دانشکده: کشاورزی

گروه: زراعت

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیوتکنولوژی در کشاورزی

عنوان

بررسی نقش مواد مترشحه قارچ *Monosporascus cannonballus* در بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه

اساتید راهنما

دکتر ناصر فرخی

دکتر ابوالفضل سرپله

اساتید مشاور

دکتر شاهرخ قرنجیک

دکتر مجتبی ممرآبادی

دانشجو

بهنوش حسینی

بهمن ۹۲

این پایان نامه را در کمال افتخار و امتنان تقدیم می نمایم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است:

به استوارترین تکیه گاهم، دستان پر مهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم، چشمان سبز مادرم

به زیباترین واژه زندگیم، همسر عزیزم حمیدرضا، که نشانه لطف الهی در زندگی من است و سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد،

او که اسوه صبر و تحمل بوده و با همیاری و همدلی خود مسیر مشکلات را برایم تسهیل نمود.

پایانش را با نام او آغاز می‌کنم، چرا که آغازش را نیز خود او رقم زده بود.

سپاس بی‌کران پروردگار یکتا را که هستی‌ام بخشید و به طریق علم و دانش رهنمونم ساخت و به هم نشینی رهروان علم و دانش مفتخرم نمود و خوشه‌چینی از علم و معرفت چنان اساتید گرانقدری را روزیم ساخت.

بر خود لازم می‌دانم از تمامی سرورانی که در مراحل پژوهش و نگارش این پایان‌نامه مرا یاری رساندند، تشکر نمایم. سپاس وافر از استادان راهنمای محترم جناب آقای دکتر ناصر فرخی و دکتر ابوالفضل سرپله که با تکیه بر درایت و دانایی علمی بی‌نظیر و نیز کرامات والای اخلاقی ایشان توانستم این مسیر را به مقصد برسانم و از راهنمایی‌های ارزنده‌شان بهرمند شوم.

از استادان مشاور ارجمندم، جناب آقای دکتر شاهرخ قرنجیک و دکتر مجتبی ممرآبادی که در تمام مراحل کارهای تحقیقاتی‌ام همواره از مشاوره‌های موثر ایشان بهره‌مند شدم، بی‌نهایت سپاس‌گزارم.

از جناب آقای دکتر علی درخشان شادمهری و دکتر محمدرضا عامریان، استادان داور محترم این پایان نامه، به پاس نقطه نظرات علمی ارزنده، صمیمانه سپاس‌گزارم.

از اساتید و کارمندان محترم گروه زراعت دانشگاه صنعتی شاهرود به خاطر کمک های بی‌دریغشان قدردانی می کنم.

از اساتید و کارمندان محترم مؤسسه کیاپزشکی کشور بالأخص آقای مهندس قاسمی، خانم دکتر غائب زمهریر، و خانم مهندس چراغعلی به خاطر مشاوره های ارزنده و کمک های بی دریغشان صمیمانه سپاسگزارم.

تنها از عهده تشکر و جبران محبت ها و ایثار پدر و مادر بزرگوار، همسر مهربانم و خواهر عزیزم برنمی آیم که لطفشان را همواره و بی-چشم داشت شار من نمودند و با دلسوزی و محبت به من دلگرمی دادند.

لحظه هایتان همواره سرشار از عشق و کوچه باغ دلهایتان جای پای بهار باد.

بهنوش حسینی- بهمن ماه یک هزار و سیصد و نود و دو

چکیده:

