بسم الله الرحمن الرحیم
بهار

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

دانشکده کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد مهندسی کشاورزی

رشته‌ی بیماری شناسی گیاهی

عنوان پایان‌نامه

بوته‌میری خیار: شناسایی، ردیابی مولکولی عامل بیماری و کنترل بیماری با استفاده از روش پیوند

استاد راهنما:

دکتر حسین علایی

استاد مشاور:

دکتر حمیدرضا کریمی

دانشجو:

فاطمه رستمی سعدآبادی

مهر۱۳۹۰

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

دانشکده‌ی کشاورزی

گروه گیاه پزشکی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد مهندسی کشاورزی

رشته‌ی بیماری شناسی گیاهی

خانم فاطمه رستمی با عنوان

بوته‌میری خیار: شناسایی، ردیابی مولکولی عامل بیماری و کنترل بیماری با استفاده از تکنیک پیوند

در تاریخ ۱۳۹۰/۰۷/۲۰ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی... به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه آقای دکتر حسین علایی با مرتبه ی علمی استادیار امضاء

۲- استاد مشاور پایان‌نامه آقای دکتر حمید رضا کریمی با مرتبه ی علمی استادیار امضاء

۳- داور داخل گروه آقای دکتر روح الله صابری با مرتبه ی علمی استادیار امضاء

۴- داور خارج از گروه آقای دکتر محمد جوان نیکخواه با مرتبه ی علمی دانشیار امضاء

۵ – نماینده‌ی تحصیلات تکمیلی، آقای دکتر مجید اسماعیلی زاده با مرتبه ی علمی استادیار امضاء

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های ناشی از تحقیق موضوع این پایان‌نامه متعلق به دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان است.

مخففها

AFLP	amplified fragment length polymorphism
ANOVA	analysis of variance
bp	base pair
C	cytosine
CMA	corn meal agar
CMB	corn meal broth
dATP	deoxyadenosine triphosphate
dCTP	deoxycytidinen triphosphate
dGTP	deoxyquanosine triphosphate
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate
DNA	deoxyribonucleic acid
dTTP	deoxythymidine triphosphate
dpi	day post inoculation
EDTA	ethylene diamine tetra acetic acid
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FAO	food and agriculture organization
G	guanine
IGS	intergenic spacer
LBB	lima bean broth
PCR	polymerase chain reaction
RAPD	random amplified polymorphic DNA
rDNA	ribosomal DNA
rDNA ITS	ribosomal DNA internl transcribed spacer
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal RNA
RNase	ribonuclease
SDS	sodium dodecyl sulfate
SPSS	statistical product and service solutions
USDA	united state department of agriculture
UV	ultraviolet
WA	water agar

چکیده

بوته‌میری خیار ناشی از بیمارگر *Pythium aphanidermatum* مهم‌ترین عامل پوسیدگی ریشه و طوقه، از جمله عوامل محدود کننده کشت خیار در گلخانه می‌باشد. در این مطالعه شناسایی بیمارگر براساس ویژگی‌های ظاهری پرگنه و روش مولکولی (تعیین توالی ناحیه rDNA-ITS) انجام شد. جستجوی تشابه با GenBank-BLAST با استفاده از این توالی‌ها نشان داد که *P. aphanidermatum* ثبت شده در بانک ژن شبیه‌ترین توالی (بیش از ۹۹ درصد تشابه) به جدایه جداسازی شده از بافت آلوده می‌باشد. روش‌های مختلف مایه‌زنی قارچ بیمارگر به‌منظور ایجاد آلودگی گیاهچه خیار بررسی و براساس شدت آلودگی گیاهچه‌ها ارزیابی شدند. نتایج بررسی روش‌های مایه-زنی نشان داد که استفاده از بذرهای شاهدانه آلوده شده در سوسپانسیون زئوسپور و یا روی میسیلیوم بالاترین درصد آلودگی را در کوتاه‌ترین زمان ایجاد می‌کند. واکنش خیار (*Cucumis sativus*) نسبت به *P. aphanidermatum* با روش پیوند روی پایه‌های کدو خورشی (*Cucurbita pepo*) و تنبل (*Cucurbita maxima*) بر اساس بقا، رشد و باردهی مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج به‌دست آمده پایه کدو تنبل مقاومت بسیار بالایی نسبت به بیمارگر دارد، به‌طوری‌که بعد از ۳۰ روز از مایه‌زنی هیچ علائمی روی گیاهچه‌ها مشاهده نشد. پایه کدو خورشی در پیوند با خیار ناسازگاری نشان داد و از مقاومت کمی برخوردار بود. واکنش ۱۰ رقم تجاری خیار در شرایط گلخانه بر اساس شدت آلودگی گیاهچه‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین رقم‌ها، تفاوت معنی‌داری (P=۰/۰۰۰۱) وجود دارد. رقم‌های کاسپین ۳۴۰ و استورم ۵۹۱۰ با شدت آلودگی ۱۵/۷ و ۷۴/۱ درصد به ترتیب بیشترین و کمترین مقاومت را نسبت به بیمارگر نشان دادند. شناسایی و ردیابی مولکولی *P. aphanidermatum* از بافت، خاک و آب آلوده بر اساس تکثیر قطعه‌ی اختصاصی از ناحیه rDNA-ITS با طراحی آغازگرهای اختصاصی PaphR55/PaphF54 و PaphF54/ITS2 انجام گرفت. اختصاصیت و حساسیت آغازگرها بررسی شد. بر اساس نتایج به‌دست آمده جفت آغازگر PaphF54/ITS2 و PaphF54/PaphR55 برای ردیابی بیمارگر *P. aphanidermatum* بسیار اختصاصی عمل نمود و به ترتیب قادر به تکثیر قطعه ۲۰۰ و ۷۰۰ جفت بازی می-باشند. از طرف دیگر جفت آغازگر PaphF54/ PaphR55، در PCR معمولی ۲pg و جفت آغازگر PaphF54/ITS2 در PCR معمولی ۲۰fg و در PCR آشیانه‌ای ۲۰۰ag از DNA خالص بیمارگر را ردیابی نمود. به کمک این آغازگرها، ردیابی بیمارگر از بافت آلوده پس از سه روز مایه‌زنی مصنوعی *P. aphanidermatum* به گیاهچه‌های خیار امکان-پذیر است. نتایج این مطالعه نشان داد که اولاً پیوند خیار روی پایه‌های مقاوم کدو و استفاده از رقم کاسپین ۳۴۰ می‌تواند به عنوان بخشی از استراتژی کنترل این بیماری در گلخانه مورد استفاده قرار گیرد. ثانیاً استفاده از آغازگرهای طراحی شده زمینه‌ی ردیابی *P. aphanidermatum* از بافت ، خاک و آب آلوده را فراهم می‌نماید.

