مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده کشاورزی
گروه گیاه پزشکی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی

تعیین گروه‌های سازگاری رویشی نژادهای *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* و مدیریت بیماری در ایران

استادان راهنما
دکتر محمد سالاری
دکتر ابوالفضل سرپله

استادان مشاور
دکتر سید کاظم صباغ
دکتر ناصر پنجه‌که

نگارش
زهره کربلایی‌زاده

بهمن ۱۳۹۰

تقدیم به همه کسانی که در راه اعتلای علمی این کشور تلاش کرده اند

از جناب آقای دکتر محمد سالاری استاد راهنمای اول پایان نامه سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر ابوالفضل سرپله استاد راهنمای دوم پایان نامه، که راهنمایی ها و ارشاد ایشان از ابتدای این دوره شامل حال من بوده و در تمام مراحل از حمایت های ایشان بهره مند بودم برای دلسوزی ها و راهنمایی های ایشان صمیمانه سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر ناصر پنجه که و دکتر سید کاظم صباغ، اساتید مشاور این تحقیق به خاطر مساعدت ها و راهنمائی هایشان کمال تشکر را دارم.

از داور محترم پایان نامه جناب آقای دکتر مرتضی قربانی و نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای دکتر علی میرشکار کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر سیاه سر رئیس دانشکده کشاورزی برای تمام خوبی ها، مهربانی ها و حمایت هایشان صمیمانه سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر صبوحی و جناب آقای دکتر رون به خاطر مساعدت ها و راهنمائی هایشان کمال قدردانی را دارم.

از خانواده مهربان و دوستان عزیزم کمال قدردانی را دارم.

چکیده

خربزه یکی از محصولات مهم جالیزی در ایران می‌باشد. بیماری‌های زیادی باعث کاهش محصول یا از بین رفتن این گیاه می‌شوند. یکی از بیماری‌های مهم این محصول، بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌باشد که توسط *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) ایجاد می‌گردد. در این تحقیق به منظور شناخت ساختار جمعیتی Fom، گروه‌های سازگار رویشی (Vegetative Compatibility Groups (VCGs و نژادهای ۴۸ جدایه از بیمارگر Fom که از مناطق مختلف ایران جمع آوری شده بودند تعیین گردید. کارایی ترکیب تریانوم-پی (Trianum-p) در کنترل بیولوژیکی بیمارگر و نیز امکان پیوند ارقام حساس خربزه بر روی پایه-های غیر میزبان مورد بررسی قرار گرفت. گروه‌های سازگار رویشی جدایه‌ها با استفاده از جهش یافتگان nit روی محیط حاوی کلرات تولید شده بودند تعیین گردید. گروه فنوتیپی جهش یافتگان، بر اساس نحوه رشد پرگنه آن‌ها روی منابع مختلف نیتروژن تعیین شد. از ۹۱ جهش یافته nit ۴۹/۴۵ درصد متعلق به کلاس فنوتیپی nit 1، ۲۴/۱۷ درصد به کلاس فنوتیپی nit 3 و ۲۰/۸۸ درصد در کلاس فنوتیپی Nit M قرار گرفتند. مقدار ۵/۵ درصد از جهش یافتگان nit در هیچ کلاس فنوتیپی قرار نگرفتند. به منظور تعیین گروه‌های سازگار رویشی، هر یک از جهش یافتگان با جهش یافتگان جدایه‌های استاندارد 0136-0130، روی محیط حداقل تلاقی داده شدند. جدایه‌ها در سه گروه سازگار رویشی ۰۱۳۰، ۰۱۳۱ و ۰۱۳۴ قرار گرفتند. بیشترین فراوانی جدایه‌ها مربوط به گروه سازگاری رویشی ۰۱۳۴ و در گروه ۰۱۳۱ کمترین تعداد جدایه‌ها قرار گرفت. ارتباطی بین نژاد و پراکنش جغرافیایی و نوع میزبانی که قارچ از آن جدا شده بود با VCG جدایه‌ها وجود نداشت. اثر آنتاگونیستی تریانوم-پی روی سه جدایه Race-1، Race-1,2 و 479 قارچ Fom مورد ارزیابی قرار گرفت. مکانیسم‌های آنتاگونیستی مختلف نظیر مایکوپارازیتیسم، قدرت رقابت تغذیه‌ای، قدرت کلونیزاسیون، تأثیر متابولیت‌های ترشحی خارج سلولی فرار و غیر فرار تریانوم-پی روی جدایه‌های این بیمارگر در محیط کشت PDA مورد آزمایش قرار گرفت. مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی نشان داد که این ترکیب روی هر سه جدایه Fom از طریق رفتارهای مایکوپارازیتیسم باعث اختلال رشد و بد شکلی ریسه شده است. این ترکیب در روش‌های کشت متقابل، ترکیبات غیر فرار و فرار نیز رشد عامل بیماری را به ترتیب به میزان ۶۶/۵۵، ۳۴/۶۱ و ۳۲/۸۵ درصد کاهش داد. در ارزیابی تأثیر ماده بیولوژیک تریانوم-پی روی نژادهای Fom از سه روش افزودن سوسپانسیون تریانوم-پی به خاک، تیمار بذری به صورت پوشش بذر و ریشه گیاهچه استفاده گردید. این آزمایش به صورت تجزیه واریانس یک طرفه در پایه طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار برای هر تیمار در گلخانه انجام شد. کمترین شدت آلودگی ۲/۷۷ درصد بود. در آزمون افزودن تریانوم-پی به خاک در گلدان‌های آلوده شده با نژادهای ۱ و ۱,۲، درصد گیاهان سالم به ترتیب ۶۶/۶۷ و ۶۱/۱۲ درصد در مقایسه با شاهد آلوده صفر درصد بود ($p<0.05$). در آزمون تیمار بذر با سوسپانسیون آنتاگونیست، درصد گیاهان سالم در تیمارهای مایه زنی شده با نژادهای ۱ و ۱,۲ به ترتیب ۶۹/۴۵ و ۶۳/۸۹ بود. در آزمون تیمار ریشه گیاهچه که ریشه نشاگیاهچه‌ها با سوسپانسیون تریانوم-پی تیمار شده بودند در حضور نژادهای ۱ و ۱,۲ بیمارگر ۷۲/۲۳ و ۶۶/۶۷ درصد از گیاهان بدون آلودگی باقی ماندند. در این مطالعه،

