بررسی میزان و شدت آلودگی خربزه و طالبی به قارچ پوسیدگی ذغالی *Macrophomina phaseolina* (Tass) و تنوع قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها در شهرستان‌های ورامین، گرمسار و ایوانکی

Distribution and strains diversity of charcoal rot, *Macrophomina phaseolina* in melon farms of Varamin, Garmsar and Eyvanekey areas

فاطمه میرعبداللهی شمس[۱]، داریوش شهریاری[۲]، مژده ملکی[۳*] و ندا خردپیر[۴]

دریافت: ۹۸/۰۷/۰۵ پذیرش: ۹۸/۱۱/۱۵

چکیده

بیماری ساق سیاه خربزه و طالبی (Tass) *Macrophomina phaseolina* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاکزاد خربزه و طالبی با اهمیت اقتصادی زیاد در سراسر دنیا می‌باشد. به منظور بررسی میزان شیوع و شدت این بیماری، نمونه‌های گیاهی آلوده از هشت منطقه در مزارع خربزه و طالبی شهرستان ورامین در جنوب شرقی استان تهران و شهرستان‌های گرمسار و ایوانکی در استان سمنان جمع‌آوری، خالص‌سازی و اثبات بیماری‌زایی نمونه‌ها روی طالبی رقم حساس سمسوری انجام شد. سپس برای مقایسه قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های جمع‌آوری شده، اقدام به مایه‌زنی قارچ *M. phaseolina* بر روی طالبی رقم حساس سمسوری شد. از کل نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، در مجموع ۱۲ جدایه خالص قارچ *M. phaseolina* به‌دست آمد که همگی دارای قدرت بیماری‌زایی بودند؛ شدت بیماری هر ژنوتیپ بر اساس مقیاس ۹-۱ پیشنهاد شده توسط ابوی، پاستور-کورااللس بررسی شد که اختلاف معنی‌داری میان آن‌ها مشاهده گردید؛ به‌طوری‌که جدایه‌های شه سفید ایوانکی (MP-SH-37, MP-SH-34) به ترتیب با شدت شاخص بیماری ۹/۷۱ و۹/۲۴ در گروه آماری a و ab قرار گرفتند. کم‌ترین مقدار شاخص شدت بیماری به داور آباد شهرستان گرمسار برابر ۱/۲۷ درصد تعلق گرفت. در این بررسی، جدایه MP-SH-34 به‌عنوان جدایه قوی‌تر از نظر بیماری‌زایی انتخاب شد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، ۱۲ جدایه مختلف از قارچ *M. phaseolina* بر روی محصولات خربزه و طالبی شهرستان‌های ورامین و گرمسار و ایوانکی وجود دارند که همگی دارای قدرت بیماری‌زایی بوده و می‌بایست تمهیداتی جهت مدیریت آن‌ها اتخاذ شود.

واژگان کلیدی: خربزه و طالبی، *Macrophomina phaseolina*، جدایه‌ها، ورامین، گرمسار، ایوانکی

۱و ۳- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین – پیشوا، ورامین، ایران

۲- استادیار، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیع استان تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ورامین، ایران

۴- استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین – پیشوا، ورامین، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: mojdehmaleki@yahoo.com

مقدمه

Cucumis melo شامل دو محصول طالبی *C. melo* var *cantalupenses* و خربزه *C. melo* var *inodorus*، از مهم‌ترین محصولات صیفی بوده و کشت و پرورش انواع و ارقام مختلف آن در کشور ما از گذشته معمول بوده است. در ایران به دلیل وجود تنوع آب و هوایی، تعدد و پراکنش روستاها، مهاجرت مردم به مناطق مختلف و مبادله بذور، ارقام بسیار متنوعی از خربزه و طالبی به‌وجود آمده است که منابع ژنتیکی بسیار خوبی از این گونه را تشکیل می‌دهند. مناطق مهم کشت آن در ایران عبارتند از: ورامین، ایوانکی، گرمسار، اصفهان، خراسان، ساوه، قزوین، شهریار، آستارا، گیلان، مختصری از آذربایجان و همدان (رافضی، ۱۳۹۳). محصولات جالیزی مرز جغرافیایی خاصی ندارند و در آمریکا، کانادا، اروپای شمالی و مدیترانه، آفریقای جنوبی، آسیا، خاور دور به‌ویژه ژاپن و استرالیا نیز از ارزش تجاری بسیار بالایی برخوردارند (مبلی و پیراسته، ۱۳۷۷). طبق آمار سازمان خواروبار جهانی، مجموع تولید انواع خربزه و طالبی در جهان بیش از ۲۲ میلیون تن است. میانگین عملکرد جهانی تولید خربزه و طالبی ۲۱/۶ تن و بیش‌ترین عملکرد متعلق به کانادا با ۱۲۰ تن در هکتار می‌باشد. ایران با تولید بیش از ۱۹۱۵۰۰۰ تن و با حدود ۷۹۳۸۰ هکتار سطح زیر کشت، رتبه سوم را در جهان پس از کشورهای چین و ترکیه دارا می‌باشد. متوسط عملکرد خربزه و طالبی در ایران ۲۴/۱۳۴ تن در هکتار است (احمدی و همکاران، ۱۳۹۸). از مهم‌ترین ارقام کشت شده در ایران می‌توان به خربزه خاتونی مشهد، سوسکی سبز، سوسکی زرد، سفیدک زابل، طالبی سمسوری ورامین، طالبی ساوه، طالبی گرگاب و .... اشاره کرد.

