

بررسی جدایه‌های عامل بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه فوزاریومی خیار گلخانه‌ای با استفاده از آزمون بیماریزایی، گروه‌های سازگاری رویشی و نشانگر مولکولی

موسی نجفی نیا^{۱*} - ایمان شهابی^۲ - سعید رضائی^۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۸/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۲۷

چکیده

بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار ناشی از قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* یکی از بیماری‌های مهم و محدود کننده کشت خیار در دنیا و برخی مناطق ایران است. به منظور مطالعه و بررسی تنوع ژنتیکی این بیمارگر در منطقه جیرفت و کهنوج در سال‌های زراعی ۱۳۸۹ - ۱۳۹۲ تعداد ۴۵ نمونه خیار دارای علائم به آزمایشگاه منتقل و اقدام به جداسازی بیمارگر گردید. تنوع ژنتیکی جدایه‌ها با استفاده از آزمون بیماریزایی، گروه‌های سازگاری رویشی و نشانگر مولکولی RAPD مورد بررسی قرار گرفت. اغلب جدایه‌های به دست آمده در این تحقیق قدرت بیماریزایی بالایی نشان دادند. در بررسی سازگاری رویشی، ۲۸۸ جهش یافته نیت به دست آمد که ۵۳/۴٪ از جهش‌یافتگان نیت در کلاس فنوتیپی *nit1* ۲۵/۲٪ در کلاس فنوتیپی *nit 3* و ۲۱/۴٪ آن‌ها در کلاس فنوتیپی *nit M* قرار گرفتند. سه گروه سازگاری رویشی شناسایی و به صورت اختیاری باندهایی در گستره ۲۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز گردید. نتایج تجزیه خوشه‌ای، جدایه‌ها را در سطح تشابه ۸۴ درصد در دو خوشه قرار داد که بیانگر تشابه ژنتیکی بالای جدایه‌ها است. این اولین مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی در جدایه‌های قارچ *Forc* با استفاده از گروه‌های سازگاری رویشی و نشانگر مولکولی RAPD در جمعیت‌های این گونه در ایران است.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی ریشه و ساقه، تنوع ژنتیکی، خیار، فوزاریوم

مقدمه

انجام آزمون بیماریزایی به روش غوطه‌ورسازی ریشه و نگهداری در دمای خنک ۱۷ تا ۲۱ درجه سانتی‌گراد و نشانگر AFLP به شناسایی فرم ویژه قارچ *Forc* کمک می‌نماید (۸ و ۹). در بلغارستان بر اساس علائم و دامنه میزبانی در میان گونه‌های گیاهی خانواده کدوپیان و خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌های بررسی شده، قارچ *Forc* شناسایی و گزارش گردید (۲۳). برای فرم تخصص یافته *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen. (*Foc*) بیماری پژمردگی خیار، سه نژاد با نام‌های نژاد یک، دو و سه گزارش شده است (۳). نتایج تحقیقات انجام شده بر روی جدایه‌های فرم تخصصی *Forc*، با استفاده از بررسی سازگاری‌های رویشی، آن‌ها را در دو گروه سازگاری رویشی (VCG) و استفاده از نشانگر مولکولی RAPD، جدایه‌های مورد مطالعه را در یک خوشه قرار داده است (۲۰). همچنین تحقیقات انجام شده روی فرم تخصصی *Foc*، جدایه‌های مورد مطالعه را در هشت گروه سازگاری رویشی (VCG) و استفاده از نشانگر مولکولی RAPD، جدایه‌ها را در دو خوشه قرار داده است (۱). کاربرد نشانگر مولکولی RAPD جهت مطالعات فیلوژنتیکی، فرم‌های تخصص یافته *Foc* و *Forc* را در شاخه‌های

بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه فوزاریومی خیار گلخانه‌ای برای اولین بار از کشور یونان گزارش شد و قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* D.J.Vakalounakis (*Forc*) به عنوان عامل بیماری معرفی گردید (۱۹). این بیماری سپس از کشورهای کانادا، فرانسه و اسپانیا گزارش و به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل خسارت‌زا در گلخانه‌های خیار گزارش گردید (۵، ۱۰، ۱۶ و ۲۲). نتایج بررسی‌های انجام شده در گلخانه‌های خیار ترکیه، نشان داده علاوه بر صفات مورفولوژی و نحوه تولید کنیدی و کلامیدوسپور،

۱- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب استان کرمان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، جیرفت
* نویسنده مسئول: (Email: m.najafinia@areeo.ac.ir)
۲ و ۳- به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد و استادیار گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران

فیوژنتیکی جداگانه قرار داده است (۱ و ۲۰). نتایج تحقیقات در کانادا نشان داده میزان تولید آنزیم پکتولیتیک تولید شده در شرایط آزمایشگاه در فرم *Forc* بیشتر از فرم *Foc* بوده است و بکارگیری نشانگر RAPD توانسته است دو فرم تخصص یافته مذکور را از یکدیگر تفکیک نماید (۱۶).