اثرات پیوند یک رقم محلی خربزه بر روی کدوی تجاری T-101، در گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. پس از کشت پایه و پیوندک در گلدان‌های محتوی خاک آلوده شده، پیوند به صورت حفره‌ای رأسی انجام شد. مشخص شد که پایه کدو، نسبت به این بیماری مقاوم است و پیوند ارقام محلی خربزه بر روی پایه‌های کدو می‌تواند برای کنترل پژمردگی فوزاریومی مورد استفاده قرار گیرد.

کلمات کلیدی: گروه‌های سازگاری رویشی، تریانوم-پی، پیوند، پژمردگی فوزاریومی، خربزه

فهرست مطالب

۱- مقدمه ۲
۲- بررسی منابع ۱۱
۲-۱- تاریخچه و اهمیت خربزه ۱۱
۲-۲- وضعیت تولید در ایران ۱۱
۲-۳- اکولوژی و مشخصات کشاورزی ۱۲
۲-۴- بیماری‌های خربزه ۱۲
۲-۴-۱- تاریخچه و اهمیت بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه ۱۳
۲-۴-۲- جایگاه تاکسونومیکی قارچ عامل بیماری ۱۳
۲-۴-۳- مشخصات قارچ شناسی ۱۴
۲-۴-۴- علائم بیماری ۱۴
۲-۴-۵- اپیدمیولوژی و زیست شناسی ۱۵
۲-۴-۶- عوامل محیطی و بیولوژی ۱۶
۲-۴-۷- مدیریت بیماری ۱۷
۲-۴-۷-۱- کنترل بیولوژیک ۱۷
۲-۴-۷-۲- پیوند ۱۹
۲-۵- گروه‌های سازگاری رویشی در *Fusarium oxysporum* ۲۱
۲-۶- نژادهای Fom ۲۲
۳- مواد و روش‌ها ۲۵
۳-۱- جمع‌آوری نمونه ۲۵
۳-۲- جدا سازی، خالص سازی و شناسایی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* ۲۸
۳-۲-۱- محیط کشت‌های مورد استفاده ۲۸
۳-۲-۱-۱- محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار ۲۸
۳-۲-۱-۲- محیط کشت آب-آگار ۲۸
۳-۲-۱-۳- محیط کشت برگ میخک و آگار ۲۸
۳-۲-۲- جدا سازی قارچ عامل بیماری ۲۹
۳-۲-۳- خالص سازی قارچ عامل بیماری ۳۰
۳-۲-۴- نگهداری قارچ عامل بیماری ۳۰
۳-۲-۴-۱- نگهداری جدایه‌ها در لوله‌های حاوی مخلوط ماسه، پرلیت و کلش ۳۰
۳-۲-۴-۲- نگهداری جدایه‌ها در لوله‌های حاوی PDA ۳۱
۳-۲-۴-۳- نگهداری جدایه‌های قارچ روی کاغذ صافی سترون ۳۲
۳-۲-۵- شناسایی جدایه‌های *Fusarium oxysporum* قارچ عامل بیماری ۳۳
۳-۳-۱- محیط کشت SNA ۳۴