عوامل بیماری‌زای متعددی طالبی و خربزه را مورد حمله قرار می‌دهند. یکی از بیماری‌های مهم خربزه، بیماری پوسیدگی ذغالی خربزه یا ساق سیاه می‌باشد که به میزان قابل توجهی باعث کاهش محصول می‌شود. این بیماری علاوه بر خربزه به طالبی، هندوانه، خیار و سایر گیاهان صیفی و زراعی نیز خسارت وارد می‌کند. عامل بیماری قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid می‌باشد که به دلیل آشکارشدن رنگ تیره در بخش‌های مورد حمله بافت میزبان، پوسیدگی ذغالی خوانده می‌شود. این بیماری در سراسر دنیا به خصوص نواحی دارای اقلیم گرم و خشک دارای اهمیت اقتصادی زیادی است. این بیماری سالیانه خسارت زیادی به خربزه و طالبی در مناطق ورامین، ایوانکی و گرمسار وارد می‌سازد. بارزترین نشانه این بیماری سیاه شدن ساقه است که ابتدا به‌صورت لکه‌ای در نزدیکی طوقه گیاه یا روی ساقه ظاهر می‌شود. این لکه ابتدا زیتونی رنگ بوده و سپس با گذشت زمان کدر شده تا سرانجام قهوه‌ای و سیاه می‌گردد. در این مرحله به‌تدریج شیره گیاه از شکاف‌هایی که در سطح پوست ایجاد می‌گردد، خارج شده و در مجاورت هوا به‌صورت صمغ تیره رنگ باقی مانده و خشک می‌شوند. یکی دیگر از نشانه‌های عمده بیماری، مرگ بوته‌ها در اواخر فصل بدون علایم خارجی روی بوته است. گاهی اوقات بیماری به میوه هم حمله می‌کند و باعث خشک شدن دم میوه و در نتیجه ریزش آن می‌گردد (اعتباریان، ۱۳۸۱).

قارچ عامل بیماری ساق سیاه *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid اولین بار در سال ۱۹۰۵ در کشور فرانسه روی لوبیا مشاهده شد؛ پس از آن در ۱۹۱۹ در ایالات متحده و سپس در اروپا، کانادا و امریکای جنوبی و آفریقا مشاهده گردید. این بیماری اولین بار در ایران در سال ۱۳۳۲ روی ریشه هندوانه در تایباد به وسیله شریف و منوچهری به عنوان یک بیماری ناشناخته جمع‌آوری گردید و مجدداً توسط شریف در سال ۱۳۳۴ در مزارع جالیز اصفهان از ریشه، ساقه و میوه خربزه جداسازی شد (اعتباریان ۱۳۸۱).

قارچ بیمارگر *M. phaseolina*، یک گونه خاکزاد با دامنه میزبانی وسیع شامل بیش از ۵۰۰ گونه از ۷۵ خانواده گیاهی است (Purkayastha *et al.*, 2006). این قارچ در تمام مناطق دنیا با شرایط آب و هوایی مختلف اعم از بارانی تا حاره‌ای ایجاد بیماری می‌کند (Abawi and Pastor-Corrales, 1990) و از بیماری‌های مهم اقتصادی است که در شمال و جنوب آمریکا، آسیا، آفریقا و برخی از قسمت‌های اروپا شیوع دارد (Jana *et al.*, 2003). این قارچ مهم‌ترین عامل کاهش محصول لوبیا در پاکستان بوده و سالانه خسارت بالایی به این محصول وارد می‌کند (Iqbal *et al.*, 2003). قارچ بیمارگر *M. phaseolina* باعث افزایش حساسیت گیاه و کاهش محصول در ژنوتیپ‌های برنج Durango و Jalisco شده است (Mayek-Perez *et al.*, 2001b). همچنین این بیماری، مشکلی اساسی برای پرورش‌دهندگان خربزه که از آبیاری