کلمات کلیدی: پیوند، خیار، کدو، مایه‌زنی، واکنش.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه..... ۱

فصل دوم: مروری بر تحقیقات انجام شده..... ۴

۲-۱ - خیار..... ۴

۲-۱-۱- گیاه‌شناسی خیار..... ۴

۲-۱-۲- ارزش غذایی میوه خیار..... ۵

۲-۱-۳- شرایط محیطی مناسب رشد خیار..... ۵

۲-۱-۴- تولید و اهمیت اقتصادی خیار در ایران و جهان..... ۶

۲-۱-۵- اهمیت و پراکنش آفات و عوامل بیماری‌زای خیار..... ۷

۲-۲- بیماری بوته‌میری جالیز..... ۹

۲-۲-۱- گسترش و اهمیت اقتصادی بیماری بوته‌میری جالیز در ایران..... ۹

۲-۲-۲- عامل بیماری بوته‌میری جالیز..... ۱۰

۲-۲-۳- نشانه‌های بیماری بوته‌میری جالیز..... ۱۱

۲-۲-۴- بوته‌میری خیار ناشی از بیمارگر *Pythium*..... ۱۲

۲-۲-۴-۱- اوومیست‌ها..... ۱۲

۲-۲-۴-۲- طبقه‌بندی شبه قارچ پی‌تیوم..... ۱۳

۲-۲-۴-۳- نحوه‌ی ایجاد بیماری بوته‌میری توسط پی‌تیوم..... ۱۴

۲-۲-۴-۴- چرخه زندگی *Pythium*..... ۱۶

۲-۲-۵- روش‌های کنترل بیماری..... ۱۷

۲-۲-۵-۱- کنترل زراعی..... ۱۷

۲-۲-۵-۲- کنترل فیزیکی..... ۱۸

۲-۲-۵-۳- کنترل شیمیایی..... ۱۸

۲-۲-۵-۴- کنترل بیولوژیکی..... ۱۹

۲-۲-۵-۵- میزبان‌های مقاوم..... ۱۹

۲-۲-۵-۶- مقاومت ژنتیکی..... ۲۰

۲-۳- روش‌های شناسایی و تشخیص قارچ‌های بیماری‌زای گیاه ۲۲
۲-۳-۱- روش‌های شناسایی مورفولوژی ۲۲
۲-۳-۲- روش‌های شناسایی سرولوژی ۲۳
۲-۳-۳- روش‌های شناسایی بیوشیمیایی ۲۳
۲-۳-۴- روش‌های مولکولی بر پایه اسید نوکلئیک ۲۴
۲-۳-۴-۱- DNA ریبوزومی ۲۵
۲-۳-۴-۲- ردیابی مولکولی شبه قارچ پی‌تیوم ۲۶
۲-۳-۴-۳- کلیات PCR ۲۶
۲-۳-۴-۴- طراحی آغازگر ۲۸
۲-۳-۴-۵- PCR آشیانه‌ای ۲۹
فصل سوم: مواد و روش‌ها ۳۰
۳-۱- نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌ها ۳۰
۳-۲- خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها ۳۱
۳-۳- شناسایی بیمارگر بر اساس صفات ریخت‌شناسی ۳۲
۳-۳-۱- بررسی اندام‌های تولید مثل جنسی و غیرجنسی ۳۲
۳-۳-۲- بررسی رشد در دماهای مختلف ۳۳
۳-۴- شناسایی بیمارگر با استفاده از روش‌های مولکولی ۳۳
۳-۴-۱- تهیه توده میسیلیومی ۳۳
۳-۴-۲- استخراج DNA ۳۳
۳-۴-۳- بررسی صحت استخراج DNA ۳۴
۳-۴-۴- واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۳۵
۳-۴-۵- تعیین توالی محصول PCR ۳۵
۳-۵- اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها ۳۶
۳-۶- بررسی روش‌های مایه‌زنی در ایجاد آلودگی گیاهچه‌ها ۳۷
۳-۷- بررسی واکنش رقم‌های تجاری و کنترل بیماری به روش پیوندزنی روی پایه کدو ۳۹
۳-۷-۱- کنترل بیماری بوته‌میری پی‌تیومی خیار به روش پیوندزنی روی پایه کدو. ۳۹