۳-۳-۲- تهیه مایه تلقیح قارچ ۳۵
۳-۳-۳- تهیه گیاهچه ۳۵
۳-۳-۴- تهیه سوسپانسیون اسپور ۳۵
۳-۳-۵- چگونگی شمارش اسپورها روی لام اسپور شمار ۳۶
۳-۳-۶- مایه زنی ۳۷
۳-۳-۷- جدا سازی مجدد قارچ از گیاهچه‌های بیمار ۳۷
۳-۴- تعیین گروه‌های سازگاری رویشی نژادهای Fom ۳۸
۳-۴-۱- محیط کشت‌های مورد نیاز برای تعیین VCGs ۳۸
۳-۴-۱-۱- محیط کشت پایه ۳۹
۳-۴-۱-۲- محیط کشت حداقل ۴۰
۳-۴-۱-۳- محیط‌های کلرات‌دار ۴۰
۳-۴-۱-۴- محیط‌های نیتروژن‌دار ۴۰
۳-۴-۲- تولید جهش یافتگان nit ۴۰
۳-۴-۳- شناسائی جهش یافتگان nit ۴۱
۳-۴-۴- تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافتگان nit ۴۲
۳-۴-۵- تعیین گروه‌های سازگاری رویشی جهش یافتگان nit ۴۳
۳-۵- تعیین نژادهای جدایه‌های Fom ۴۳
۳-۵-۱- تهیه مایه تلقیح ۴۴
۳-۵-۲- تهیه گیاهچه‌های ارقام افتراقی ۴۴
۳-۵-۳- مایه زنی ۴۴
۳-۶- بررسی اثر ماده بیولوژیک تریانوم-پی در کنترل قارچ عامل بیماری ۴۵
۳-۶-۱- بررسی‌های آزمایشگاهی ۴۵
۳-۶-۱-۱- تعیین غلظت ماده بیولوژیک تریانوم-پی ۴۵
۳-۶-۱-۲- بررسی میکروسکوپی تأثیر ماده بیولوژیک تریانوم پی روی هیف‌های قارچ بیمارگر ۴۶
۳-۶-۱-۳- بررسی رقابت تغذیه‌ای تریانوم-پی در کشت متقابل با قارچ بیمارگر ۴۶
۳-۶-۱-۴- بررسی اثر ترکیبات فرار تریانوم-پی در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر ۴۸
۳-۶-۱-۵- بررسی اثر متابولیت‌های غیر فرار تریانوم-پی، در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر ۵۰
۳-۶-۲- بررسی تأثیر تریانوم-پی روی پژمردگی فوزاریومی خربزه در شرایط گلخانه ۵۱
۳-۶-۲-۱- تهیه مایه تلقیح قارچ عامل بیماری ۵۱
۳-۶-۲-۲- تیمارهای آزمایش ۵۲
۳-۶-۲-۳- ارزیابی تیمارها و تجزیه داده‌ها ۵۳
۳-۶-۲-۴- تعیین جمعیت عامل بیماری در مایه تلقیح ۵۴
۳-۶-۲-۵- آزمون تیمار خاک ۵۴
۳-۶-۲-۶- آزمون تیمار بذر ۵۵

۳-۶-۲-۷- آزمون تیمار ریشه گیاهچه ۵۶
۳-۶-۲-۸- تعیین جمعیت عامل بیماری و آنتاگونیست در خاک ۵۸
۳-۷- بررسی امکان استفاده از پیوند روی پایه‌های مقاوم کدو ۵۹
۳-۷-۱- تهیه مایه تلقیح ۵۹
۳-۷-۲- تهیه گیاهچه‌ها ۶۰
۳-۷-۳- تهیه سوسپانسیون اسپور و مایه زنی گیاهچه‌ها ۶۰
۴- نتایج ۶۶
۴-۱- جدایه‌های قارچ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی ۶۶
۴-۲- شناسایی قارچ عامل بیماری ۶۶
۴-۳- آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های Fo روی گیاهچه‌های خربزه ۶۸
۴-۴- گروه‌های سازگاری رویشی ۷۱
۴-۴-۱- جدا سازی جهش یافتگان ناتوان در استفاده از نیترات ۷۱
۴-۴-۲- تعیین فنوتیپ و فراوانی نسبی انواع جهش یافتگان nit ۷۴
۴-۴-۳- تعیین گروه‌های سازگاری رویشی جدایه‌های Fom ۷۷
۴-۵- تعیین نژادهای Fom با استفاده از ارقام افتراقی در شرایط گلخانه ۸۰
۴-۶- تأثیر استفاده از ماده بیولوژیک تریانوم-پی در کنترل قارچ عامل بیماری ۸۴
۴-۶-۱- تأثیر تریانوم پی بر روی نژادهای Fom در شرایط آزمایشگاه ۸۴
۴-۶-۱-۱- تأثیر تریانوم-پی در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر در کشت متقابل ۸۴
۴-۶-۱-۲- بررسی میکروسکوپی تأثیر تریانوم-پی روی هیف‌های قارچ بیمارگر ۸۸
۴-۶-۱-۳- تأثیر ترکیبات غیر فرار تریانوم-پی در جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر ۹۰
۴-۶-۱-۴- تأثیر ترکیبات فرار تریانوم-پی در جلوگیری از رشد پرگنه نژادهای Fom ۹۱
۴-۶-۱-۴-۱- روش پتری‌ها روی هم ۹۱
۴-۶-۱-۴-۲- روش پتری‌های تیغه‌دار ۹۳
۴-۶-۲- تأثیر تریانوم-پی در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه در شرایط گلخانه ۹۵
۴-۶-۲-۱- تأثیر تریانوم-پی در روش تیمار خاک ۹۷
۴-۶-۲-۲- تأثیر تریانوم-پی در روش تیمار بذر ۱۰۰
۴-۶-۲-۳- تأثیر تریانوم-پی در روش تیمار ریشه‌ی گیاهچه ۱۰۳
۴-۶-۲-۴- جمعیت تریانوم-پی در مایه تلقیح و همراه شده با بذر ۱۰۶
۴-۶-۲-۵- جمعیت عامل بیماری در خاک در آزمایش‌های گلخانه‌ای تریانوم-پی ۱۰۶
۴-۷- تأثیر امکان استفاده از پیوند روی پایه‌های مقاوم کدو ۱۰۸
۵- بحث ۱۱۴
منابع و مآخذ ۱۱۵