در این تحقیق، مواد مترشحه عامل پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه *Monosporascus cannonballus* (با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون (*LMWCs*) و بالای ۱۰ کیلودالتون (*HMWCs*)) با کشت قارچ روی محیط کشت مایع *Czapeck's* استخراج گردیدند و به ترتیب با استفاده از الکتروفورز کاغذی با ولتاژ بالا (*HVPE*) و الکتروفورز ژل سدیم دودسیل سولفات- پلی‌آکریل‌آمید (*SDS-PAGE*) خالص سازی و با کمک *Mass spectrometry* توالی‌های پروتئینی کد کننده‌ی این مواد شناسایی گردید. مواد بالای ۱۰ کیلودالتون روی ژل تشکیل سه باند با وزن‌های مولکولی تقریبی ۲۶، ۲۷ و ۵۷ کیلودالتون را دادند که بر طبق نتایج توالی‌یابی دو باند ۲۶ و ۲۷ کیلودالتونی به دلیل شباهت بسیار آنها از نظر توالی اسید آمینه‌ای، ایزوزیم‌های آنزیم سرین پروتئاز و باند ۵۷ کیلودالتونی به عنوان آنزیم آلفا- مانوزیداز شناخته شدند. آنزیم سرین پروتئاز باعث تجزیه کوتیکول دیواره سلولی میزبان می‌شود ولی تا کنون چگونگی مکانیسم بیماری-زایی آنزیم آلفا- مانوزیداز شناخته نشده است. مواد زیر ۱۰ کیلودالتون در *HVPE* در یک نقطه واکنش مثبت با رنگ ناین‌هیدرین نشان دادند و پس از خالص سازی ماده به دلیل کوچک بودن بیش از حد آن شناسایی صورت نگرفت اما به دلیل واکنش رنگی آن با ناین‌هیدرین، میزان حرکت نسبی آن در کاغذ (R_m = ۱)، فعالیت‌های بیولوژیکی از قبیل آب سوختگی به نظر می‌رسد که این ماده از ماراسمین‌ها (گروهی از ترکیبات فیتوتوکسینی) باشد. همچنین با تزریق این پروتئین‌ها و متابولیت‌ها به برگ‌های خربزه، خاصیت فیتوتوکسینی آنها به اثبات رسید و این اولین گزارش از وجود ترکیبات فیتوتوکسینی جداسازی شده از *M. cannonballus* است که باعث بیماری‌زایی روی گیاهان خربزه می‌شوند. همچنین به منظور دست‌یابی به پایه‌های متحمل خربزه، کشت بافت گیاهان خربزه در محیط‌های کشت *Murashinge and Skoog (MS)* همراه با غلظت‌های متفاوت هورمون‌های *2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)* و *Benzyl aminopurine (BA)* و غلظت‌های متفاوت سکروتوم قارچی انجام و پس از حدود ۷ هفته مشخص شد که در محیط کشت با *BA* (۰/۱*mg/l*)، *2,4-D* (۵ *mg/l*) و عصاره قارچ ۰/۷ درصد مقدار کالوس‌زایی بیشتر است و می‌توان در این نوع محیط کشت به گیاهان مقاوم به قارچ *M. cannonballus* دست یافت.

واژگان کلیدی: خربزه، پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌ها، *Monosporascus cannonballus*، فیتوتوکسین‌های قارچی، کشت بافت خربزه

استخراج و شناسایی توکسین‌های قارچ *Monosporascus cannonballus* عامل پوسیدگی ریشه و زوال خربزه را در دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران که از تاریخ ۱ تا ۳ خرداد ماه ۱۳۹۱ در تهران- مرکز همایش‌های بین‌المللی دانشگاه شهید بهشتی برگزار شد، به صورت پوستر ارائه نمودم.

فهرست مطالب

فصل ۱: کلیات

مقدمه ۱

۱-۱- اکولوژی و مشخصات کشاورزی خربزه ۲
۱-۲- بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه ۴
۱-۳- تاریخچه و اهمیت بیماری ۴
۱-۴- چرخه زندگی و اپیدمیولوژی *M. cannonballus* ۵
۱-۵- بیولوژی قارچ *M. cannonballus* ۸
۱-۶- مورفولوژی قارچ عامل بیماری ۹
۱-۷- علایم بیماری در خربزه ۹
۱-۸- روش‌های مدیریت بیماری ۱۲
۱-۹- مولکول‌های دخیل در تعامل بین بیمارگر و میزبان ۱۲
۱-۹-۱- فشارهای مکانیکی و شیمیایی بیمارگرها بر بافت‌های گیاهی ۱۴
۱-۹-۲- مکانیسم ایجاد بیماری ۱۵
۱-۹-۲-۱- آنزیم‌ها در بیماری‌های گیاهی ۱۶
۱-۹-۲-۲- فیتوتوکسین‌های میکروبی در بیماری‌های گیاهی ۱۸
۱-۹-۲-۳- تنظیم کننده‌های رشد در بیماری‌های گیاهی ۱۸
۱-۹-۲-۴- پلی‌ساکاریدها ۲۱
۱-۹-۲-۵- سرکوب‌گرهای پاسخ‌های دفاعی گیاهان ۲۲

فصل ۲: مرور منابع

۲-۱- فیتوتوکسین‌ها و نقش آنها در بیماری‌های گیاهی ۲۵
۲-۲- شناسایی گیاه میزبان توسط بیمارگرهای توکسین‌زا ۲۶
۲-۲-۱- فیتوتوکسین‌های اختصاصی میزبان ۲۷
۲-۲-۲- فیتوتوکسین‌های غیراختصاصی میزبان ۳۳
۲-۳- نقش فیتوتوکسین‌ها در بیان علایم و بیماری ۳۳
۲-۴- مکانیسم عمل فیتوتوکسین‌ها ۳۳
۲-۵- بهره‌برداری از فیتوتوکسین‌ها ۳۶