۳-۷-۲- بررسی واکنش رقم‌های تجاری خیار به بیمارگر *Pythium aphanidermatum* ۴۰
۳-۸- ردیابی مولکولی بیمارگر ۴۲
۳-۸-۱- جدایه‌های قارچی و نمونه گیاهی مورد استفاده ۴۲
۳-۸-۲- طراحی آغازگرهای اختصاصی ۴۳
۳-۸-۳- بررسی اختصاصیت آغازگرها ۴۴
۳-۸-۴- بررسی حساسیت ردیابی از بافت گیاه با استفاده از PCR معمولی و PCR آشیانه‌ای ۴۵
۳-۸-۵- ردیابی *P. aphanidermatum* از خاک آلوده ۴۵
۳-۸-۶- ردیابی زئوسپور ۴۶
۳-۸-۷- ردیابی عامل بیماری از بافت گیاه در مراحل مختلف فرایند آلودگی ۴۷
۳-۸-۸- ردیابی بیمارگر بر اساس درصد آلودگی بافت گیاه ۴۸
فصل چهارم: نتایج ۴۹
۴-۱- شناسایی عامل بیماری ۴۹
۴-۱-۱- نمونه‌برداری و جداسازی بیمارگر ۴۹
۴-۱-۲- اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها ۵۰
۴-۱-۳- شناسایی بیمارگر بر اساس صفات ریخت‌شناسی ۵۰
۴-۱-۴- بررسی رشد در دماهای مختلف ۵۱
۴-۱-۵- تعیین توالی و بررسی خصوصیات ناحیه rDNA-ITS ۵۲
۴-۲- کنترل بیماری با استفاده از روش پیوند و رقم‌های مقاوم ۵۴
۴-۲-۱- بررسی روش‌های مایه‌زنی ۵۴
۴-۲-۲- بررسی واکنش پایه‌های کدو پیوند شده با خیار ۵۴
۴-۲-۳- بررسی واکنش رقم‌های تجاری خیار به بیمارگر *Pythium aphanidermatum* ۵۶
۴-۳- ردیابی عامل بیماری ۵۷
۴-۳-۱- طراحی آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی بیمارگر ۵۷
۴-۳-۲- حساسیت و اختصاصیت آغازگرهای اختصاصی در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز ۵۷
۴-۳-۳- ردیابی *P. aphanidermatum* از بافت گیاه ۵۹
۴-۳-۴- ردیابی بیمارگر در مراحل مختلف فرایند آلودگی ۶۰

۴-۳-۵- ردیابی بیمارگر بر اساس درصد آلودگی بافت گیاه..... ۶۱
۴-۳-۶- ردیابی زئوسپور *P. aphanidermatum* ۶۲
۴-۳-۷- ردیابی *P. aphanidermatum* از آب آلوده..... ۶۳
۴-۳-۸- ردیابی *P. aphanidermatum* از خاک آلوده..... ۶۴
فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری..... ۶۵
منابع..... ۷۴

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

شکل ۲-۱- چرخه زندگی *Pythium*..... ۱۷

شکل ۲-۲- دیاگرام شماتیک بخشی از کلاستر ژن rDNA ۲۵

شکل ۲-۳- مراحل واکنش زنجیره‌ای پلیمراز..... ۲۷

شکل ۳-۱-گیاهچه‌های خیار گلخانه‌ای قبل از مایه‌زنی *P. aphanidermatum* در گلخانه..... ۴۱

شکل ۴-۱- علائم بیماری ناشی از *P. aphanidermatum* روی خیار رقم آلفا ۵۰

شکل ۴-۲- ویژگی‌های ریخت‌شناسی گونه *P. aphanidermatunm* به‌دست آمده از خیار..... ۵۱

شکل ۴-۳- الگوی باندهای حاصل از تکثیر *P. aphanidermatum* با استفاده از آغازگرهای ITS6/ITS4..... ۵۲

شکل ۴-۴- نقشه توالی ناحیه rDNA-ITS گونه *P.aphanidermatum*..... ۵۳

شکل ۴-۵- مقایسه شدت بیماری‌زایی بیمارگر در روش‌های مختلف مایه‌زنی..... ۵۴

شکل ۴-۶- نتایج بررسی حساسیت نسبی خیار پیوند شده و پایه‌های کدو به *P. aphanidermatum*..... ۵۵