فهرست جداول

جدول ۱-۳- مشخصات کامل نمونه‌های جمع‌آوری شده قارچ *Fusarium oxysporum* ۲۵
جدول ۴-۳- الگوی اصلاح شده چندرا و همکاران ۳۸
جدول ۲-۳- تعیین کلاس‌های فنوتیپی جهش یافتگان nit ۴۲
جدول ۳-۳- عکس‌العمل ارقام افتراقی خربزه در برابر نژادهای مختلف Fom ۴۴
جدول ۴-۳- الگوی اصلاح شده چندرا و همکاران ۵۷
جدول ۱-۴- راندمان بازیابی جهش یافتگان nit ۷۶
جدول ۲-۴- مشخصات کلاس فنوتیپی و VCG جدایه‌ها ۷۹
جدول ۳-۴- عکس‌العمل ارقام افتراقی خربزه در برابر نژادهای مختلف Fom در شرایط گلخانه ۸۲
جدول ۴-۴- تعیین نژادهای جدایه‌های مختلف Fom ۸۲
جدول ۵-۴- تجزیه واریانس مربوط به تأثیر تریانوم-پی در روش کشت متقابل ۸۵
جدول ۶-۴- درصد بازداری از رشد میسلیوم نژادهای Fom توسط تریانوم-پی در روش کشت متقابل ۸۵
جدول ۷-۴- تأثیر تریانوم-پی روی کاهش رشد جدایه‌های Fom در روش سلوفان ۹۰
جدول ۸-۴- درصد بازداری از رشد میسلیوم نژادهای Fom در بررسی اثر ترکیبات غیر فرار تریانوم-پی ۹۱
جدول ۹-۴- تأثیر تریانوم-پی روی کاهش رشد جدایه‌های Fom در روش پتری‌ها روی هم ۹۲
جدول ۱۰-۴- تأثیر متابولیت‌های فرار تریانوم-پی در روش پتری‌ها روی هم ۹۲
جدول ۱۱-۴- تأثیر متابولیت‌های فرار تریانوم-پی در روش پتری‌های تیغه‌دار ۹۳
جدول ۱۲-۴- تأثیر متابولیت‌های فرار تریانوم-پی در روش پتری‌های تیغه‌دار ۹۴
جدول ۱۳-۴- تأثیر تریانوم-پی در تیمار افزودن به خاک ۹۸
جدول ۱۴-۴- تأثیر تریانوم-پی در تیمار بذر ۱۰۱
جدول ۱۵-۴- تأثیر ماده بیولوژیک تریانوم-پی در تیمار ریشه‌ی گیاهچه ۱۰۴
جدول ۱۶-۴- جمعیت آنتاگونیست و عامل بیماری موجود در ۱ گرم خاک در روش تیمار خاک ۱۰۶
جدول ۱۷-۴- جمعیت آنتاگونیست و عامل بیماری موجود در ۱ گرم خاک در روش تیمار بذر ۱۰۷
جدول ۱۸-۴- جمعیت آنتاگونیست و عامل بیماری موجود در ۱ گرم خاک در روش تیمار ریشه‌ی گیاهچه ۱۰۷
جدول ۱۹-۴- تأثیر پیوند در کنترل بیمارگر در تیمار آلوده به نژاد ۱ ..... ۱۰۹
جدول ۲۰-۴- تأثیر پیوند در کنترل بیمارگر در تیمار آلوده به نژاد ۱,۲ ..... ۱۰۹
جدول ۱-۵- نحوه تشخیص فنوتیپ جهش یافتگان nit در جنس *Fusarium* ۱۱۶

