *Sclerotium cepivorum*. *Plant Pathology*, 41(1), 13-19.

- 54-Maude, R. B. (2006). Onion diseases. In *The Epidemiology of Plant Diseases* (pp. 491-520). Springer, Dordrecht.
- 55-McCallum, J. (2007). Onion. In *Vegetables* (pp. 331-347). Springer, Berlin, Heidelberg.
- 56-Melero-Vara, J. M., Prados-Ligero, A. M., and Basallote-Ureba, M. J. (2000). Comparison of physical, chemical and biological methods of controlling garlic white rot. *European Journal of Plant Pathology*, 106(6), 581-588.
- 57-Metcalf, D. A., and Wilson, C. R. (1997). Progress toward a biological control system for onion white root rot in Tasmania. In *II International Symposium on Edible Alliaceae* 555 (pp. 123-127).
- 58-Metcalf, D. A., and Wilson, C. R. (1999). Histology of *Sclerotium cepivorum* infection of onion roots and the spatial relationships of pectinases in the infection process. *Plant pathology*, 48(4), 445-452.
- 59-Metcalf, D. A., and Wilson, C. R. (2001). The process of antagonism of *Sclerotium cepivorum* in white rot affected onion roots by *Trichoderma koningii*. *Plant Pathology*, 50(2), 249-257.
- 60-Metcalf, D. A., Dennis, J. J. C., and Wilson, C. R. (2004). Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. *Plant Disease*, 88(3), 287-291.
- 61-Moore, R. T. (1989). *Ceratorhiza oryzae-sativae*, a new combination for the anamorph of *Cerbasidium setariae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 55(4), 393-395.
- 62-Moreno, L. P., Portugal, V. O., Vandemark, G. J., de la Vega, O. M., Soriano, J. P. M., Marrufo, G. V., and Reyna, J. L. (2002). Genetic relationships among isolates of *Sclerotium cepivorum* Berk. based on RAPD analysis. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20(2), 187-192.
- 63-Novak, L. A., and Kohn, L. M. (1991). Electrophoretic and immunological comparisons of developmentally regulated proteins in members of the Sclerotiniaceae and other sclerotial fungi. *Applied and environmental microbiology*, 57(2), 525-534.
- 64-Oh, J., Y. and Kim, K., D. (2016). Control Strategies for Fungal Pathogens on Stored Onion (*Allium cepa*) and Garlic (*Allium sativum*): A Review. *Life Science and Natural Resources Research* 24: 31-40

- 65-Payghami, E., Massiha, S., Ahary, B., Valizadeh, M., and Motallebi, A. (2001). Enhancement of growth of onion (*Allium cepa* L.) by biological control agent *Trichoderma* spp. *Acta agronomica hungarica*, 49(4), 393-395.
- 66-Prados-Ligero, A. M., Bascon-Fernandez, J., Calvet-Pinos, C., CORPAS-HERVÍAS, C., Lara Ruiz, A., Melero-Vara, J. M., and Basallote-Ureba, M. J. (2002). Effect of different soil and clove treatments in the control of white rot of garlic. *Annals of applied biology*, 140(3), 247-253.
- 67-Punja ZK, Rahe JE (1992) Sclerotium. In: Singleton LL, Mihail JD, Rush CM (Eds) *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*, APS Press, St. Paul, pp 166-170
- 68-Rahe, J. E. (1981). Lack of correlation between field and laboratory tests for resistance with special reference to white rot of onions. *Plant Disease Control: Resistance and Susceptibility*, 193-200.
- 69-Rivera-Mendez, W., Obregon, M., Moran-Diez, M. E., Hermosa, R., and Monte, E. (2020). *Trichoderma asperellum* biocontrol activity and induction of systemic defenses against *Sclerotium cepivorum* in onion plants under tropical climate conditions. *Biological Control*, 141, 104145.
- 70-Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Labs; 1989.
- 71-Sammour, R. H., Yehia, A. G. M., Mustafa, A., and Alhoziem, R. (2011). Biology, controlling and genetic variability in *Sclerotium cepivorum* Berk; the causal agent of *Allium* white rot disease. *Microbiology*, 7, 101-111.
- 72-Sánchez-Pale, J. R., Zavaleta-Mejía, E., Mora-Aguilera, G., and Pérez-Moreno, L. (2000). Variability of four mexican isolates of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(2), 103-110.
- 73-Schwartz, H. F., and Mohan, S. K. (2007). *Compendium of onion and garlic diseases and pests*. APS Press, St. Paul, MN, 1008, 127.
- 74-Shan, X. C., Liew, E. C. Y., Weatherhead, M. A., and Hodgkiss, I. J. (2002). Characterization and taxonomic placement of *Rhizoctonia*-like endophytes from orchid roots. *Mycologia*, 94(2), 230-239.

- 75- Singleton, L. L., Mihail, J. D., & Rush, C. M. (1992). Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi.
- 76-Stewart, A., and Harrison, Y. A. (1989). Mycoparasitism of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. Australasian Plant Pathology, 18(1), 10-14.
- 77-Taylor, J. W., Jacobson, D. J., and Fisher, M. C. (1999). The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. Annual review of phytopathology, 37(1), 197-246.
- 78-Tu, C. C., and Kimbrough, J. W. (1978). Systematics and phylogeny of fungi in the *Rhizoctonia* complex. Botanical Gazette, 139(4), 454-466.
- 79-Tyson, J. L., Ridgway, H. J., Fullerton, R. A., and Stewart, A. (2002). Genetic diversity in New Zealand populations of *Sclerotium cepivorum*. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 30(1), 37-48.
- 80-Van der Meer, Q. P., Van Bennekom, J. L., and Van der Giessen, A. C. (1983). Screening for resistance to white rot caused by *Sclerotium cepivorum* Berk. in onions (*Allium cepa* L.) and leeks (*Allium porrum* L.). Euphytica, 32(3), 697-701.
- 81-Van Esse, H. P., Reuber, T. L., and van der Does, D. (2020). Genetic modification to improve disease resistance in crops. New Phytologist, 225(1), 70-86.
- 82-Vilgalys, R. and Cubeta, M.A. (1994). Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. Annu Rev Phytopathol. 32:135–155.
- 83-Whetzel, H. H. (1945). A synopsis of the genera and species of the Sclerotiniaceae, a family of stromatic inoperculate discomycetes. Mycologia, 37(6), 648-714.
- 84-Xu, Z., Harrington, T. C., Gleason, M. L., and Batzer, J. C. (2010). Phylogenetic placement of plant pathogenic *Sclerotium* species among teleomorph genera. Mycologia, 102(2), 337-346.
- 85-Yamaguchi, I., and Fujimura, M. (2005). Recent topics on action mechanisms of fungicides. Journal of pesticide science, 30(2), 67-74.
- 86-Yoshimi, A., Tsuda, M., and Tanaka, C. (2004). Cloning and characterization of the histidine kinase gene Dic1 from *Cochliobolus heterostrophus* that confers dicarboximide resistance and osmotic adaptation. Molecular Genetics and Genomics, 271(2), 228-236.



**Ministry of Jihad-e-Agriculture
Agricultural Research, Education and Extension Organization
Iranian Research Institute of Plant Protection**

**Identification and management
of onion white rot caused by *Sclerotium
cepivorum***

**Fatemeh Khelghatibana, Kasra Sharifi
and Alireza Javadi**

Register No.:
62097

2022