شکل ۴-۷- بررسی حساسیت آغازگر PaphF54/ITS2 در PCR معمولی و Nested-PCR..... ۵۸

شکل ۴-۸- بررسی حساسیت آغاگرهای PaphF54/ PaphR55 ..... ۵۸

شکل ۴-۹- بررسی اختصاصیت آغازگر PaphF54/ITS2 در PCR معمولی..... ۵۹

شکل ۴-۱۰- بررسی اختصاصیت آغازگر PaphF54/PaphR55 در PCR معمولی..... ۵۹

شکل ۴-۱۱- ردیابی *P. aphanidermatum* در بافت گیاهی آلوده..... ۶۰

شکل ۴-۱۲- ردیابی *P. aphanidermatum* در بافت گیاهی آلوده در مراحل مختلف فرایند آلودگی..... ۶۱

شکل ۴-۱۳- تعیین محدوده‌ی عملی ردیابی گیاه آلوده به *P. aphanidermatum*..... ۶۲

شکل ۴-۱۴- الگوی باندهای حاصل از ردیابی DNA زئوسپور *P. aphanidermatum* ۶۳

شکل ۴-۱۵- الگوی باندهای حاصل از ردیابی DNA *P. aphanidermatum* از آب آلوده..... ۶۳

شکل ۴-۱۶- الگوی باندهای حاصل از ردیابی DNA *P. aphanidermatum* از خاک آلوده..... ۶۴

فهرست جدول‌ها

عنوان صفحه

جدول ۲-۱- برخی عوامل بیماری‌زای مهم خیار..... ۹
جدول ۲-۲- معرفی برخی پایه‌های کدو و اهمیت آن‌ها در کنترل بیماری‌های جالیزی..... ۲۲
جدول ۳-۱- گونه‌های پی‌تیوم استفاده شده برای تعیین اختصاصیت آغازگرهای طراحی شده..... ۳۶
جدول ۳-۲- روش‌های مایه‌زنی جهت اثبات بیماری‌زایی *P. aphanidermatum* روی خیار رقم آلفا..... ۳۸
جدول ۳-۳- درجه بندی واکنش گیاه خیار در مقابل *P. aphanidermatum* و تعیین حساسیت نسبی..... ۴۰
جدول ۳-۴- جدایه‌های گونه‌های بیمارگر گیاهی مورد استفاده در آزمایش ردیابی مولکولی..... ۴۲
جدول ۳-۵- آغازگرهای طراحی شده از ناحیه ITS گونه *Pythium aphanidermatum*..... ۴۳
جدول ۴-۱- منابع و مناطق جداسازی گونه‌های *Pythium aphanidermatum* از گلخانه‌های خیار..... ۴۹
جدول ۴-۲– واکنش پایه و پیوندک خیار (رقم آلفا) و پایه‌های کدو به *P. aphanidermatum*..... ۵۵
جدول ۴-۳- بررسی واکنش رقم‌های تجاری خیار به *P. aphanidermatum*..... ۵۶

فصل اول

مقدمه

در چند دهه‌ی اخیر تمرکز جمعیت در شهرها، بازار مصرف بزرگی را برای محصولات کشاورزی فـراهم کرده است. زمین‌های کشاورزی، تا شعاع زیادی نسبت به این مناطق برای رفع نیازهای غذایی این جمعیت اختصاص یافته است اما با گسترش جمعیت در شهرها به‌تدریج نیاز به روش‌های جدیدی که توانایی تولید بالاتر و برداشت محصول خارج از فصل را داشته باشد، بیشتر آشکار می‌شد. بنابراین به‌تدریج گلخانه‌ها ایـن تحول عظیم را به‌وجود آوردند. گلخانه‌ها با ایجاد شرایط مناسب رشد محصولات، به‌صورت مصنوعی باعـث شدند که محصولات مختلف در تمام فصل‌ها در اختیار مصرف کننده قرار گیرد. امکان پـرورش محصـولات مختلف بدون وجود محدودیت زمانی و رعایت صرفه‌جویی در مصرف نهاده‌هـای کشـاورزی و نیـز افـزایش کمی و کیفی محصولات تولیدی موجب شده که تولید محصولات گلخانه‌ای فعالیتی سودآور باشد. منـاطق عمده کشت گلخانه‌ای کشور، استان‌های کرمان (جیرفت، کهنوج)، اصفهان، تهران و یزد می‌باشند. مجموع سطح زیر کشت محصولات گلخانه‌ای در ایران بیش از ۶۷۰۰ هکتار می‌باشد، که حدود ۳۹۰۰ هکتـار آن-ها اختصاص به کشـت سـبزیجات (خیـار، گوجـه فرنگـی و ...) دارد. در حـال حاضـر بـیش از ۹۰ درصـد سبزیجات گلخانه‌ای خیار می‌باشد.