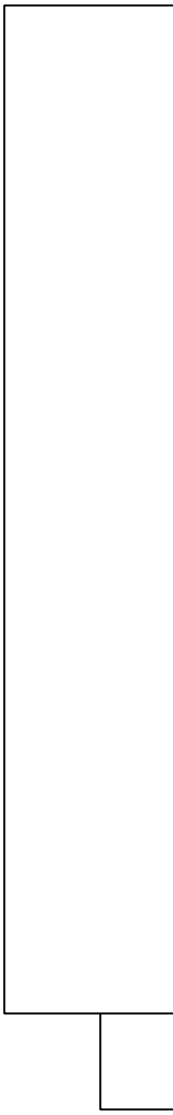
فهرست نمودار

نمودار ۱-۴- راندمان بازیابی جهش یافتگان nit به صورت تعداد و درصد جهش روی هر دو محیط کلرات‌دار ۷۷
نمودار ۲-۴- مقایسه چهار روش بررسی مکانیسم‌های بازدارندگی تریانوم-پی از رشد کلونی بیمارگر..... ۸۴
نمودار۳-۴- درصد بازداری از رشد میسلیوم نژادهای Fom توسط تریانوم-پی در روش کشت متقابل..... ۸۵
نمودار۴-۴- مقایسه درصد بازداری از رشد سه جدایه Fom در مقایسه با شاهد در روش سلوفان ۹۰
نمودار ۵-۴- مقایسه تأثیر متابولیت‌های فرار تریانوم-پی در روش پتری‌ها روی هم..... ۹۲
نمودار ۶-۴- مقایسه تأثیر متابولیت‌های فرار تریانوم-پی در روش پتری‌های تیغه‌دار ۹۴
نمودار ۷-۴- مقایسه میزان بیماری‌زایی در سه روش تیمار خاک، تیمار بذر، تیمار ریشه گیاهچه ۹۶
نمودار ۸-۴- تأثیر تریانوم-پی در تیمار افزودن به خاک..... ۹۹
نمودار ۹-۴- تأثیر تریانوم-پی در تیمار بذر..... ۱۰۱
نمودار ۱۰-۴- تأثیر ماده بیولوژیک تریانوم-پی در تیمار ریشه‌ی گیاهچه..... ۱۰۴
نمودار ۱۱-۴- تأثیر پیوند در کنترل افزایش شاخص‌های رشدی در تیمار آلوده به Race-1 ..... ۱۱۰
نمودار ۱۲-۴- تأثیر پیوند در کنترل افزایش شاخص‌های رشدی در در تیمار آلوده به Race-1,2..... ۱۱۰

فهرست شکل‌ها

شکل ۱-۳- کشت قارچ روی محیط برگ میخک و آگار ۲۹
شکل ۲-۳- قرار دادن کاغذ صافی‌های سترون درون تشتک‌های پتری حاوی محیط PDA و Fom ۳۲
شکل ۳-۳- نگهداری جدایه‌های Fom درون میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری درب‌دار ۳۳
شکل ۴-۳- کشت قارچ در لوله‌های حاوی محیط کشت SNA ۳۵
شکل ۵-۳- محلول عناصر کم مصرف ۳۹
شکل ۶-۳- نحوه قرار گیری قرص‌های میسلیومی روی محیط غذایی حاوی کلرات ۴۱
شکل ۷-۳- نحوه کشت متقابل Trianum-p و بیمارگر Fom روی محیط PDA ۴۷
شکل ۸-۳- نحوه کشت Trianum-p به روش پتری‌ها روی هم به منظور بررسی تولید ترکیبات فرار ۴۹
شکل ۹-۳- نحوه کشت Trianum-p در روش پتری‌های تیغه‌دار به منظور بررسی ترکیبات فرار ۴۹
شکل ۱۰-۳- نحوه کشت Trianum-p روی کاغذ سلوفان به منظور بررسی تولید ترکیبات غیر فرار ۵۱
شکل ۱۱-۳- تهیه مایه تلقیح نژادهای ۱ و ۱,۲ Fom روی گندم ۵۲
شکل ۱۲-۳- ظهور پرگنه‌های ایجاد شده از ۱ گرم مایه تلقیح روی محیط PDA برای تعیین CFU اینوکلوم ۵۴
شکل ۱۳-۳- نحوه قرار دادن ریشه‌ی گیاهچه‌ها در سوسپانسیون تریانوم-پی ۵۶
شکل ۱۴-۳- بررسی اثر تریانوم-پی در کنترل بیولوژیک بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه در شرایط گلخانه ۵۷
شکل ۱۵-۳- ظهور پرگنه‌ها بر روی محیط WA برای تعیین CFU ۵۸
شکل ۱۶-۳- گیاهچه کدو و خربزه کشت شده در پرلیت ۶۰
شکل ۱۷-۳- نحوه آغشته سازی ریشه گیاهچه خربزه و کدو به سوسپانسیون اسپور بیمارگر Fom ۶۱
شکل ۱۸-۳- انتخاب جوانترین برگ انتهایی همراه با جوانه کوچک برای انجام پیوند ۶۲
شکل ۱۹-۳- مراحل انجام پیوند پیوندک خربزه روی پایه مقاوم کدو ۶۳
شکل ۱-۴- مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی پرگنه قارچ Fom روی محیط کشت PDA ۶۷
شکل ۲-۴- نمای میکروسکوپی اندام‌های زایشی قارچ Fo ۶۸
شکل ۳-۴- علائم آلودگی روی گیاهچه خربزه مایه زنی شده با قارچ Fom ۷۰
شکل ۴-۴- علائم آلودگی روی ریشه گیاهچه خربزه مایه زنی شده با قارچ Fom ۷۰
شکل ۵-۴- تشکیل قطاع‌های مقاوم به کلرات ۷۲
شکل ۶-۴- شناسایی جهش یافتگان nit جدایه‌های *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* ۷۴
شکل ۷-۴- تعیین کلاس فنوتیپی جهش یافتگان nit بر اساس مورفولوژی پرگنه ۷۶
شکل ۸-۴- بروز سازگاری رویشی و تشکیل هتروکاریون پایدار ۷۸
شکل ۹-۴- عکس‌العمل ارقام افتراقی خربزه در برابر نژادهای مختلف *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* ۸۳
شکل ۱۰-۴- بررسی رقابت تغذیه‌ای تریانوم-پی ۸۶
شکل ۱۱-۴- مقایسه رقابت تغذی‌های و کلونیزاسیون تریانوم-پی ۸۷
شکل ۱۲-۴- نمای میکروسکوپی ریسه‌های تریانوم-پی ۸۹
شکل ۱۳-۴- بررسی ترکیبات غیر فرار تریانوم- به روش سلوفان ۹۱