در ایران، بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار یکی از عوامل محدود کننده کشت خیار است و برای اولین بار در سال ۱۳۸۴-۱۳۸۳ از گلخانه‌های منطقه ورامین و پیشوا جداسازی و شناسایی گردید (۱۷). تحقیقات نشان داده است از نظر محتوی و میزان ترکیبات پکتولیتیکی، بین ارقام مقاوم و حساس خیار به بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار تفاوت وجود دارد (۱۸). بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه فوزاریومی خیار در کشت‌های زیرپوشش پلاستیک منطقه جیرفت و کهنوج باعث کاهش محصول به میزان قابل توجهی گردیده است (۱۱). از دیدگاه کاربردی، داشتن اطلاعات کافی از پراکنش پاتوتیپ‌ها و تنوع ژنتیکی پاتوژن، یک نیاز ضروری و پایه جهت انتخاب و یافتن ارقام مقاوم، مناسب و پایدار در مناطق زیر کشت خیار است. این تحقیق به منظور بررسی بیماری‌زایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های فرم تخصص یافته قارچ *Forc* عامل پوسیدگی ریشه و ساقه خیار در منطقه جنوب استان کرمان با استفاده از نشانگر مولکولی به همراه آزمایش‌های بیماری‌زایی و گروه‌های سازگاری رویشی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری از گلخانه‌های تحت کشت خیار در منطقه جیرفت و کهنوج در سال‌های زراعی ۱۳۹۲-۱۳۸۹ به صورت تصادفی انجام پذیرفت. نمونه‌های مشکوک دارای علائم پژمردگی و پوسیدگی طوقه، ساقه و ریشه، در شرایط مناسب به آزمایشگاه منتقل گردید. همچنین تعداد زیادی نمونه بذر از بازار تهیه و اقدام به جداسازی قارچ فوزاریوم از بذور مذکور شد. پس از شستشوی نمونه‌ها زیر آب معمولی، قطعات سه تا پنج میلی‌متری از ناحیه ریشه، ساقه و طوقه نمونه‌های مشکوک جدا و با هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت دو دقیقه ضدعفونی سطحی گردید. پس از شستشو با آب مقطر سترون در سه مرتبه متوالی و آبگیری، به محیط کشت PDA منتقل گردید. جدایه‌های به دست آمده به روش تک اسپور خالص و روی محیط کشت جهت مطالعات بعدی نگهداری شدند. شناسایی قارچ *F. oxysporum* با استفاده از کلید شناسایی معتبر انجام گرفت (۱۴). بدین صورت که برای تشخیص *F. oxysporum* جدایه‌ها در محیط PDA جهت بررسی رنگ و نحوه رشد پرگنه، و در محیط کشت برگ میخک آگار CLA جهت بررسی فیالیس، میکروکنیدی، ماکروکنیدی و کلامیدوسپور کشت داده شدند. آزمون بیماری‌زایی با استفاده از

گیاهچه‌های خیار رقم نگین و به صورت غوطه‌ورسازی ریشه‌ها در سوسپانسیون اسپور با غلظت 1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر، به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه انجام شد. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده بلافاصله به گلدان‌هایی حاوی خاک سترون (۱: خاک‌برگ، ۱: ماسه، ۱: خاک) منتقل و در شرایط دمایی ۲۱ - ۱۷ درجه سلسیوس با ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاهچه‌های مایه‌زنی شده در آب مقطر با شرایط مشابه، به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد (۱۸). گلدان‌ها بر حسب نیاز، آبیاری و هیچ کودی استفاده نشد. وقوع بیماری به صورت روزانه با شمارش و یادداشت گیاهچه‌های دارای علائم انجام شد. ارزیابی نهایی، یک ماه پس از مایه‌زنی، انجام و بروز علائم مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش‌ها در دو گلخانه مجزا و در دمای ۲۱ - ۱۷ و دمای ۳۰ - ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰ - ۵۰ درصد انجام شد (انتخاب دو دامنه دمایی متفاوت جهت تفکیک دو فرم تخصص یافته *Foc* و *Forc* است). هیچ‌گونه رقم افتراقی بومی ایران جهت تفکیک این دو فرم تخصص یافته در کشور معرفی نشده است. نمره دهی و تعیین شدت بیماری‌زایی با استفاده از سیستم نمره‌دهی صفر تا سه (گیاهان سالم نمره صفر، پوسیدگی اولیه ریشه اصلی، ریشه فرعی، طوقه و تغییر رنگ اولیه آوندهای بخش پائین ساقه نمره یک، پوسیدگی شدید ریشه اصلی، فرعی و طوقه همراه با تغییر رنگ شدید آوندهای ساقه و شروع پژمردگی نمره دو و مرگ گیاهچه نمره سه) انجام شد (۲۰). میانگین شاخص بیماری‌زایی روی ۱۰ گیاه چه خیار برای هر جدایه یادداشت و عدد حاصل جهت نمره‌دهی استفاده شد در صورتی که شاخص نمره کمتر از یک بود، جدایه غیر بیماری‌زا تلقی شد. نمره یک تا کوچکتر از دو به عنوان جدایه با بیماری‌زایی ضعیف، دو تا کوچکتر از سه، به عنوان جدایه با بیماری‌زایی متوسط و سه و بیشتر از سه به عنوان جدایه با بیماری‌زایی قوی شناخته شد (۲).

به منظور تأیید فرم تخصصی جدایه‌های *F. oxysporum* که روی خیار بیماری‌زا بودند، گیاهان فلفل، گوجه‌فرنگی، خربزه، هندوانه، طالبی و گرمک انتخاب و توسط جدایه‌های مورد نظر و طبق روش ذکر شده، مایه‌زنی شدند. در این تحقیق، با توجه به غالبیت جدایه‌های به دست آمده از گلخانه‌های خیار، تعیین گروه‌های سازگار رویشی صرفاً روی فرم تخصص یافته *Forc* انجام پذیرفت. جهت تولید موتانت‌های نیت از کلیه جدایه‌های *Forc*، از روش کارل و همکاران (۶) استفاده شد. بدین منظور از محیط‌های MMC و PDC حاوی کلرات پتاسیم یک و نیم درصد استفاده و سکتورهای با رشد قوی و مقاوم به کلرات انتخاب و به محیط حداقل (MM) انتقال و بر اساس فرم رشدی، موتانت‌های نیت شناسایی شدند. بر اساس فرم رشدی روی منابع متفاوت ازت (نیترات، نیتريت، هیپوگواتین، نیترات آمونیم و اسید اوریک) فنوتیپ موتانت‌های نیت تعیین و با کمک آزمون‌های