گونه‌های زیادی از گیاهان تیره کدوئیان (Cucurbitaceae) در تغذیه انسان نقش مهمی دارند. از نظر مواد غذایی مانند چربی و پروتئین، میوه این گیاهان ارزش فراوانی ندارند. ارزش غذایی عمده میوه گیاهان

جالیزی مربوط به انواع قندها و ویتامین‌ها می‌باشد. از طرف دیگر جالیزکاری نقش مهمی در اقتصاد کشاورزی و درآمد ملی کشور ایران دارد.

تولید متراکم سبزیجات درسطح محدود به‌طور ذاتی سبب افزایش بیمارگرهای خاک‌زاد مثل فوزاریوم، ورتیسلیوم، نماتودها و آفات ریشه می‌گردد. بیماری بوته‌میری گیاهان جالیزی به‌عنوان مهم‌ترین عامل پوسیدگی ریشه و طوقه در گلخانه‌های خیار از جمله عوامل محدود کننده کشت محصول می‌باشد، خسارت ناشی از این بیماری تا ۲۵ درصد گزارش شده است (اعتباریان، ۱۳۸۱) از این‌رو کنترل بیماری از اهمیت بسزایی برخوردار است. اگرچه کاربرد قارچ‌کش‌های شیمیایی در برخی موارد بسیار موثر است اما برخی مشکلات از جمله آلودگی محیط زیست در اثر کاربرد فراوان این مواد و همچنین بحث مقاومت میکروارگانیسم‌های مضر به قارچ‌کش‌ها، استفاده از این ترکیبات را محدود کرده است. بنا به دلایل فوق محققان به‌دنبال کاربرد روش‌های کنترلی ایمن و سازگار با محیط زیست می‌باشند از این‌رو روشی مانند استفاده از رقم‌های مقاوم، پیشنهاد شده است. استفاده از روش پیوند از جمله روش‌های موثر برای ایجاد پایه‌های مقاوم یا با حساسیت کم در مقابل بیمارگر می باشد.

با توجه به دامنه وسیع میزبانی جنس پی‌تیوم (*Pythium aphanidermatum*)، ردیابی و شناسایی دقیق عامل بیماری از اهمیت بالایی برخوردار است (Erwin and Riberio, 1996). یک روش ردیابی اختصاصی، حساس و سریع برای تشخیص یک بیماری به‌عنوان یک ابزار مناسب در جهت افزایش اطلاعات در مورد اپیدمیولوژی و بیولوژی قارچ عامل بیماری مفید می‌باشد. در نهایت این ابزار جهت مطالعه مقاومت رقم‌ها، توانایی آلوده نمودن میزبان‌های دیگر و بررسی پراکندگی عامل بیماری می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از روش‌های قدیمی جهت شناسایی عامل شامل محیط کشت انتخابی، روش تله و استفاده از کشت خالص و بررسی‌های مورفولوژی و فیزیولوژی، نیازمند نیروی متخصص با تجربه جهت تشخیص و تعیین گونه بوده و مستلزم صرف زمان و دستیابی به مقدار کافی نمونه می‌باشد. به‌منظور بهبود بخشیدن کارایی و صحت تشخیص بیمارگر استفاده از روش‌های مولکولی مبتنی بر اسید نوکلئیک به‌خصوص واکنش زنجیره‌ای پلیمراز[1] به‌طور گسترده رو به افزایش است (Mumford *et al*., 2006).

ردیابی قارچ‌ها از بافت گیاهی به‌خصوص در مواردی که هنوز نشانه‌های بیماری پدیدار نگشته و سطح آلودگی گیاه یا گسترش عامل بیماری محدود است مشکل می‌باشد. در این موارد نیاز به کاربرد روش‌های خیلی حساس و اختصاصی است تا حضور دیگر قارچ‌ها موجب بروز واکنش غیر اختصاصی نگردد. برای دست یافتن به این مهم، طراحی آغازگری که به‌صورت اختصاصی با قارچ عامل بیماری واکنش دهد از اهمیت بسزایی برخوردار است. از طرفی این آغازگر باید این توانایی را داشته باشد که مقدار کم بیمارگر را نیز در گیاه ردیابی کند (حساسیت) و از طرفی با گونه‌های نزدیک به بیمارگر مورد نظر واکنش ندهد (اختصاصیت).

1- Polymerase chain reaction

اولین هدف این مطالعه، بررسی کنترل بیماری بوته‌میری خیار با استفاده از روش پیوند خیـار بـر روی پایه کدو و بررسی واکنش رقم‌های تجاری خیار گلخانـه‌ای نسـبت بـه قـارچ *P. aphanidermatum* بـود. علاوه بر شناسایی مولکولی عامل بیماری، بهترین روش مایه‌زنی به‌منظور تسهیل در بررسی واکنش خیـار و کدو نسبت به قارچ عامل بیماری مورد بررسی قرار گرفـت. از طـرف دیگـر امکـان ردیـابی مولکـولی عامـل بیمارگر به‌طور مستقیم از بافت خیار، آب و خـاک آلـوده بـا اسـتفاده از روش‌هـای مولکـولی و آغازگرهـای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت.