شکل ۴-۱۴- تأثیر متابولیت‌های فرار تریانوم-پی به روش پتری‌ها روی هم ۹۳
شکل ۴-۱۵- تأثیر متابولیت‌های فرار تریانوم-پی در روش پتریهای تیغه‌دار ۹۵
شکل ۴-۱۶- تأثیر ماده بیولوژیک تریانوم-پی در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه در شرایط گلخانه ۹۷
شکل ۴-۱۷- تأثیر تریانوم-پی در کاهش بیماری و افزایش شاخص‌های رشدی در روش تیمار افزودن به خاک ۹۹
شکل ۴-۱۸- تأثیر تریانوم-پی در کاهش بیماری و افزایش شاخص‌های رشدی در روش آغشته سازی بذر ۱۰۲
شکل ۴-۱۹- تأثیر تریانوم-پی در کاهش بیماری و افزایش شاخص‌های رشدی در آزمون تیمار ریشه گیاهچه ۱۰۵
شکل ۴-۲۰- بررسی اثر کنترلی نژادهای *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* روی پیوندهای سازگار ۱۱۱
شکل ۴-۲۱- مقایسه ریشه و اندام‌های هوایی خربزه پیوندی و غیر پیوندی ۱۱۲
شکل۵-۱- مسیر استفاده از نیترات در *Aspergilus nidulans* و *Neorospora crassa*..... ۱۱۷
شکل ۵-۲- نمایش شماتیک سازگاری و ناسازگاری رویشی بین هیف‌های دو فرد قارچی..... ۱۱۹



۱- مقدمه

خربزه یکی از محصولات مهم جالیزی در ایران می‌باشد. بیماری‌های زیادی باعث کاهش محصول یا از بین رفتن این گیاه می‌شوند. یکی از بیماری‌های مهم این محصول، بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه می‌باشد که عامل آن *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* (Fom) می‌باشد. عامل بیماری به خربزه، طالبی، گرمک، خیار چنبر و دستنبو خسارت می‌زند و در سایر کدوئیان بیماری‌زا نیست (Jacobson and Gordon, 1990).

اگر چه این بیمارگر در مناطق مختلف ایران گزارش شده، اما اطلاعات کافی از آن در ایران وجود ندارد. روش‌های مختلف مبارزه اعم از شیمیایی، بیولوژیکی و زراعی برای کاهش خسارت این بیمارگر به کار گرفته شده‌اند، هر چند این روش‌ها در بسیاری از موارد کارایی لازم را در کنترل بیماری در شرایط ایران نشان نداده‌اند (بنی‌هاشمی، ۱۳۸۹).

شناسایی گروه‌های سازگاری رویشی[1]

سازگاری رویشی عبارت از توانائی دو هیف از دو فرد قارچی در انجام آناستوموز و امتزاج هیفی و تشکیل یک هتروکاریون پایدار می‌باشد. بنابراین، به جدایه‌هایی که توانائی تشکیل هتروکاریون پایدار را دارا می‌باشند سازگار رویشی[2] اطلاق شده و در یک گروه سازگاری رویشی قرار می‌گیرند. در حالیکه جدایه‌هایی که قادر به تشکیل هتروکاریون پایدار نباشند، ناسازگار رویشی تلقی گردیده و در گروه‌های سازگاری رویشی متفاوتی قرار می‌گیرند (Leslie and Summerell, 2006).