ساخت شرکت کپازن، استخراج DNA از جدایه‌ها انجام شد. از میان ۲۵ جفت پرایمر بررسی شده، پرایمرهای با چند شکلی بیشتر و تکرارپذیر (جدول ۱) انتخاب گردید. مرحله تکثیر با دستگاه PCR برابر با برنامه دمایی جدول (۲) انجام و تولیدات PCR با استفاده از ژل آگارز یک درصد تفکیک شدند. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار کامپیوتری NtSys-Pc 2.2 انجام و دندروگرام مربوطه با استفاده از ضریب تشابه DICE و روش UPGMA ترسیم و نتایج مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مکمل‌سازی گروه‌های سازگار رویشی شناسایی و جدایه‌های قارچی گروه‌بندی شدند (۶ و ۱۵). با توجه به اینکه امکان دسترسی به جدایه استاندارد و نیت مرجع نبود، نحوه تلاقی به این نحو انجام که پس از تعیین فنوتیپ موتانت‌های نیت، از میان گروه‌های یکسان تعدادی نماینده انتخاب و تلاقی انجام گردید (۱۵). Nit1 با nitM و در برخی جدایه‌ها، nit3 با M تلاقی و موتانت‌های مکمل هم در گروه سازگار رویشی یکسان قرار داده شدند. جهت مطالعات ملکولی، تعداد ۱۸ جدایه به صورت تصادفی انتخاب و با استفاده از کیت استخراج DNA

جدول ۱- توالی آغازگرهای RAPD مورد استفاده در تحقیق (ساخت شرکت SBS Genetech)

Table 1- Sequences of primers used for RAPD (SBS Gentech Company)

توالی پرایمر 5'_3' (Sequence)	اسامی پرایمر (Primers)
AGT CAG CCA C	SBSA-03
AAT CGG GCT G	SBSA-04
TTC CGA ACC C	SBSA-15
GTT TCG CTC C	SBSB-01
TGA TCC CTG G	SBSB-02
CAT CCC CCT G	SBSB-03
TGC TCT GCC C	SBSB-06
TTC GAG CCA G	SBSC-01
GAT GAC CGC C	SBSC-05
GTC CCG ACG A	SBSC-07

جدول ۲- برنامه حرارتی مورد استفاده در تکنیک RAPD

Table 2- Thermo cycler program used for RAPD

مرحله (Stage)	حرارت °C (Temperature)	زمان (Time)	تعداد سیکل (Number of cycles)
Initial denaturation (واسرشت سازی اولیه)	94	5 min	1
Denaturation (واسرشت سازی)	94	1 min	35
Annealing (اتصال)	36	1 min	35
Extension (توسعه)	72	2 min	35
Final Extension (توسعه نهایی)	72	10min	1
Storage (نگهداری)	4		

نتایج و بحث

بر اساس مشخصات مورفولوژی از ۴۵ جدایه جمع‌آوری شده از گلخانه‌های منطقه جیرفت و کهنوج ۴۲ جدایه *F. oxysporum* و سه جدایه *Fusarium* sp شناسایی شد (جدول ۳). آزمون بیماری‌زایی در دو دامنه دمایی متفاوت نشان داد که از ۴۲ جدایه، ۳۶ جدایه در دمای ۱۷ تا ۲۱ درجه روی خیار رقم نگین بیماری‌زا بودند و به‌عنوان *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* شناسایی و شش جدایه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه روی خیار بیماری‌زا و به‌عنوان *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* شناسایی شدند. فرم تخصصی غالب در گلخانه‌های خیار منطقه جیرفت، قارچ *F. oxysporum* f.

بر اساس مشخصات مورفولوژی از ۴۵ جدایه جمع‌آوری شده از گلخانه‌های منطقه جیرفت و کهنوج ۴۲ جدایه *F. oxysporum* و سه جدایه *Fusarium* sp شناسایی شد (جدول ۳). آزمون بیماری‌زایی در دو دامنه دمایی متفاوت نشان داد که از ۴۲ جدایه، ۳۶ جدایه در دمای ۱۷ تا ۲۱ درجه روی خیار رقم نگین بیماری‌زا بودند و به‌عنوان *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* شناسایی و شش جدایه در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه روی خیار بیماری‌زا و به‌عنوان *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum* شناسایی شدند. فرم تخصصی غالب در گلخانه‌های خیار منطقه جیرفت، قارچ *F. oxysporum* f.

جدول ۳- جدایه‌های فوزاریوم به دست آمده از بوته‌های خیار دارای علائم پژمردگی، پوسیدگی ریشه و ساقه

Table 3- *Fusarium* isolates recovered from cucumber infected to wilt, stem and root rot