فصل ۳:مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد ۳۹
۳-۱-۱- مواد شیمیایی و مواد گیاهی ۳۹
۳-۱-۲- جدایه قارچ ۳۹
۳-۱-۳- محیط کشت‌های اختصاصی قارچ *M. cannonballus* ۳۹
۳-۲- روش بررسی ۴۰
۳-۲-۱- تهیه متابولیت‌های قارچی ۴۰
۳-۲-۲- خالص سازی مقدماتی متابولیت‌های (فیتوتوکسین‌های) قارچی ۴۰

۳-۲-۲-۱ آز مون اثبات بیماری‌زایی سکروتوم در گیاه خربزه..... ۴۲
۳-۲-۲-۲- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی سکروتوم..... ۴۲
۳-۲-۲-۳- خالص سازی سکروتوم با استفاده از SDS-PAGE..... ۴۲
۳-۲-۲-۴- شناسایی باندهای پروتئینی..... ۴۳
۳-۲-۲-۵- آزمون اثبات بیماری‌زایی مواد با وزن مولکولی پایین در خربزه..... ۴۳
۳-۲-۲-۶- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی مواد با وزن مولکولی پایین..... ۴۴
۳-۲-۲-۷- خالص سازی مواد با وزن مولکولی پایین با استفاده از HVPE..... ۴۴
۳-۲-۲-۸- بررسی اختصاصی و غیراختصاصی بودن مواد فیتوتوکسینی جداسازی شده..... ۴۶
۳-۲-۲-۹- کشت بافت گیاهان به منظور آنالیز تنوع سوماکلونال..... ۴۶

فصل ۴: نتایج
۴-۱- اثبات بیماریزایی سکروتوم (بالای ۱۰ کیلودالتون) در گیاه خربزه..... ۴۹
۴-۲- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی سکروتوم قارچ..... ۴۹
۴-۳- جداسازی و شناسایی سکروتوم قارچ (متابولیت‌های پروتئینی)..... ۵۱
۴-۴- اثبات بیماریزایی مواد با وزن مولکولی پائین در گیاه خربزه..... ۵۱
۴-۵- تأثیر دما روی فعالیت بیولوژیکی مواد با وزن مولکولی پائین..... ۵۸
۴-۶- جداسازی مواد با وزن مولکولی پائین (LMWCs)..... ۵۸
۴-۷- اثبات اختصاصی و غیراختصاصی بودن مواد فیتوتوکسینی جداسازی شده..... ۶۱
۴-۸- نتیجه کشت بافت گیاهان به منظور آنالیز تنوع سوماکلونال..... ۶۱
فصل ۵: بحث و پیشنهادات ۶۵

ضمائم
ضمیمه۱- محیط کشت FCM و اجزا آن..... ۷۴
ضمیمه۲- محیط کشت Czapeck's و اجزا آن..... ۷۵
ضمیمه۳- چگونگی غلظت سنجی پروتئین به روش برادفورد..... ۷۶
منابع ۸۰

فهرست اشکال

شکل۱-۱: سطح زیر کشت خربزه در ایران ۳

شکل۱-۲: جایگاه تاکسونومی قارچ *M. cannonballus*.....۷

شکل۱-۳: چرخه زندگی قارچ *M. cannonballus* ۷

شکل۱-۴: پرگنه قارچ روی محیط کشت CMA و PDA ۸

شکل۱-۵: تصاویر میکروسکوپی از قارچ *M. cannonballus* ۱۱

شکل۱-۶: علایم بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه باعامل *M. cannonballus* ۱۱

شکل۳-۱: فیلتر کردن و به دست آوردن متابولیت‌های بالا و زیر ۱۰ کیلودالتون ۴۱

شکل۴-۱: بررسی تأثیر سکروتوم بالای ۱۰ کیلودالتون روی برگ‌های حقیقی و کوتیلدونی خربزه ۵۰

شکل۴-۲: بررسی تأثیر سکروتوم بالای ۱۰ کیلودالتون حرارت داده شده..... ۵۰

شکل۴-۳: SDS-PAGE سکروتوم با وزن مولکولی بالاتر از ۱۰ کیلودالتون ۵۲

شکل۴-۴: توالی آنزیم alpha-1,2-mannosidase شناسایی شده در قارچ *M.cannonballus* ۵۳