[1]- Vegetative Compatibility Groups (VCGs)
[2]- Vegetative compatible

فنوتیپ سازگاری رویشی اساس چند ژنی داشته و قادر است به عنوان وسیله‌ی شناسایی یک مجموعه از جدایه‌هایی که در همه آلل‌های آن مکان‌های ژنی اشتراک دارند، مورد استفاده قرار گیرد. راهکار موجود برای شناسایی VCGs بر اساس تولید جهش یافتگان nit[1] که قادر به مصرف ازت به فرم NO_3 نیستند به صورت میسلیوم‌های رشد یافته[2] مقاوم به کلرات[3] و سپس تفکیک آن‌ها به واسطه رشد روی محیط‌های غذایی محتوی منابع مختلف نیتروژن می‌باشد. جهش یافتگان nit و نوع آن‌ها (nit 3, nit 1 یا Nit M) با نحوه رشد روی محیط‌های غذایی مناسب (معمولاً MM[4] حاوی منابع مختلف ازت) شناسایی می‌گردند (Leslie and Summerell, 2006).

سازگاری رویشی به طرق مختلفی قابل شناسایی می‌باشد. در گونه‌های جنس *Fusarium* این فرآیند به واسطه توانایی جدایه‌های اکسوتروف[5] (فاقد توانایی مصرف نیترات) در تشکیل یک هتروکاریون پروتوتروف[6] (دارای توانایی مصرف نیترات) سنجیده می‌شود (Correll *et al*., 1987). در این نوع واکنش متقابل، تشکیل هتروکاریون دلالت بر سازگاری رویشی داشته و جدایه‌هایی که تشکیل هتروکاریون پروتوتروف نمی‌دهند، ممکن است به خاطر ناسازگاری رویشی و یا ناتوانی فیزیکی در یک یا هر دو جدایه تلاقی کننده باشد (Correll *et al*., 1987).

ارتباطات بین VCG و ویژگی‌هایی مانند درجه بیماری‌زایی (در صورت وجود) ابزار مناسبی جهت شناسایی می‌باشند (Leslie, 1993). یکی از قارچ‌هایی که گروه‌های سازگاری رویشی آن در سطح وسیعی بررسی شده است قارچ فوزاریوم و به خصوص گونه *Fusarium oxysporum* Schelecht. fr. می‌باشد. این گونه یک بیمارگر گیاهی خاکزاد با سطح انتشار وسیع است. در این گونه سطح بالایی

[1] - Nitrate non-utilizing mutants (nit)
[2]- Sectors
[3]- ClO_3
[4] - Minimal Medium = MM
[5]- Auxotroph
[6]- Prototroph

از تخصص میزبانی وجود دارد به گونه‌ای که بیش از ۱۲۰ فرم تخصص یافته و نژاد در این گونه شناخته شده است (Armstrong and Armstrong, 1981). فرم‌های اختصاصی این قارچ نیز از لحاظ مورفولوژیکی از یکدیگر قابل تمایز نیستند و بر اساس فاکتورهای بیماری‌زایی تمییز داده شده‌اند. تفکیک و شناسایی فرم‌های اختصاصی و نیز بررسی تنوع نژادهای درون یک فرم اختصاصی، صرفاً بر اساس آزمایش‌های بیماری‌زایی خالی از اشکال نیست. این آزمایش‌ها اغلب تحت تأثیر متغیرهای محیطی مثل دما، سن میزبان، روش مایه زنی و دامنه میزبانی قرار می‌گیرند (Leslie, 1993). بنابراین برای شناسایی دقیق، محققان از نشانگرهای مولکولی و ژنتیکی و تجزیه آیزوزایمی استفاده کردند (Bosland and Williams, 1987).

جهش یافته‌های nit

مزیت این جهش یافتگان در وقوع خود به خودی[1] و فراوان آن‌ها در طبیعت است و به راحتی می‌توان آن‌ها را از روی محیط حاوی کلرات به دست آورد (Klittich and Leslie, 1988). یکی از نشانگرهای ژنتیکی که می‌تواند دچار نقص شود و با تکمیل شدن بهبود می‌یابد، مسیر مصرف نیترات در قارچ‌هاست. بیشتر قارچ‌ها می‌توانند با تبدیل نیترات به نیتریت و در نهایت آمونیوم، از آن به عنوان منبع ازت استفاده نمایند. مسیر احیاء نیترات به آمونیوم شامل فعالیت دو آنزیم احیاء کننده نیترات[2] و احیاء کننده نیتریت[3] است. آنزیم احیاء کننده نیترات، آنزیمی است که واکنش انتقال الکترون از NADPH[4] به نیترات را کاتالیز می‌کند و دارای عنصر مولیبدن و آهن به عنوان کوفاکتور است (Garraway and Evans, 1984). جهش یافتگان nit در محیط حاوی کلرات تولید می‌شوند. کلرات به عنوان مشابه نیترات عمل کرده و به وسیله آنزیم احیاء کننده نیترات به ماده سمی کلریت تبدیل می

[1]- Spontaneously
[2]- Nitrat reductase
[3]- Nitrit reductase
[4] -Nicotinamid Adenin Dinucleotide Phosphate