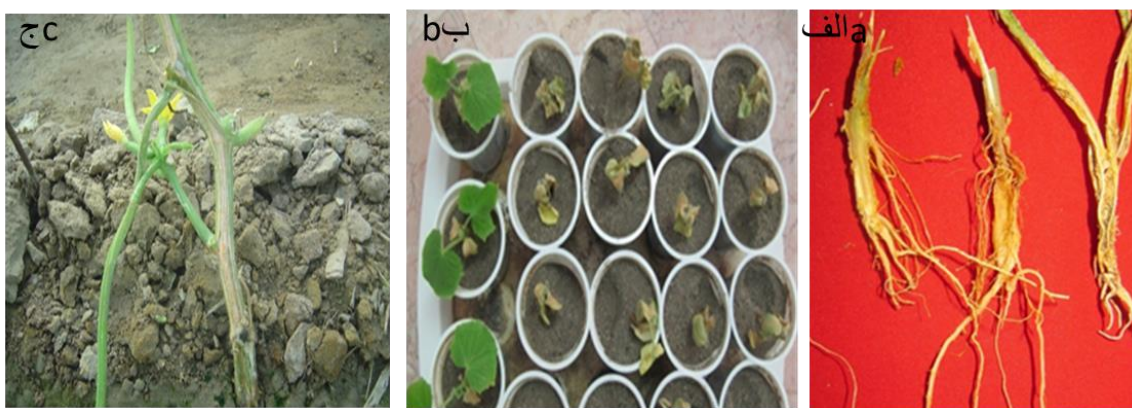
گروه سازگار رویشی VCG	شاخص بیماری‌زایی Disease index	قارچ جداشده Isolated fungus	رقم خیار Cucumber cultivar	محل جمع‌آوری Place of sampling	کد جدایه Isolate code
A	۳ ^H	Forc	زحل Zohal	دریاچه داریاچه daryacheh	F1
A	۳ ^H	Forc	زحل Zohal	دریاچه داریاچه Daryacheh	F2
A	۳ ^H	Forc	رویال Royal	چمن Chaman	F3
-	۰.۸ ^{NP}	<i>Fusarium</i> sp	رویال Royal	سیلو silo	F4
-	۰.۵ ^{NP}	<i>Fusarium</i> sp	گرین مجیک Green magic	سیلو silo	F5
A	۳ ^H	Forc	گاوریش Gavrish	بند سراجی band saraji	F6
B	۲ ^M	Forc	گاوریش Gavrish	بند سراجی band saraji	F7
B	۳ ^H	Forc	رویال Royal	بند سراجی band saraji	F8
A	۳ ^H	Forc	رویال Royal	بند سراجی band saraji	F9
C	۳ ^H	Forc	رویال Royal	هوکرد Hokerd	F10
A	۲ ^M	Forc	رویال Royal	تم گاوان Tom gavan	F11
A	۲ ^M	Forc	رویال Royal	تم گاوان Tom gavan	F12
A	۲.۶ ^M	Forc	رویال Royal	تم گاوان Tom gavan	F13
-	۰.۵ ^{NP}	<i>Fusarium</i> sp	رویال Royal	تم گاوان Tom gavan	F14
A	۳ ^H	Forc	رویال Royal	تم گاوان Tom gavan	F15
-	۲ ^M	Foc	گاوریش Gavrish	تم گاوان Tom gavan	F16
-	۳ ^H	Foc	گاوریش Gavrish	تم گاوان Tom gavan	F17
C	۳ ^H	Forc	ندا Neda	بند سراجی band saraji	F18
A	۳ ^H	Forc	ندا Neda	بند سراجی band saraji	F19
-	۲ ^M	Foc	رویال Royal	بند سراجی band saraji	F20
-	۳ ^H	Foc	رویال Royal	بند سراجی band saraji	F21
C	۳ ^H	Forc	رویال Royal	سیلو silo	F22
A	۳ ^H	Forc	رویال Royal	جنگل آباد Jangal abad	F23
A	۳ ^H	Forc	رویال Royal	جنگل آباد Jangal abad	F24
A	۱ ^L	Forc	رویال Royal	جنگل آباد Jangal abad	F25
B	۳ ^H	Forc	زحل Zohal	دولت‌آباد dowlat abad	F26
B	۳ ^H	Forc	رویال Royal	دریاچه داریاچه Daryacheh	F27
B	۳ ^H	Forc	رویال Royal	دریاچه داریاچه Daryacheh	F28
A	۳ ^H	Forc	رویال Royal	دولت‌آباد dowlat abad	F29
A	۳ ^H	Forc	نگین Negin	باقرآباد Baqer abad	F30
A	۲.۶ ^M	Forc	زحل Zohal	باقرآباد Baqer abad	F31
-	۳ ^H	Foc	زحل Zoha	باقرآباد Baqer abad	F32
-	۲.۶ ^M	Foc	هللیل Halil	بند سراجی band saraji	F33
A	۳ ^H	Forc	زحل Zohal	بند سراجی band saraji	F34
A	۳ ^H	Forc	زحل Zohal	بند سراجی band saraji	F35
B	۲.۶ ^M	Forc	رویال Royal	بند سراجی band saraji	F36
A	۱ ^L	Forc	زحل Zohal	بند سراجی band saraji	F37
B	۲.۶ ^M	Forc	رویال Royal	بند سراجی band saraji	F38
A	۳ ^H	Forc	رویال Royal	سیلو silo	F39
B	۳ ^H	Forc	رویال Royal	کریم‌آباد Karim abad	F40
A	۴ ^H	Forc	هللیل Halil	جنگل آباد Jangal abad	F41
A	۲.۶ ^M	Forc	زحل Zohal	باقرآباد Baqer abad	F42
A	۳ ^H	Forc	رویال Royal	سیلو silo	F43
A	۳ ^H	Forc	نگار Negar	باقرآباد Baqer abad	F44
C	۲.۶ ^M	Forc	رویال Royal	دشت کوچ Dasht koch	F45
-	-	-	رویال Royal	چینه chineh	F46
-	-	-	رویال Royal	چینه chineh	F47

- = آزمون بیماری‌زایی / سازگاری رویشی انجام نشده است، L=بیماری‌زایی ضعیف، M=بیماری‌زایی متوسط، H=بیماری‌زایی قوی

VCG= Vegetative Compatibility Group, Foc=*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, Forc=*Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum*

بیماری‌زا بود. نوار نارنجی رنگ روی بوته‌های مایه‌زنی شده مشاهده نگردید. این نتایج با گزارش‌ها سایر محققین مطابقت دارد (۱۶). نتایج آزمون بیماری‌زایی نشان داد، شدت بیماری‌زایی اغلب جدایه‌های به‌دست آمده در این تحقیق بالای دو است و نشان دهنده قدرت بالای بیماری‌زایی جدایه‌های منطقه و تنوع اندک بین جدایه‌ها از نظر قدرت بیماری‌زایی است. بالغ بر ۶۰ درصد جدایه‌ها در گروه بیماری‌زایی قوی، حدود ۲۴ درصد جدایه‌ها در گروه بیماری‌زایی متوسط، حدود ۴/۵ درصد در گروه بیماری‌زایی ضعیف و بقیه غیربیماری‌زا بودند. (جدول ۳). درصد جداسازی جدایه‌ها در ماه‌های سردتر (آذر، دی و بهمن) بیشتر و با بیولوژی قارچ *Forc* همخوانی نشان داد.