شکل۴-۵: نتایج Mass spectrometry باندهای ۲۶ و ۲۷ کیلودالتون..... ۵۴

شکل۴-۶: توالی آنزیم serine protease شناسایی شده در قارچ *M. cannonballus*..... ۵۵

شکل۴-۷: دندروگرام فیلوژنی دو آنزیم alpha-1,2-*mannosidase* و serine protease.....۵۶

شکل۴-۸: بررسی تأثیر مواد با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون روی برگ‌های حقیقی و کوتیلدونی گیاه خربزه.....۵۷

شکل۴-۹: بررسی تأثیر مواد با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون حرارت داده شده..... ۵۹

شکل۴-۱۰: HVPE مواد با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون.....۶۰

شکل۴-۱۱ (الف) و (ب): بررسی اختصاصیت و غیراختصاصی بودن میزبانی تأثیر عصاره‌های قارچی با وزن مولکولی زیر ۱۰ کیلودالتون و بالای ۱۰ کیلودالتون ۶۲

شکل۴-۱۲: بررسی تأثیر غلظت‌های متفاوت هورمون‌های BA و 2,4-D و غلظت‌های متفاوت عصاره قارچی بر مقدار کالوس‌زایی ۶۳

فهرست جداول

جدول۱-۱: بیماری‌های مهم خربزه ۳

جدول۱-۲: روش‌های مدیریت بیماری ۱۳

جدول۲-۱: توکسین‌های اختصاصی میزبان ۳۱

جدول۲-۱: توکسین‌های اختصاصی میزبان ۳۲

جدول۲-۲: توکسین‌های غیراختصاصی میزبان ۳۴

جدول۴-۱: آنزیم‌های مشابه به دست آمده از protein blast دو آنزیم آلفا-مانوزیداز و سرین پروتئاز ۵۵

جدول۱: محیط کشت FCM ۷۴

جدول۲: محیط کشت Czapeck's ۷۵

فصل ۱:

کلیات

مقدمه

خربزه[1] از خانواده کدوییان[2] و محصولی با ارزش در بیشتر کشورهای جهان می‌باشد. ناحیه اصلی و منبع اولیه خربزه به شکل کنونی کشور ایران، قفقاز و کشورهای همسایه ایران است. گونه و رقم‌های اهلی خربزه از رقمی وحشی که در ایران نیز موجود است موسوم به *Cucumis trigonus* به وجود آمده است (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۴).

از نظر وضعیت تولید در جهان طبق آمار فائو کل سطح زیر کشت این محصول در سال ۲۰۰۵ میلادی، ۱،۳۰۸،۰۱۸ هکتار، با عملکرد متوسط ۲۱/۶ تن در هکتار و تولید ۲۸،۳۲۱،۱۵۹ تن می‌باشد که بالاترین تولید متعلق به کشور چین با بیش از ۱۵۱ میلیون تن با متوسط عملکرد ۲۶/۱ تن در هکتار است و ایران با تولید بیش از ۱/۲ میلیون تن از تولیدکنندگان عمده (دارای رتبه سوم جهانی) گیاهان این خانواده و به ویژه خربزه می‌باشد (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۴). خربزه گیاهی حساس به بیماری‌های گوناگون است و یکی از بیماری‌های بسیار مهم این محصول، پوسیدگی ریشه و زوال بوته-ها است که عامل آن قارچ *Monosporascus cannonballus* می‌باشد که معمولاً ۱ تا ۲ هفته مانده به برداشت محصول ظاهر شده و خسارت زیادی بعضاً تا ۱۰۰ درصد به وجود می‌آورد (توماس و همکاران، ۱۹۹۶).

از آن‌جایی که کنترل شیمیایی در این بیماری رضایت بخش نبوده است و استفاده از طیف وسیعی از قارچ‌کش‌ها و مواد شیمیایی پایدار منجر به آلودگی آب، خاک و بروز مقاومت به عوامل بیماری‌زا می-شود، و به لحاظ خسارت رو به افزایش بیماری‌ها به محصولات زراعی و سعی در کاهش میزان استفاده از سموم شیمیایی، انتخاب ژنوتیپ‌های مقاوم از اصلی‌ترین اهداف اصلاح کنندگان گیاهان طی چندین سال گذشته بوده است. استفاده از روش‌های نوین اصلاح نباتات مولکولی به عنوان ابزاری برای اصلاح و انتخاب گیاهان مقاوم به بیماری فرصت مناسبی را فراهم می‌سازد تا با استفاده از تنوع ژنتیکی ایجاد

1 - *Cucumis melo*
2 - *Cucurbitaceae*

شده در اثر تغییرات سوماکلونی و نیز بهره‌گیری از مهندسی ژنتیک و گزینش درون شیشه‌ای بتوان رقم‌های گیاهی را به سرعت گزینش و تولید نمود که در مقابل پاره‌ای از بیماری‌ها مقاوم باشند.