فصل دوم

۲-۱- خیار

۲-۱-۱- گیاه‌شناسی خیار

خیار با نام علمی *Cucumis sativus* L. از خانواده کدوئیان Cucurbitaceae، راسته violales و رده Magnoliopsida می‌باشد (USDA[1], 2007). واژه خیار ریشه فارسی داشته و از زبان فارسی به زبان عربی وارد شده است. منشا این گیاه در هند، منطقه‌ای بین بنگال (Bay Bangal) و کوه‌های هیمالیا می‌باشد (Peirce, 1987; Smith, 1977). خیار حداقل به مدت سه هزار سال در هندوستان کشت و از هندوستان به چین، روم و یونان قدیم برده شده است. در کتیبه‌های میخی ذکری از خیار نیست ولی به‌طور مسلم خیار در ایران حداقل ۱۰۰۰ سال پیش از میلاد وجود داشته است.

خیار گیاهی یک‌ساله و بومی مناطق گرمسیری است. ریشه‌های این گیاه تا عمق ۱۲۰-۹۰ سانتی‌متر خاک نفوذ می‌کنند. از لحاظ اسیدیته، خیار دارای تحمل متوسط بوده و pH ۶/۸-۵/۵ را

1- United State Department of Agriculture

به‌خوبی تحمل می‌کند (Peirce, 1987). ساقه‌های خیار چهار گوشه بوده و با پرزهای ضخیمی پوشیده شده است و شبیه مو رشد می‌کنند (Mills, 2001).

برگ‌های خیار از نوع ساده و متناوب بوده که به‌وسیله بریدگی‌های کم عمقی به پنج قسمت یا لوب مثلثی تقسیم می‌شود که قسمت وسط دارای نوک تیزی می‌باشد. برگ‌ها در قاعده‌ی محور اصلی ساقه قرار گرفته‌اند و با پرزهای زبری پوشیده شده‌اند.

گل‌ها در خیار از لحاظ جنسیت متفاوت می‌باشد، گل کامل که دارای پرچم و مادگی می‌باشد که البته در خیار نادر است (Mills, 2001)، اما گل نر که فاقد مادگی است و گل ماده که فاقد پرچم است (Smith, 1977)، بسته به نوع رقم خیار و شرایط محیطی بر روی بوته‌ها ظاهر می‌شود (Smith, 1977). همیشه نسبت گل‌های نر به ماده بر روی بوته‌ها بیشتر می‌باشد، معمولاً گل‌های نر قبل از گل‌های ماده بر روی بوته ظاهر می‌شوند. گیاه خیار گیاهی یک پایه است (Wehner, 1997). درخیارهای اصلاح شده و مخصوص کشت در گلخانه، بوته‌های خیار تولید گل‌های ماده می‌نماید و این رقم‌ها به‌نام ماده گل معروف می‌باشند. به‌دلیل ماده گل بودن این رقم‌ها نسبت به انواع یک‌پایه‌ای که دارای گل‌های نر و ماده بر روی یک بوته می‌باشند راندمان در بوته‌ها بسیار بالاتر می‌باشد.

۲-۱-۲- ارزش غذایی میوه خیار

رقم‌های گلخانه‌ای دارای میوه‌های با پوست نازک، استوانه‌ای و کشیده‌اند که پس از برداشت رطوبت خود را از دست می‌دهند (Peirce, 1987; Smith, 1977). میوه‌های خیار رطوبت بالایی دارند و دارای ویتامین A و C می‌باشند (Wehner, 1997). مقدار مواد تشکیل‌دهنده میوه خیار در ۱۰۰ گرم وزن تر به شرح زیر است: ۹۵ درصد آب، ۱۵ کالری انرژی، پروتئین ۰/۹ گرم، چربی ۰/۱ گرم، کربوهیدرات ۳/۴ گرم، ویتامین E (آسکوربیک اسید) ۱۱ میلی‌گرم، کلسیم ۲۵ میلی‌گرم، فسفر ۲۷ میلی‌گرم، آهن ۱/۱ میلی‌گرم، سدیم ۶ میلی‌گرم و پتاسیم ۱۶۰ میلی‌گرم (Peirce, 1987).

۲-۱-۳- شرایط محیطی مناسب رشد خیار

خیار برای تولید محصول بهینه نیازمند خاک با زه‌کشی مناسب و pH خنثی دارد به‌همین دلیل pH مناسب بین ۶/۸-۶ می‌باشد (Peirce, 1987). خاک‌های شنی، رسی و سیلتی برای کشت خیار بایستی با افزودن مواد آلی بهبود یابند (Lerner and Dana, 2001; Mills, 2001). خاک‌های سنگین با زه‌کشی ضعیف برای تولید خیار مناسب نمی‌باشد زیرا ریشه‌های این گیاه به شرایط

کمبود اکسیژن بسیار حساس می‌باشد (Peirce, 1987). خاک‌های لومی-شنی با زه‌کش مناسب بهترین گزینه برای کشت خیار معرفی شده‌اند (Marr, 1995).