دو فرم تخصص یافته *Foc* و *Forc* به خیار حمله می‌کنند که در حال حاضر تفکیک این دو بر اساس علائم ظاهری، دمای بهینه رشد و دامنه میزبانی انجام می‌شود (۸). نتایج آزمون بیماری‌زایی در دو دامنه دمایی، نشان داد فرم تخصص یافته *Forc* در دماهای ۲۱-۱۷ درجه سانتی‌گراد بیماری‌زایی داشته و در دماهای بالاتر (۳۰ - ۲۵ درجه) بیماری‌زایی نشان نداد و علائم در مرحله گیاه چه ای به‌صورت پوسیدگی ساقه و ریشه و نهایتاً مرگ بوته بروز نمود. ظهور نوار نارنجی رنگ در مراحل پیشرفته بیماری در بوته بالغ مشاهده شد (شکل ۱). فرم *Foc* در دماهای پائین (۲۱ - ۱۷ درجه) روی گیاه خیار بیماری‌زایی نشان نداد ولی در دماهای بالاتر (۳۰ - ۲۵ درجه)



شکل ۱- علائم پوسیدگی ریشه و ساقه (الف) مرگ گیاهچه (ب) و ظهور نوار نارنجی رنگ ناشی از قارچ فوزاریوم (ج) روی خیار
Figure 1- Fusarium stem and root rot of cucumber (a, b) orange stripe (c)

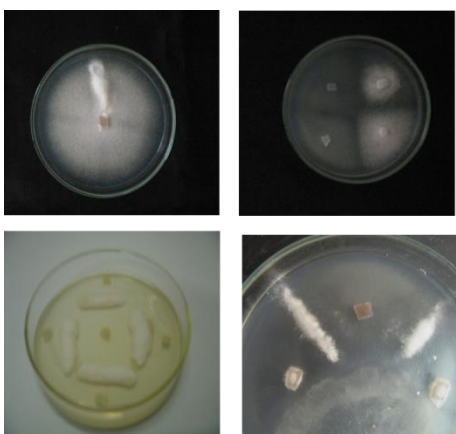
نحوه ورود فرم تخصص یافته جدید به کشور ایران که عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه خیار است نامشخص می‌باشد. در خصوص فرم تخصص یافته *Forc* عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه خیار، آلوده شدن بذر هنوز گزارش نگردیده است. در بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی ناشی از قارچ *F. oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* که یک بیمارگر مشابه عامل بیماری روی خیار است، بذرزاد بودن قارچ عامل بیماری گزارش شده است (۲۲). تقریباً بالای ۹۰ درصد بذور خیار گلخانه‌ای مورد استفاده در منطقه جیرفت وارداتی بوده و به‌احتمال قریب به یقین فرم تخصص یافته *Forc* از سایر کشورها وارد ایران شده است هرچند تلاش نگارندگان برای جداسازی این قارچ از بذور تجاری موجود در بازار موفق آمیز نبوده است. نتایج تحقیقات در کانادا نشان داده است که آلودگی از بذر و بستر کاشت آلوده شروع می‌شود و بیان شده که وجود زخم روی ریشه و دمای پائین در طول مرحله گیاه چه ای و بلوغ باعث تشدید بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار می‌شود (۱۶). نتایج تحقیقات در بلغارستان نشان داده است قارچ عامل بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه

سرعت رشد پرگنه جدایه‌های قارچ مورد بررسی در این تحقیق، روی محیط کشت PDA و در دامنه دمایی 2 ± 25 درجه سانتی‌گراد ۱۵-۴ میلی‌متر در روز اندازه‌گیری شد. پرگنه قارچ دارای میسیلیوم هوایی فراوان و پنبه‌ای بود. رنگ میسیلیوم هوایی از سفید تا بنفش کم‌رنگ متغیر نشان داد. میکروکنیدی‌ها یک تا دوسلولی، گرد و یا بیضوی شکل به فراوانی در سرهای دروغین تشکیل شدند. ماکروکنیدی‌ها خمیده، داسی شکل و غالباً دارای سه تا پنج دیواره عرضی بودند. کلامیدوسپورها اغلب کروی منفرد و گاهی چندتایی به‌صورت میانی و یا انتهایی مشاهده شدند. از نظر مورفولوژیکی و میکروسکوپی تفکیک دو فرم تخصص یافته *Forc* و *Foc* مشکل بود.

هیچ‌گونه جدایه قارچ فوزاریوم از بذور مورد بررسی در این تحقیق (بذور خیار ارقام فستیوال، ویلمورین ۰۳، سوپر، نیکرسون، رقم با کد RZ ۲۲-۵۲۰، زحل، نداء، رویال، اورگرین، گرین مجیک، گاوریش، بارز، نگین، نگار و هلیل) که از رقم‌های رایج در کشت گلخانه‌ای منطقه جیرفت می‌باشند، جداسازی نشد. منشأ پیدایش یا