شود که برای قارچها سمی است (Cove, 1976). بنابراین، جهش یافتگان مقاوم بـه کلـرات کـه دارای نقص ژنتیکی در زمینه سنتز آنزیم احیاء کننده نیترات هستند به دست می‌آیند کـه در محـیط غـذایی حاوی کلرات قادر به رشد هستند. این جهش یافتگان به صورت ماکروسکوپی در قالب هیف‌های سریع الرشد از روی محیط کلرات‌دار قابل جداسازی می‌باشند. جهـت شناسـایی ایـن دسـته از سـایر جهـش یافتگان، قارچ رشد یافته را به محیط حداقل که دارای نیترات به عنوان تنها منبع نیتروژن است، انتقال می‌دهیم که در این محیط رشدی ضعیف، گسترده و تقریباً بدون میسلیوم هوایی و اسپورزایی از خـود نشان می‌دهد. این رشد ضعیف به دلیل عدم توانایی جهش یافته nit در مصرف نیترات به عنـوان تنهـا منبع نیتروژن محیط است (Correll *et al*., 1987).

کلاس فنوتیپی جهش یافتگان nit

جهش یافتگان nit در جنس *Fusarium* و در بسیاری از قارچهای دیگر بر اساس تعداد و نـوع ژن‌گاه‌های جهش یافته به سه گروه فنوتیپی مشخص تقسیم می‌شوند. در گروه اول یک جهش در ژن-گاه ساختمانی آنزیم احیاء کننده نیتـرات (nit 1)، در گـروه دوم یـک جهـش در ژن‌گـاه اختصاصـی-تنظیمی مسیر مصرف نیترات (nit 3) و در گروه سوم حداقل یک جهش در یکی از پنج ژن‌گاه مؤثر در ساخت کوفاکتور دارای مولیبدن که لازمه فعالیت آنزیم احیاء کننـده نیتـرات اسـت (Nit M) صـورت گرفته است (Correll *et al*., 1987). جهش در ژن ساختاری آنزیم احیاء کننده نیترات تغییرات کیفی آنزیم را موجب شده و جهش در ژن تنظیمی، در کمیت آنزیم مداخله می‌کند. در برخـی از جدایـه‌هـا چندین سکتور مقاوم به کلرات ولی دارای رشد تیپ وحشی روی محیط حداقل به دست می‌آید. به این دسته از جهش یافتگان که مقاوم به کلرات و قادر به مصرف نیترات هستند، جهش یافتگان crn اطـلاق می‌گردد (Correll *et al*., 1987). باید اشاره کرد که ژن‌گاه‌های nit شناسایی شـده بـرای *Fusarium moniliforme* در تعـداد و فنوتیـپ بـا ژن‌هـای تشـخیص داده شـده در *Asperjillus nidulans*

و *Neurospora Crassa* مشابه هستند (Klittich and Leslie, 1988).

هتروکاریون‌های پایدار

جهش یافتگان یک جدایه که از دو فنوتیپ مختلف باشند، در صورتی که در مقابل یکدیگر روی محیط غذایی حاوی نیترات کشت شوند، در نتیجه تشکیل هتروکاریون قادر به تکمیل ژنتیکی یکدیگر هستند. رشد میسلیوم‌ها در محل تماس دو جهش یافته رشد تیپ وحشی را نشان می‌دهد. زمانی که جهش یافتگان nit مکمل از دو جدایه مختلف یک قارچ در کنار یکدیگر قرار می‌گیرند اگر رشد قوی و متراکم در محل برخورد دو کلنی مشاهده شود، دو جدایه از یک گروه سازگاری رویشی هستند و در غیر این صورت از دو گروه سازگاری رویشی مختلف می‌باشند (Correll *et al*., 1987).

مدیریت پژمردگی فوزاریومی خربزه

گیاهان جالیزی، مخصوصاً طالبی و خربزه نقش مهمی در زراعت صیفی کشور و درآمد ملی دارند (Poostchi, 1972). گیاه خربزه دارای آفات و بیماری‌های فراوانی است و در صورت عدم کنترل آن‌ها، بازده محصول کم می‌شود و یا گیاه به کلی از بین می‌رود. یکی از بیماری‌های مهم این محصول، بیماری پژمردگی فوزاریومی می‌باشد. همه ساله حجم زیادی از سموم شیمیایی برای کنترل این بیمارگر مورد استفاده قرار می‌گیرد که علاوه بر آثار منفی زیست محیطی و تأثیر نامطلوب بر سلامت انسان، تأثیر رضایت‌مندی در کنترل بیمارگر هم ندارند. ارقام مقاوم تجاری نیز در حال حاضر در ایران موجود نبوده و جالیزکاران از ژنوتیپ‌های بومی همان منطقه استفاده می‌کنند (علوی و آهون‌منش، ۱۳۷۶).

پوسیدگی و پژمردگی گیاهان اغلب به دلیل عوامل بیماری‌زای خاکزی می‌باشد که گیاهان را از طریق ریشه آلوده می‌کنند. تقویت کننده‌های گیاهی مانند تریانوم-پی و جی[1] خطر آلودگی به این

[1] -Trianum-p, Trianum-g