دما از فاکتورهای دیگری است که در رشد گیاه نقش مهمی را ایفا می‌کند. بهترین دما برای جوانه-زنی بذرها ۲۹°C-۲۷ و حداکثر رشد رویشی بوته‌های خیار در دمای ۳۰°C-۲۳ می‌باشد (Wittwer and Honma, 1979; Marr, 1995). در گلخانه‌ها بهتر است دما طی روز پایین‌تر از ۱۸°C و بالاتر از ۳۰°C نباشد (Marr, 1995). اگر دمای شب پائین‌تر از ۵°C باشد میوه‌ها به حد کافی تشکیل نمی‌شوند و یا اینکه اختلالات فیزیولوژیکی در آن‌ها ظاهر می‌گردد. گل‌ها در دمای ۱۵°C به بالا شکوفا می‌شوند و دانه‌های گرده در دمای ۱۷°C به بالا آزاد می‌شوند. عمل لقاح در دمای ۲۶ تا ۲۹°C صورت می‌گیرد.

تولید محصول خوب نیازمند وجود تعادل مناسبی از مواد غذایی است. خیارهای گلخانه‌ای نباید کمبود مواد غذایی داشته باشند (Marr, 1995). قبل از کاشت، بایستی کود کاملاً پوسیده یا کمپوست به خاک اضافه گردد (Lerner and Dana, 2001). با اضافه نمودن نیترات آمونیوم، نیترات پتاسیم یا سوپر فسفات بعد از سترون نمودن خاک، کمبود موادی مانند نیتروژن، فسفر و پتاسیم تأمین می‌گردد (Wittwer and Honma, 1979). در طول دوره‌ی رشد، محلول غذایی برای رفع کمبود مواد مغذی مورد نیاز گیاه به‌همراه آب آبیاری در اختیار گیاه قرار می‌گیرد. در صورت کمبود منیزیم، سولفات منیزیم روی گیاه اسپری می‌شود (Wittwer and Honma, 1979).

نیاز آبی بوته‌های خیار بسته به نوع خاک، دمای محیط و شدت تابش خورشید متفاوت است. آب آبیاری نباید سرد باشد زیرا می‌تواند منجر به کاهش رشد و در نتیجه کاهش محصول گردد (Wittwer and Honma, 1979).

۲-۱-۴- تولید و اهمیت اقتصادی خیار در ایران و جهان

خیار چهارمین محصول سبزی در جهان پس از گوجه‌فرنگی (*Lycopersicon esculentum* Mill.)، کاهو (*Brassica oleracea* L.) و پیاز (*Allium cepa* L.) می‌باشد (Tatlioglu, 1993). چین، رتبه‌ی اول تولید این محصول را دارا می‌باشد و پس از آن ترکیه، ایران و روسیه در رده‌های بعدی قرار می‌گیرند (USDA, 2007).

در ایران حدود ۳۱۴ هزار هکتار برابر با ۲/۵۳ درصد از زمین‌های محصولات زراعی کشور در سال زراعی ۸۸-۱۳۸۷، به کشت انواع مختلف محصولات جالیزی اختصاص داشته است. در بین محصولات جالیزی خیار سطحی معادل با ۲۶/۳۸ درصد این زمین‌ها را به خود اختصاص داده است. استان‌های کرمان، خراسان‌رضوی، خوزستان، فارس و سیستان‌وبلوچستان بیش از نیمی از سطح و تولید محصولات جالیزی را دارا می‌باشند.

طبق آمار سازمان خوار و بار و کشاورزی[1] (Anonymous, 2011) سطح زیر کشت جهانی خیار در سال ۲۰۰۹، ۲۴۸۸۶۰۰ هکتار با عملکرد متوسط ۱۶/۷ تن درهکتار و تولید ۴۱۷۴۳۸۴۰ تن می‌باشد که بالاترین تولید متعلق به کشور چین با ۴۴۲۵۰۱۸۲ تن (۶۳/۵٪) بوده که از سطحی معادل ۱۰۳۷۳۸۸ هکتار به‌دست می‌آید. متوسط‌عملکرد این کشور ۱۷/۱ تن می‌باشد.

میزان تولید خیار در ایران ۱۶۰۳۷۳۷ تن در سطحی معادل با ۸۲۸۹۶ هکتار می‌باشد. به‌عبارت دیگر عملکرد تولید این محصول در کشور ۱۲۴۲۹/۷۹ کیلوگرم در هکتار در کشت آبی و ۷۵۶۸/۰۷ کیلوگرم در هکتار در کشت دیم می‌باشد. در استان کرمان از مجموع ۲۰۳۳۷ هکتار زمینی که زیر کشت خیار می‌باشند، ۴۵۴۹۲۳ تن محصول برداشت می‌شود (متوسط عملکرد در کرمان ۱۷۸۶۳/۲ کیلوگرم و در جنوب این استان ۲۲۵۲۰ کیلوگرم در هکتار است). متوسط عملکرد خیار در ایران ۲۲ تن و بیشترین عملکرد مربوط به استان چهارمحال‌وبختیاری به‌میزان ۳۸/۷۱ تن می‌باشد. استان‌های مهم تولیدکننده خیار،کرمان (منطقه جیرفت و کهنوج)، لرستان، خوزستان و ایلام می‌باشند. منطقه جیرفت و کهنوج در استان کرمان ۲۶٪ از تولید کشور را در اختیار دارند (آمارنامه کشاورزی، ۱۳۸۹).