هوایی و اسپور زایی اندک بود. این حالت رشد به خاطر عدم توانایی این جهش یافته در استفاده از نیترات موجود در محیط کشت به عنوان تنها منبع نیتروژنی محیط بود. این جهش یافته به عنوان جهش یافته نیت شناخته شدند. بر اساس نحوه رشد جهش یافته نیت روی محیط‌های حاوی نیترات، نیتريت، هیپوزانتین، اسید اوریک و آمونیوم کلاس فنوتیپی آنها تعیین شد. جهش یافته نیت در سه کلاس فنوتیپی *nit3*، *nit1* و *NitM* قرار گرفتند. کلاس فنوتیپی *nit1* شامل ۵۳/۴٪ موتانت‌ها و ۲۵/۲٪ در کلاس فنوتیپی *nit3* و ۲۱/۴٪ در کلاس فنوتیپی *NitM* قرار گرفتند. با استفاده از آزمون‌های مکمل سازی (شکل ۲) سه گروه سازگاری رویشی در جمعیت جدایه‌های قارچ *Forc* شناسایی و به طور اختیاری به اسامی VCG-A، VCG-B و VCG-C نام گذاری شدند. بیش از ۶۶٪ از جدایه‌ها متعلق به VCG-A بودند. در این تحقیق هیچ گونه بررسی در خصوص سازگاری یا عدم سازگاری رویشی میان جدایه‌های *Forc* و *Foc* انجام نپذیرفت. نتایج بررسی‌ها نشان داده جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *melonis* با جدایه‌های *F. oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* ناسازگار بوده‌اند (۲۱).

خيار توانایی انتشار از طریق هوا را نیز دارد (۲۴). مصرف زیادی کود در گلخانه‌های خيار منطقه جیرفت در ماه‌های سرد که ریشه گیاه جذب چندانى نداشته، منجر به تجمع عناصر و املاح در خاک و باعث افزایش نمک در اطراف طوقه خيار شده و این امر سبب ایجاد ترک و زخم در ناحیه طوقه شده و احتمالاً ورود قارچ را به میزبان تسهیل می‌نماید. در خصوص قارچ فوزاریوم، تأثیر شوری بر شدت بیماری، بسته به میزبان و فرم تخصص یافته قارچ فوزاریوم، متفاوت گزارش شده است و در گیاه گوجه فرنگی باعث تشدید بیماری شده است (۲۵). تحقیقات تکمیلی در خصوص اثر شوری و تجمع املاح بر تشدید یا تضعیف بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خيار مورد نیاز است. در بررسی گروه‌های سازگاری رویشی در جمعیت قارچ *Forc* تمام جدایه‌های بیمارگر در محیط کشت‌های PDC و MMC با غلظت یک و نیم تا سه درصد کلرات پتاسیم سکتور تولید کردند. این جدایه‌ها از لحاظ فراوانی سکتوردهی با یکدیگر متفاوت بودند. در ابتدا رشد قارچ در این محیط کشت‌ها محدود بود اما پس از گذشت هفت تا ده روز سکتورهای مقاوم به کلرات از پرگنه به صورت سریع‌الرشد و نامتقارن شروع به رشد نمودند (شکل ۲). رشد این سکتورها روی محیط کشت MM به صورت میسلیمی نازک و گسترده بدون ریشه



شکل ۲- تولید سکتور سریع‌الرشد روی محیط حاوی کلرات پتاسیم (a)، تعیین فنوتیپ موتانت نیت (b)، آزمون مکمل سازی موتانت نیت و تعیین گروه سازگار رویشی (c, d)

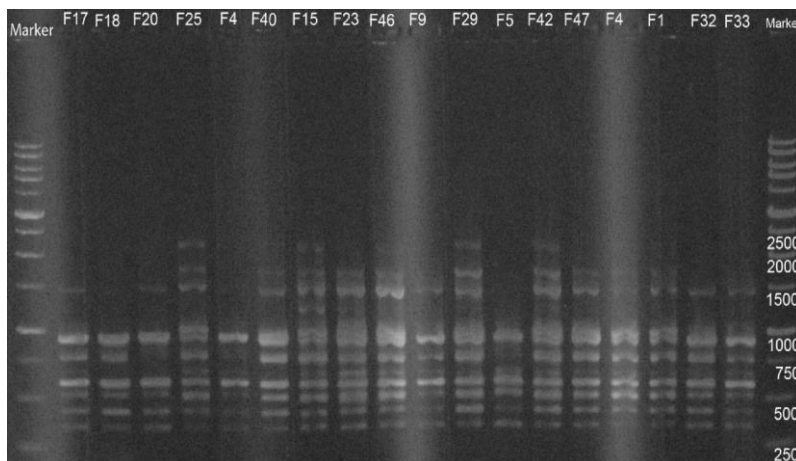
Figure 2- Fast growing sector on medium containing chlorate (a), growing pattern on nitrate source medium (b), (complementation tests (c, d)

(F33) از جدایه‌های فرم تخصص یافته *Forc* و جدایه‌های غیر بیماری‌زا روی خيار تفکیک گردیدند (شکل ۴). جدایه‌های مربوط به *Forc* در سطح تشابه ۹۳ درصد در یک گروه قرار گرفتند. در این تحقیق با توجه به محدودیت‌های اعتباری، تعداد ۱۸ جدایه در مطالعات تنوع ژنتیکی مورد استفاده قرار گرفت. دو جدایه غیر بیماری‌زا (کدهای F4، F5) هرچند تشابه ۸۸ درصد با جدایه‌های مربوط به فرم تخصص یافته *Forc* نشان دادند ولی در کنار هم و در

نقش الکتروفورزی محصولات واکنش زنجیره‌ای مربوط به ۱۸ جدایه فوزاریوم در شکل ۳ نشان داده شده است. ده آغازگر مورد استفاده، چندشکلی بین جدایه‌های قارچ *Forc* و *Foc* با باندهایی در گستره ۲۵۰ تا ۲۵۰۰ جفت باز با ۷۶ درصد پلی مورفیسم نشان دادند. تجزیه خوشه‌ای نتایج حاصل از RAPD با استفاده از ضریب تشابه Dice و روش UPGMA نشان داد در سطح تشابه ۸۴ درصد جدایه‌های مربوط به فرم تخصص یافته *Foc* (کدهای F17، F20، F32،