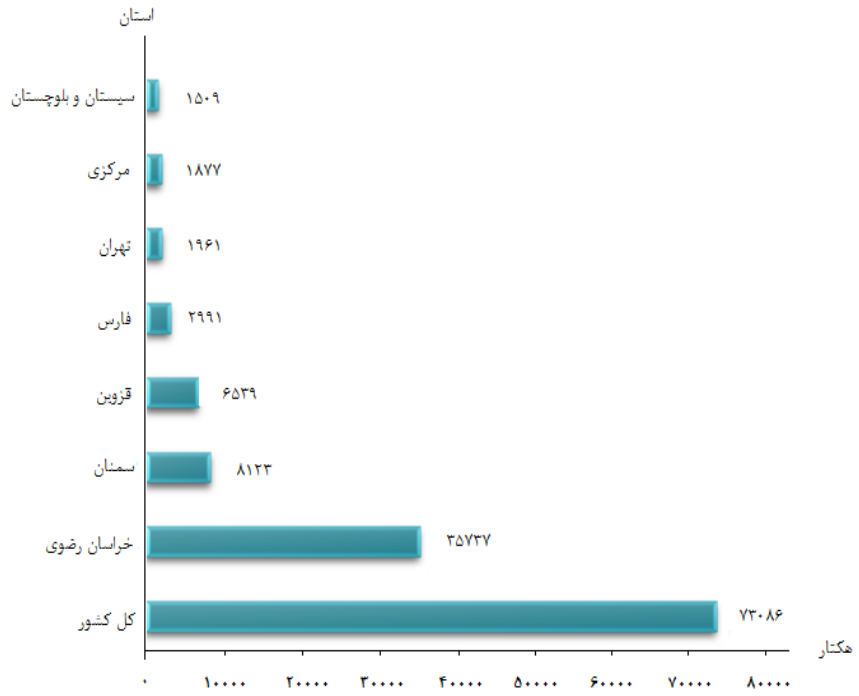
فیتوتوکسین‌ها گروهی از مواد مؤثر در فرآیند بیماری‌زایی هستند که با توجه به فعالیت بیولوژیکی آنها و نقششان در توسعه بیماری، اخیراً از این مواد به عنوان کاوشگری مناسب برای تشخیص سریع کلون‌های مقاوم گیاهان و یا نسل‌های حاصل از تلاقی گیاهان مقاوم با سایر گیاهان استفاده شده است.

در این بررسی، هدف اصلی تحقیق استخراج و شناسایی برخی فرآورده‌های نهایی ژن‌های دخیل در بیماری‌زایی مانند فیتوتوکسین‌های قارچ *Monosporascus cannonballus* می‌باشد. با شناسایی ژن-های کد کننده فیتوتوکسین‌ها و کلون کردن آنها می‌توان خصوصیات آنها را مورد ارزیابی قرار داد و در مطالعات مولکولی پایه استفاده کرد. در حقیقت اگر همان ژن یا ژن‌هایی که تولید توکسین را کنترل می‌کنند، با بیماری‌زایی بیمارگر و شدت علایم ایجاد شده در گیاه مرتبط باشند، می‌توان نقش معنی-دار فیتوتوکسین‌ها را در بیماری‌زایی حتمی دانست.

۱-۱- اکولوژی و مشخصات گیاه شناسی خربزه

خربزه به لحاظ نیازهای دمایی و نوری بالا معمولاً در مناطق گرم و نیمه خشک ایران کشت می-شود (شکل۱-۱) و عمده مراحل رشدی آن در ماه‌های گرم تابستان می‌باشد (پوستچی، ۱۳۵۰). خربزه و طالبی بهترین نتیجه را در آب و هوای گرم و خشک می‌دهند و در این اقلیم‌هاست که طعم آنها شیرین شده و محصول عطری دلپذیر خواهد یافت.

در شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب گیاه رشد و نمو بهتری می‌کند ولی میوه آن مرغوب و مطبوع نخواهد شد و گیاه بیشتر مورد حمله امراض قارچی قرار می‌گیرد. خربزه، گیاهی حساس به بیماری‌های گوناگون است که می‌تواند از زمان کاشت تا برداشت مورد حمله عوامل بیماری‌زای مختلف قرار گیرد (جدول۱-۱). این گیاه بر روی تمام خاک‌ها پرورش می‌یابد. ولی بهترین خاک شنی



شکل۱-۱: سطح زیر کشت خربزه در ایران (آمارنامه سال ۱۳۸۸)

جدول ۱-۱: بیماری‌های مهم خربزه (توماس و همکاران، ۱۹۹۶)

نوع بیمارگر	بیماری	نام علمی بیمارگر	میزان خسارت
قارچ			
	سفیدک کرکی	*Pseudoperonospora cubensis*	بسیار بالا
	سفیدک سطحی	*Sphaerotheca fuliginea*	بسیار بالا
	پوسیدگی ریشه و زوال بوته	*Monosporascus cannonballus*	بسیار بالا
	سوختگی ساقه	*Didymella bryoniae*	متوسط
	اسکب	*Cladosporium cucumerinum*	متوسط
	بوته‌میری فایتوفتورایی	*Phytophthora drechsleri*	متوسط
	پژمردگی فوزاریومی	*Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis*	متوسط
باکتری			
	پژمردگی باکتریایی	*Erwinia tracheiphila*	بالا
	لکه زاویه‌ای برگ	*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*	متوسط
	لکه برگی باکتریایی	*Xanthomonas campestris* pv. *cucurbitae*	متوسط
ویروس			
	ویروس موزائیک کدوئیان	Cucumber Mosaic Virus	بالا
	ویروس زردی کدوئیان	Cucurbit Aphid-Borne Yellow Virus	بالا

یا لوم سیلتی است. هر چه مواد معدنی خاک مثل پتاسیم و فسفر بیشتر باشد، مزه طالبی و خربزه شیرین‌تر می‌شود. بذر خربزه عموماً در درجه حرارت ۱۲ تا ۱۵ درجه سلسیوس شروع به جوانه زنی می‌کند و مناسب‌ترین درجه حرارت برای رشد رویشی خربزه ۳۵-۲۵ درجه سلسیوس می‌باشد و فاصله بین زمان کاشت و اولین برداشت حدود ۱۱۰-۸۰ روز است. مناسب‌ترین اسیدیته برای کاشت خربزه بین ۶ تا ۷ می‌باشد. در خاک‌های اسیدی رشد آن کاهش یافته و برگ‌ها به رنگ زرد مایل به سبز در می‌آیند (مبلی و پیراسته، ۱۳۷۲).

۱-۲- بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه

عامل بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه قارچ *M. cannonballus* می‌باشد که متعلق به شاخه آسکومایست‌ها است (شکل۱-۲). این بیمارگر به طور معمول در شرایط گرم و خشک و به ویژه در سال‌های کم آب به صورت همه‌گیر در مزرعه ظاهر و ۱-۲ هفته مانده به برداشت محصول باعث مرگ بوته‌ها می‌شود (مارتین و میلر، ۱۹۹۶؛ هولمز و استَنگلینی، ۱۹۹۸؛ کوهن و همکاران، ۲۰۰۰). در گیاهان جوان ممکن است آلودگی وجود داشته باشد ولی تا زمانی که گیاهان بالغ نشده‌اند و میوه‌ها ایجاد نشده باشند علایم مشخصه بیماری ظاهر نمی‌شوند. در اثر ایجاد این بیماری درصد زیادی از میوه‌ها غیر قابل عرضه به بازار می‌شوند، چرا که اندازه آنها کوچک و شیرینی آنها کم و آفتاب سوخته می‌شوند (مرتِلی، ۱۹۹۱). علایم نکروزه در ریشه‌ها ظاهر می‌شوند و به تدریج به رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز در می‌آیند و در شرایط حاد دانه‌های سیاه رنگ پریتسیوم بر روی ریشه‌ها نمایان می‌شوند (مارتین و میلر، ۱۹۹۶).

۱-۳- تاریخچه و اهمیت بیماری

بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه برای نخستین بار از ایالت آریزونا توسط تروتمن و ماتجکا (۱۹۷۰) گزارش شد. از آن زمان به بعد، این بیماری در نقاط مختلف جهان شناسایی شد و تحت عناوین مرگ خربزه (رونی و همکاران، ۱۹۸۳ و گارسیا- جیمنز و همکاران، ۱۹۹۴)، پژمردگی