۲-۱-۵- اهمیت و پراکنش آفات و عوامل بیماری‌زای خیار

خیار میزبان حشرات و عوامل بیماری‌زای زیادی می‌باشد. سفید بالک (*Trialeurodes vaporariorum*)، آفت معمول در گلخانه‌های کشت سبزیجات است. این حشره نه‌تنها از گیاه تغذیه می‌کند بلکه ناقل ویروس‌های گیاهی نیز می‌باشد. بی رنگ شدن و کاهش رشد از نشانه‌های آلودگی به این آفت است (Greer, 2000).

تریپس با نام علمی *Frankliniella occidentalis* یکی از دشمنان مهم خیار است، این آفت برگ، ساقه و گل را سوراخ نموده و از شیره گیاهی تغذیه می‌کند. ایجاد لکه‌های نقره‌ای که در نهایت قهوه‌ای شده و نقاط سیاه‌رنگ در طرف دیگر برگ از نشانه‌های خسارت تریپس است (Mau and Kessing, 1993).

یکی از آفات شناخته شده‌ی خیار، کنه تار عنکبوتی (*Tetranychus urticae*) است. این کنه از سطح زیری برگ تغذیه نموده و نشانه‌های خسارتش به‌صورت نقاط رنگ پریده ظاهر شده که پس از مدتی زرد و خاکستری می‌شود (Fasula and Denmark, 2000).

1- Food and agriculture organization

شته‌ها یکی دیگر از آفات معمول روی خیار بوده که گیاهان جوان را از بین برده و ناقل بیماری ویروسی‌اند. این حشرات اواخر بهار تا اوایل تابستان به گیاهان حمله نموده و به‌سرعت گسترش می‌یابند (Peirce, 1987).

دما و رطوبت بالا در گلخانه، شرایط مناسبی را برای گسترش عوامل بیماری‌زا فراهم می‌نماید. از این‌رو، خیار گلخانه‌ای میزبان بیمارگرهای متعددی می‌باشد (جدول ۲-۱). سفیدک داخلی با عامل *Pseudoperonospora cubensis* (Berk. and Curt.) Rostaw خسارت زیادی را به خیارهای گلخانه‌ای وارد می‌کند. از نشانه‌های بارز این بیماری ایجاد نقاط قهوه‌ای مایل به زرد در سطح بالایی برگ است. در زمان کوتاهی همه‌ی برگ‌ها می‌میرند و میوه‌ها کوتوله می‌شوند (Horst, 1979). این بیمارگر علاوه‌بر حمله به کدوئیان به خیار وحشی و تعداد کمی از علف‌های هرز نیز حمله می‌کند. این بیماری از گلخانه‌های کشت خیار در ورامین گزارش شده است (اعتباریان، ۱۳۸۱).

سفیدک سطحی (*Erysiphe cichoracearum* DC. ex Merat) خطر جدی برای تولید در نواحی گرمسیری و گلخانه‌ای است (Peirce, 1987). این بیماری از دیرباز در ایران به‌خصوص در منطقه‌های کشت گیاهان جالیزی وجود داشته است. در استان فارس این بیماری روی خیار توسط بنی هاشمی و ذاکری (۱۳۶۸) گزارش شده است.

پوسیدگی اسکلروتینیایی میوه خیار (*Sclerotium* sp.)، در سال ۱۳۷۶ توسط ذاکری در روی میوه خیار گلخانه‌ای از منطقه کرج مشاهده گردید (ذاکری، ۱۳۷۷). بیماری در محل گلگاه میوه به‌صورت آب‌سوختگی ظاهر می‌شود. پس از مدتی روی ساقه‌ی خیار شانکرهای پوشیده از پوشش پنبه‌ای سفید و ضخیم مشاهده می‌گردد.

آنتراکنوز با عامل *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell. Et. Halst اولین‌بار در سال ۱۸۷۶ در ایتالیا روی میوه خیار گزارش شد (Walker , 1952)، امروزه در اکثر نقاطی که دارای آب و هوای نسبتاً ملایم و رطوبت کافی می‌باشند وجود آن به اثبات رسیده است. در اثر حمله این قارچ در مرحله گیاهچه زخم‌های قهوه‌ای رنگ مایل به سیاه روی ساقه به‌وجود می‌آید که به سرعت شکاف برداشته و منجر به مرگ گیاهچه می‌گردد.

بیماری ساق سیاه ناشی از قارچ *Macrophomina phaseolina* (Maubl.) Ashby اولین‌بار در سال ۱۳۳۲ از خربزه جداسازی گردید. بارزترین نشانه این بیماری سیاه شدن ساقه است که ابتدا به‌صورت لکه‌ای در نزدیکی طوقه یا روی ساقه ظاهر می‌شود. این لکه ابتدا زیتونی رنگ و سپس با گذشت زمان کدر شده تا سرانجام قهوه‌ای و سیاه می‌گردد (ارشاد و مستوفی پور، ۱۳۴۸). پژمردگی فوزاریومی (*Fusarium oxysporum* Snyder and Hansen)، با نشانه‌های مرگ گیاهچه و