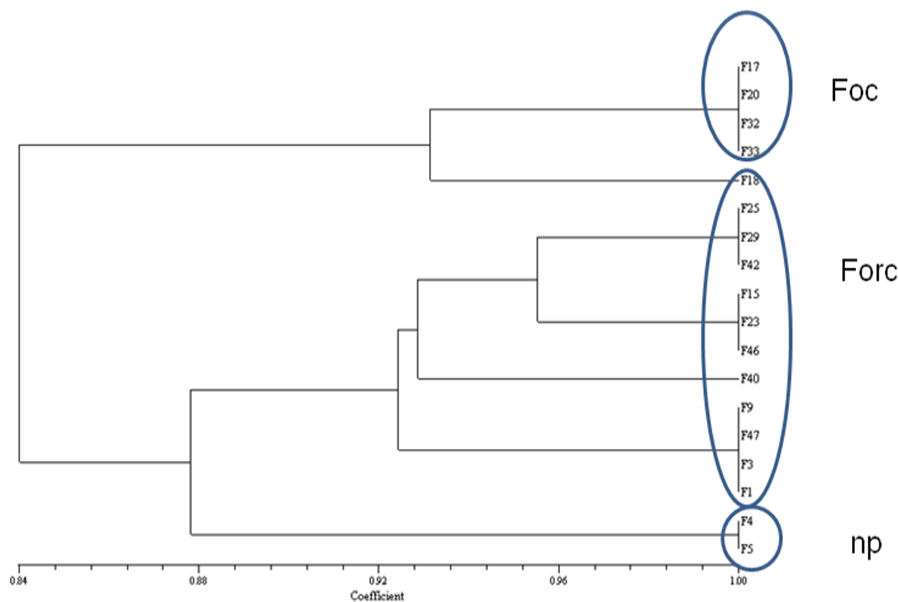
داده که فرم تخصصی *Forc* با فرم تخصصی *Foc* از نظر علائم بیماری، اپیدمیولوژی و حساسیت ارقام، تفاوت دارد (۱۹ و ۹). نتایج برخی از محققین نشان داده جدایه‌های غیر بیماری‌زا به دست آمده از گیاه خیار شباهت بیشتری به جدایه‌های *Forc* در مقایسه با قارچ *Foc* جدا شده از خیار و حتی *Fom* جدا شده از خربزه دارند (۲۰).

یک گروه قرار گرفتند. جدایه *Forc* ۱۸ تشابه بالایی (در حد ۹۳ درصد) با جدایه‌های *Foc* نشان داد و در یک گروه مشترک قرار گرفتند. نتایج این تحقیق نشان داد شباهت زیادی بین جدایه‌های فرم تخصص یافته فوزاریوم عامل بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه خیار با جدایه‌های عامل بیماری پژمردگی خیار (*Foc*) و حتی جدایه‌های غیر بیماری‌زا روی خیار وجود دارد. نتایج تحقیقات در ترکیه و یونان نشان



شکل ۳- نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه های فوزاریوم خیار با استفاده از آغازگر SBS-06 (کدهای F4 و F5 جدایه‌های غیر بیماری‌زای فوزاریوم، کدهای F17, F20, F32, F33 مربوط به جدایه‌های *Foc* و کدهای F1, F3, F9, F15, F18, F23, F25, F29, F40, F42, F46, F47 مربوط به *Forc* به

Figure 3- Electrophoresis patterns of Fusarium isolates using SBS-06 primer, nonpathogenic fusarium (F4, F5), *Foc* isolates ((F17, F20, F32, F33), *Forc* isolates (F1, F3, F9, F15, F18, F23, F25, F29, F40, F42, F46, F47



شکل ۴- دندروگرام شباهت و تشابه ۱۸ جدایه قارچ فوزاریوم (۱۲ جدایه *Forc*، چهار جدایه *Foc* و دو جدایه غیر بیماری‌زا np) با استفاده از نشانگر RAPD با روش UPGMA

Figure 4- Similarity dendrogram of 18 Fusarium isolates using RAPD marker with UPGMA method (12 isolates of *Forc*, 4 isolates *Foc* and 2 nonpathogenic)

محققین در تفکیک فرم‌های تخصص یافته *F. oxysporum* مطابقت داشت (۱،۱۳، ۱۶ و ۲۰). این اولین مطالعه تنوع ژنتیکی در جدایه‌های قارچ *Forc* با استفاده از گروه‌های سازگار رویشی و نشانگر مولکولی RAPD در جمعیت‌های این گونه در ایران است. تحقیقات تکمیلی به منظور مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های سایر مناطق ایران در این خصوص ضروری است. به دلیل تنوع ژنتیکی این بیمارگر و مکانیسم‌های تغییرپذیری این قارچ، استفاده از ارقام مقاوم با مکانیسم مقاومت چندژنی به منظور مدیریت بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه خیار توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می‌دانند از مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور به خاطر تأمین اعتبار پروژه به شماره مصوب ۸۸۱۱۴-۱۶-۷۰-۲ و مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی جنوب کرمان به لحاظ همکاری در اجرای پروژه مذکور تشکر و قدردانی نمایند.

تحقیقات در یونان و هند نشان داده است دلیل این تشابه می‌تواند این باشد که احتمال تغییر از یک فرم تخصص یافته به فرم دیگر وجود دارد و یا اینکه برخی از جدایه‌های بیماری‌زا به جدایه‌های غیر بیماری‌زا تغییر پیدا کرده‌اند (۲۰ و ۱۲). دندروگرام حاصل نشان داد، جدایه‌های بیماری‌زا خوشه اول شامل پنج جدایه *Forc-17*, *Forc-33*, *Forc-32*, *Forc-20*, *Forc-18* بود که همگی از گلخانه‌های یک منطقه در روستای بند سراجی واقع در ناحیه شمالی جیرفت جداسازی شدند. گروه دوم شامل ۱۳ جدایه *Forc-3*, *Forc-45*, *Forc-9*, *Forc-40*, *Forc-25*, *Forc-4*, *Forc-5*, *Forc-1*, *Forc-44*, *Forc-20*, *Forc-23*, *Forc-15* از گلخانه‌های دیگر منطقه به دست آمد. رابطه مشخصی بین پراکنش جغرافیایی و گروه‌های سازگار رویشی و RAPD مشاهده نگردید.