ناگهانی (ایال و کوهن، ۱۹۸۶؛ کوهن و همکاران، ۱۹۹۶؛ پیونیا و همکاران، ۱۹۹۷ و ادلستین و همکاران، ۱۹۹۹)، پوسیدگی ریشه (کیم و همکاران، ۱۹۹۵)، زوال بوته (بروتن و میلر، ۱۹۹۷)، پوسیدگی ریشه و زوال بوته (مِرتلی و همکاران، ۱۹۹۱؛ مارتین و همکاران، ۱۹۹۴ و ولف و میلر، ۱۹۹۸) معرفی گردید. در حال حاضر این بیماری از بسیاری از مناطق گرم و نیمه خشک جهان مانند ژاپن (واتاناب و همکاران، ۱۹۷۹ و اُماتسو و همکاران، ۱۹۸۵)، جنوب‌غربی آمریکا (مرتِلی و همکاران، ۱۹۹۱ و ۱۹۹۳)، جنوب اسپانیا (گارسیا-جیمنِز و همکاران، ۱۹۹۴)، تونس (مارتین و همکاران، ۱۹۹۴)، تایوان (تسای و تانگ، ۱۹۹۵)، هندوستان (مارتین و میلر،۱۹۹۶)، عربستان سعودی (کارلاتی و همکاران، ۱۹۹۷) و آمریکای مرکزی (بروتن و میلر، ۱۹۹۷) گزارش شده است. در ایران این بیماری اولین بار از روی بوته‌های طالبی و خربزه از مناطق گرمسار و ایوانکی گزارش شد (سرپله و سنبل کار، ۱۳۸۱). میزبان‌های این بیماری خربزه، طالبی، خیار و هندوانه می‌باشند. درحال حاضر شواهدی دال بر همه‌گیری این عامل در بروز بوته‌میری‌های آخر فصل خربزه و طالبی در مناطق گرم و نیمه خشک ایران و یا زراعت‌هایی با مالچ پلاستیک وجود دارد که باعث خسارت زیاد به صیفی‌کاران و در نتیجه در بسیاری از نقاط، باعث کاهش شدید کشت این محصول شده است (سرپله، ۲۰۱۲ و ۲۰۰۸). به عنوان مثال در منطقه ایوانکی و گرمسار که از مناطق بومی کشت خربزه در ایران می‌باشند بروز گسترده بوته‌میری پایان فصل بر اثر *M. cannonballus* باعث کاهش شدید سطح زیر کشت شده است.

۱-۴- چرخه زندگی و اپیدمیولوژی *M. cannonballus*

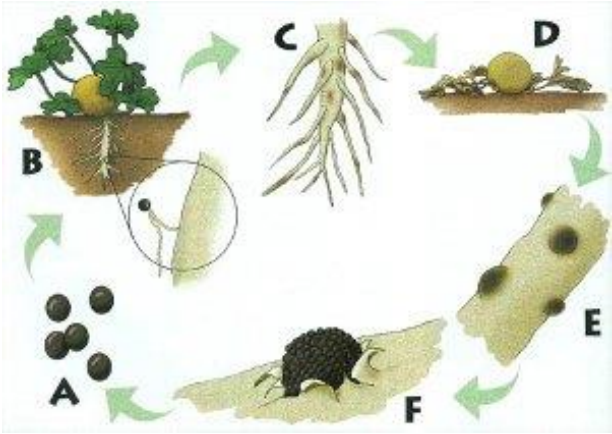
چرخه زندگی قارچ *M. cannonballs* در شکل ۱-۳ آورده شده است. آسکوسپورها از پریتسیوم رها می‌شوند، پس از قرار گرفتن در مجاورت ریشه‌های جوان بوته‌های خربزه جوانه می‌زنند و در لایه بیرونی[1] و گاهی لایه‌های اول و دوم اپیدرم ریشه نفوذ می‌کنند (A) و باعث بروز لکه‌های نکروز و قهوه‌ای روی ریشه می‌شود (B). علایم بیماری در بخش‌های هوایی به صورت کلروز و نکروز برگ‌های

1 - cortex

نزدیک به طوقه ظاهر می‌گردد که به سمت برگ‌های بالایی بوته پیش می‌رود و گیاه را درست ۱ تا ۲ هفته قبل از برداشت محصول از پا در می‌آورد (C). در این مرحله ممکن است پریتسیوم‌ها روی ریشه تشکیل (D) و پس از بلوغ آنها (E)، آسکوسپورها مجدداً رها شده و در خاک تا دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد زنده باقی بمانند (F) (مارتین، ۲۰۰۲) که احتمالاً در بروز آلودگی در کشت‌های بعدی نقش دارند.