قطره‌ای استفاده می‌کنند، ایجاد می کند (Nischwitz *et al.*, 2004). بیماری ساق سیاه هر ساله در نیمه جنوبی هند شیوع پیدا کرده و باعث کاهش ۳۰-۲۰٪ یا حتی بیشتر روی محصول سویا می‌شود (Shaner *et al.*, 2006). تحقیقات دانشگاه کالیفرنیا نشان داد که *M. phaseolina* یکی از مشکلات اصلی تولید توت‌فرنگی در برخی ایالات محسوب می‌شود (Koike *et al.*, 2009-2010). بررسی سطوح بیماری پوسیدگی ذغالی بر روی کرچک نشان دهنده ۷۵-۳۰ درصد کاهش محصول تحت تأثیر جدایه‌های مختلف *M. phadeolina* بود (Claudino and Soares, 2014). Cohen و همکاران ضمن بررسی علائم و شدت آلودگی ارقام خربزه و هندوانه به پوسیدگی ذغالی، مهم‌ترین علامت مشترک بین این دو محصول را ریزش برگ‌ها و کاهش قابل ملاحظه وزن نهایی محصول گزارش کردند (Cohen *et al.*, 2016).

پوسیدگی ذغالی یا ساق سیاه در ایران باعث خسارت ۱۰۰٪ روی خربزه در برخی مزارع شهرستان گرمسار شده است (Etebarian, 2002). مناطق انتشار این بیماری در ایران، اصفهان، نطنز، کرمان، مشهد، ورامین، ایوانکی، ساوه، یزد، تبریز، اهواز و برازجان می‌باشد و می‌توان گفت که این بیماری در تمام خاک‌های نواحی خشک ایران کم و بیش وجود دارد (اعتباریان، ۱۳۸۱). با توجه به خلاء موجود از نظر جدایه‌های بیماری‌زای قارچ بیمارگر در منطقه ورامین و گرمسار و ایوانکی، این تحقیق با هدف بررسی سطح آلودگی و تفکیک جدایه‌های شایع در این مناطق به‌عنوان یکی از مناطق تولید انبوه طالبی و خربزه در کشور انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور جمع‌آوری قارچ *M. phaseolina* در فصول زراعی سال‌های ۱۳۹۴ تا ۱۳۹۶ از مزارع مختلف خربزه و طالبی در هشت منطقه از جنوب شرقی استان تهران (شهرستان ورامین) و غرب استان سمنان (شهرستان‌های ایوانکی و گرمسار) شامل ایستگاه تحقیقاتی ورامین، جواد آباد، طغان، رستم آباد، خاوه، ایوانکی، شه سفید و داور آباد بازدید به عمل آمد. به این ترتیب، بوته‌های دارای علایم زردی و پژمردگی با مشخصه‌های تخریب بافت پوست در ناحیه طوقه، تغییر رنگ زیتونی در محل انشعابات شاخه و خشکیدگی بافت ناحیه طوقه و شاخه‌ها به رنگ خاکستری تیره متمایل به سیاه و صمغ قهوه‌ای رنگ با اسکلروت‌های قارچ شناسایی و جمع‌آوری شدند. برای تعیین درصد آلودگی روی اقطار مزرعه در ۱۰ نقطه در کادر یک متر مربعی بوته‌های آلوده شمارش و درصد وقوع بیماری با استفاده از فرمول تعداد بوته‌های آلوده به کل بوته محاسبه گردید (Padder *et al.*, 2010). برای جداسازی قارچ عامل بیماری از هر مزرعه چند ساقه یا شاخه به همراه برگ دارای علایم جمع‌آوری شدند (شکل ۱). نمونه‌ها درون پاکت به آزمایشگاه منتقل شده و بعد از کد گذاری اقدام به جداسازی قارچ عامل بیماری گردید.