نتایج تحقیقات انجام شده در هند، جدایه‌های فوزاریوم فرم تخصصی *Foc* بدست آمده از خیار را از نظر گروه‌های سازگاری رویشی (VCG) به پنج گروه سازگار رویشی گروه‌بندی نموده‌اند (۱۳). نتایج استفاده از نشانگر مولکولی RAPD در این تحقیق با نتایج سایر

منابع

- 1- Ahn I. P., Chung H. S., and Lee Y. H. 1998. Vegetative compatibility groups and pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*. Plant Disease, 82: 244-246.
- 2- Alves Santos F. M., Martinez B. D., Rodriguez M. M. C., and Diez J. J. 2007. Cultural characteristics, pathogenicity and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from tobacco fields in Spain. Physiological and molecular Plant Pathology, 71: 26-32.
- 3- Armstrong G. M., and Armstrong J. K. 1978. Formae specialis and races of *Fusarium oxysporum* causing wilt of Cucurbitaceae. Phytopathology, 68: 19- 28.
- 4- Bouhot D. 1981. Some aspects of the pathogenic potential in formae specialis and races of *Fusarium oxysporum* on cucurbitaceae. Pages 318-326 in: Fusarium: Disease, Biology, and Taxonomy. P. E. Nelson T. A. Toussoun and R. J. Cook eds. Pennsylvania State University Press, University Park.
- 5- Cerkauskas R. F., Brown J., and Ferguson G. 2001. First report of *Fusarium* stem and root rot of greenhouse cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* in Ontario. Plant Disease, 85(9): 1028-1028
- 6- Correll J. C., Klittich C. J. R., and Leslie J. F. 1987. Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility tests. Phytopathology, 77: 1640- 1646.
- 7- Gerlagh M., and Blok W. J. 1988. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucurbitacearum* n. f. embracing all formae specialis of *F. oxysporum* attacking cucurbitaceous crops. Netherlan Journal of Plant Pathology, 94: 17-31.
- 8- Karaca G., and Kahveci E. 2010. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* on cucumbers in Turkey. Plant Pathology, 59(6): 1173-1174
- 9- Mehmet T. F., and Kurt S. 2010. Pathogenicity, vegetative compatibility and amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* isolates from Turkish greenhouses. Phytoparasitica, 83(3): 253-260.
- 10- Moreno A., Alferez A., Aviles M., Dianez F., Blanco R., Santos M., and Tello J. C. 2001. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* on cucumber in Spain. Plant Disease, 85(11): 1206-1206.
- 11- Najafiniya M., and Shahabi I. 2013. Genetic diversity among Iranian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* using vegetative compatibility groups and RAPD molecular marker. Asian Mycological Congress 2013 and the 13th International Marine and Freshwater Mycology symposium. China National Convention Center (CNCC), Beijing, China, August 19-23, 2013, p56.
- 12- Najafinia M., and Sharma P. 2009. Cross pathogenicity among isolates of *Fusarium oxysporum* causing wilt in cucumber and muskmelon. Indian phytopathology, 62(1): 9-13.
- 13- Najafinia M., and Sharma P. 2011. Characterization of Indian isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* using vegetative compatibility groups (VCGs) and RAPD assay. Indian phytopathology, 64(1): 12-18.
- 14- Nelson P. E., Toussoun T. A., and Marasas W. F. O. 1983. *Fusarium* species: A Illustrated manual for

- identification. The Pennsylvania State University Press, 226 pp.
- 15- Puhalla J. E. 1985. Classification of strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of Vegetative Compatibility. Canadian Journal of Botany, 63: 179-183.
 - 16- Punja Z. K., and Parker M. 2000. Development of Fusarium root and stem rot, a new disease on greenhouse cucumber in British Columbia, caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*. Canadian Journal of Plant Pathology, 22: 349-63.
 - 17- Shahriari D., and Zare R. 2006. Fusarium stem and root rot of greenhouse cucumber. Proceedings of the 17th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran (In Persian).
 - 18- Shahriari D., Molavi E., Aminian H., and Etebarian H. R. 2011. Histopathological response of resistant and susceptible cultivars of cucumber to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, the causal agent of Fusarium stem and root rot. Seed and Plan Production Journal 27(1): 375-391. (In Persian with English summary)
 - 19- Vakalounakis D. J. 1996. Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* f. sp. nov. Plant Disease, 80: 313-316.
 - 20- Vakalounakis D. J., and Fragkiadakis G. A. 1999. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from cucumber differentiation by pathogenicity, vegetative compatibility and RAPD fingerprinting. Phytopathology, 89: 161-168.
 - 21- Vakalounakis D. J., Doulis A. G., and Klironomou E. 2005. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-cucumerinum* attacking melon under natural conditions in Greece. Plant Pathology, 54: 339-346.
 - 22- Vakalounakis DJ., Wang Z., Fragkiadakis GA., Skaracis GN., and Li D-B. 2004. Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China by pathogenicity, VCGs and RAPD. Plant Disease, 88: 645-9.
 - 23- Vatchev T. D. 2007. First report of Fusarium root and stem rot of greenhouse cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* in Bulgaria. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 13: 151-152.
 - 24- Vatchev T. D. 2015. Fusarium root and stem rot of greenhouse cucumber: aerial distribution of inoculum. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 21: 650-654.
 - 25- Woltz SS., Jones JP., and Scott JW. 1992. Sodium chloride, nitrogen source, and lime influence Fusarium crown rot severity in tomato. HortScience, 27: 1087-1088.