آسکوسپورها می‌توانند در بقایای گیاهی آلوده و یا در خاک، بدون وجود میزبان در حالت کمون تا فصل بعدی کشت باقی بمانند ولی این‌که تا چه مدت میسلیوم‌ها در خاک باقی می‌مانند، مشخص نیست. این بیماری توسط روش‌هایی که بتوانند خاک یا بقایای گیاهان آلوده را به جای دیگر منتقل کنند سرایت می‌کند (باد، سیل، فرسایش، کشت و...). هیچ مدرکی در مورد انتقال این بیماری از طریق بذر یا به طور سیستمیک وجود ندارد. این بیماری ریشه‌ها را آلوده می‌کند و میوه‌ها به طور مستقیم آلوده نمی‌شوند (مارتین و میلر، ۱۹۹۶). دمای بهینه برای رشد و بیماری‌زایی این قارچ بین ۳۸–۲۵ درجه سلسیوس می‌باشد که برای جوانه‌زنی آسکوسپورها مناسب می‌باشد (بروتُن و همکاران، ۲۰۰۰). استَنگلینی و همکاران (۱۹۹۶) مشاهده کردند که آسکوسپورها هم به صورت افقی و هم به صورت عمودی در خاک مزارع آلوده انتشار می‌یابند. هر آسکوسپور از طریق بیش از ۳ لوله تندش در ریشه میزبان نفوذ و منجر به بروز حالت فرورفته روی ریشه می‌شود. نتایج این تحقیقات نقش آسکوسپورها را به عنوان اینوکولوم اولیه تأیید کرد.

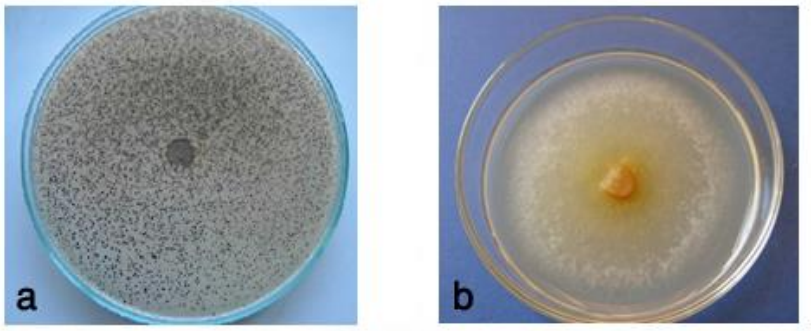
شکل۱-۲: جایگاه تاکسونومی قارچ *Monosporascus cannonballus* (پولاک و اکر، ۱۹۷۴)



شکل۱-۳: چرخه زندگی قارچ *Monosporascus cannonballs*. A: آسکوسپورهای بالغ در خاک. B: آسکوسپورهای جوانه زده و چسبیده به ریشه. C: نواحی نکروزه شده در ریشه. D: پژمردگی و زوال بوته. E: پریتسیوم‌های روی ریشه های آلوده. F: پریتسیوم‌های بالغ و آماده برای خارج شدن آسکوسپور (کوهن و همکاران، ۲۰۰۰).

۱-۵- بیولوژی قارچ *M. cannonballus*

این بیماری با ایجاد آسکوسپورها خود را در داخل خاک تثبیت می‌کند. این آسکوسپورها خیلی قوی هستند و در حقیقت اسپورهایی با چند دیواره می‌باشند که به شدت در مقابل خشکی مقاوم هستند. جوانه زدن آنها در داخل آزمایشگاه به ندرت اتفاق می‌افتد. درجه حرارت مناسب برای رشد رویشی این قارچ در آزمایشگاه بین ۳۵-۲۵ درجه سلسیوس می‌باشد. میسلیوم قارچ در pH = ۹-۵ رشد می‌کند ولی شرایط بهینه بین pH = ۷-۶ است و شرایط اسیدیته چهار به پایین مانع رشد می‌شود. این قارچ در خاک‌های قلیایی و نمکی ملایم سازگاری بهتری دارد. محیط‌های کشت مناسب برای رشد این قارچ PDA[1] (شکل ۱-۴، a) و CMA[2] (شکل ۱-۴، b) می‌باشند. پریتسیوم این قارچ بین ۲- ۳ هفته ظاهر می‌شود. پریتسیوم‌ها به صورت دانه‌های سیاه رنگ روی آنها ظاهر می‌شوند. در بعضی شرایط کلنی‌ها با ایجاد رنگدانه‌هائی به رنگ زرد تا نارنجی یا قهوه‌ای تیره دیده می‌شوند (کوهن و همکاران، ۲۰۰۰).



شکل۱-۴: پرگنه قارچ *M. cannonballus* در محیط کشت CMA حاوی پریتسیوم‌ها (a) و محیط کشت PDA بعد از گذشت ۱۴ روز در دمای ۳۸ - ۲۴ درجه سانتی‌گراد (b) (حسینی، ۱۳۹۰).

1 - potato dextrose agar

2 - corn meal agar