شکل ۱- علایم بیماری پوسیدگی ذغالی خربزه وطالبی؛ چپ) سیاه شدن طوقه و شاخه با اسکلروت، راست) مزرعه آلوده به‌صورت زردی و پژمردگی در ایستگاه تحقیقاتی ورامین در سال ۱۳۹۵

Fig. 1. Symptoms of charcoal rot disease of melon; Left) blackening of crown and stem by Sclerotia; Right) yellowing and withering of an infested farm in Varamin Research Station (2016)

برای جداسازی قارچ عامل بیماری، ابتدا قطعاتی به اندازه ۴-۳ میلی‌متر مربع از مرز آلوده و سالم از طوقه جدا گردید و به مدت یک تا سه دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد قرار گرفتند (Huda-Shakira *et al.*, 2019). سپس قطعات ضدعفونی شده سه بار توسط آب مقطر سترون شسته شده و روی کاغذ صافی قرار گرفتند تا آب آن‌ها کاملاً گرفته شود. سپس در شرایط سترون قطعات خشک شده به ظروف پتری حاوی محیط کشت PDA منتقل شدند و به مدت سه الی چهار روز در دمای ۳۲-۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Cloud and Rupe, 1991). به منظور خالص‌سازی بعد از رشد جدایه قارچ، قطعه‌ای از محیط حاوی قارچ به محیط کشت آب آگار منتقل گردید و سپس یک قطعه از نوک ریسه پرگنه فعال شده جهت کشت خالص تهیه شد (Purkayastha *et al.*, 2006). برای شناسایی قارچ عامل بیماری از کلید شناسایی (Barnett and Hunter, 1972) استفاده گردید. جدایه‌های قارچ *M. phaseolina* به روش ذکر شده جداسازی و خالص گردید و سپس با توجه به مناطق جمع‌آوری کدگذاری شدند.

به منظور احیاء و اطمینان از قدرت بیماری‌زایی، جدایه‌های قارچ روی محیط PDA تکثیر و سپس به ارلن مایر ۵۰۰ میلی لیتری حاوی ۲۰۰ گرم ارزن که قبلاً با آب مرطوب و توسط دستگاه اتوکلاو در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس در دو مرحله به مدت یک ساعت استریل شده بودند، به ۱۰ دیسک ۵ میلی‌متری اضافه و بعد از اختلاط دیسک‌ها در تمام محیط ارزن به مدت ۱۵ روز در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس و سپس تحت ۱۲ ساعت روشنایی قرارداده شدند.

برای تهیه زادمایه قارچ از دانه‌های ارزن استفاده شد. برای این منظور دانه‌های ارزن به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر خیسانده و پس از حذف آب اضافی مقدار ۲۰۰ گرم در ارلن‌های ۵۰۰ سی‌سی قرار داده و سپس در ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه استریل گردید. بعد از سرد شدن، دانه‌ها در محیط سترون با ۶ دیسک پنج میلی‌متری قارچ (برشی از کشت ۴-۳ روزه قارچ روی محیط PDA) مایه‌زنی شدند. ارلن‌های مایه‌کوبی شده به مدت ۱۵ روز در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار گرفتند. سپس خاک سطحی سترون شده حاوی خاک رس، شن و کود دامی به نسبت (۱:۱:۱) با یک گرم ارزن آلوده به قارچ مخلوط گردید. سپس گیاهچه‌های طالبی رقم سمسوری حساس به تعداد دو بوته در هرگلدان کاشته شدند. هم‌زمان با کاشت، آبیاری تا حد رطوبت اشباع انجام شد. گلدان‌ها (پنج گلدان) در دمای گلخانه ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از ظهور علایم بیماری که با پژمردگی اولیه و سپس تغییر رنگ بافت ساقه در محل طوقه همراه بود، اقدام به جداسازی مجدد قارچ در آزمایشگاه گردید. قارچ به‌دست آمده با جدایه‌های اولیه مطابقت داده شد (Mayek-Perez *et al.* 2001a). برای شناسایی و تأیید قارچ جدا شده از نمونه‌های اثبات بیماری‌زایی شده، قارچ به‌دست آمده روی محیط کشت‌های PDA کشت داده شد و از مشخصات ظاهری و اندازه اندام‌های مختلف قارچ یادداشت برداری به عمل آمد. سپس تفاوت بیماری‌زایی جدایه‌های حاصل از مرحله اثبات بیماری‌زایی به تفکیک روی طالبی رقم حساس سمسوری ورامین همانند روش اثبات بیماری‌زایی، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۲ تیمار و چهار تکرار صورت گرفت. ارزیابی جدایه از نظر قدرت بیماری‌زایی یک ماه پس از کاشت بر اساس شاخص شدت بیماری‌زایی بر اساس مقیاس نمره‌دهی ۱ تا ۹ مطابق با روش ابوی و پاستور-کورالس (Abawi and Pastor-Corrales, 1990) و با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (جدول ۱):

$$\text{شاخص آلودگی} = \sum \frac{\text{نمره آلودگی} \times \text{تعداد بوته بیمار}}{\text{تعداد کل بوته}}$$

داده‌های حاصل با نرم‌افزارهای MSTAT-C وSPSS مورد آنالیز واریانس یک طرفه درسطح اعتماد ۹۹٪ قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن مقایسه شدند.

جدول ۱- نمره‌دهی شدت بیماری ساق سیاه خربزه و طالبی تحت تأثیر *M. phaseolina* بر اساس مقیاس Abawi and Pastor-Corrales (1990)

Table 1. Disease indexing of charcoal rot on melons due to *M. phaseolina* according to Abawi and Pastor-Corrales (1990)

نمره شدت بیماری Disease Index	علائم بیماری	Disease symptoms
1	بدون علائم	No visible symptoms
3	تغییر رنگ روی طوقه و بخشی از ساقه	Light discoloration on some part of stem and crown
5	تغییر رنگ طوقه و تمام ساقه تا نزدیک برگ‌های لپه‌ای	Discoloration of crown and stem close to cotyledon leaves
7	تغییر رنگ تمام ساقه و طوقه و برگ‌های لپه‌ای، زرد و نکروزه شدن برگ‌ها، خروج شیرابه قهوه‌ای از بافت گیاه	Complete discoloration of stem and crown and cotyledon leaves with necrotic symptoms on true leaves, brown extract from plant tissue
9	مرگ گیاه در مرحله گیاهچه و یا قهوه‌ای شدن تمام قسمت‌های طوقه، ساقه و برگ‌ها، مرگ بوته‌ها در مرحله چند برگی و تولید اسکلروت در بافت‌ها	Seedling death or brown lesions on all parts of stem, crown and leaves, plant death at multiple leaves level with sclerotia on plant tissue

نتایج

علایم بارز بیماری، ابتدا به صورت لکه‌ای در نزدیکی طوقه گیاه یا روی ساقه مشاهده شد. لکه‌ها ابتدا زیتونی رنگ بودند و سپس با گذشت زمان کدر شده تا سرانجام قهوه‌ای و سیاه گردید. در این مرحله به‌تدریج شیره گیاه از شکاف‌هایی در سطح پوست خارج شده و در مجاورت هوا به‌صورت صمغ تیره رنگ باقی مانده و خشک شدند. یکی دیگر از نشانه‌های عمده بیماری، مرگ بوته‌ها در اواخر فصل بدون علایم خارجی روی بوته بود. میزان وقوع بیماری از ۲۴ درصد در ایستگاه تحقیقاتی ورامین تا ۷۹ درصد در منطقه شه سفید ایوانکی متغیر بوده است.

از بوته‌های خربزه و طالبی دارای علایم بیماری پوسیدگی ذغالی، جمع‌آوری شده از مزارع خربزه و طالبی در مناطق مختلف ایوانکی، ورامین و گرمسار، جمعاً ۱۲ جدایه *M. phaseolina* روی محیط PDA جداسازی و خالص‌سازی گردید و به شرح جدول ۲ بر اساس منطقه جمع‌آوری کدگذاری شدند.

در این مرحله بعد از جداسازی، خالص‌سازی و تکثیر جدایه‌های *M. phaseolina* به‌دست آمده، روی گیاه طالبی رقم سمسوری (حساس به بیماری) اثبات بیماری‌زایی شدند. علایم بیماری یک هفته بعد از مایه‌زنی و کاشت گیاه، به‌صورت خطوط نکروزه قهوه‌ای رنگ در محل طوقه دیده شد؛ بعد از دو هفته خطوط نکروزه قهوه‌ای رنگ به برگ‌ها و جوانه انتهایی رسید. گسترش آلودگی و توسعه بیماری در گیاه در نهایت سبب از پا افتادگی گیاهچه‌ها و خشکیدگی آن‌ها در گلدان‌های آلوده گردید. بوته‌های بیمار جهت بررسی عامل بیماری مورد کشت و مطالعه قرار گرفتند و قارچ عامل بیماری مجدداً از این بوته‌ها جداسازی و شناسایی شد؛ در حالی‌که از بوته‌های شاهد بدون علامت هیچ‌گونه قارچی جدا نشد. علایم حاصل از قارچ جداسازی شده از بوته‌های بیمار با مشخصات علایم قارچ عامل بیماری ساق سیاه مطابقت داشت (شکل ۲).

میسلیوم قارچ عامل بیماری به سرعت در دمای ۳۰ درجه سلسیوس در محیط غذایی PDA رشد نمود؛ به صورتی‌که در مدت سه روز کل پتری نه سانتی‌متری را پوشانید. توده میسلیوم در ابتدا سفید بود و با گذشت زمان وسط توده خاکستری تا سیاه و اطراف توده در حال رشد سفید رنگ شد و در روز چهارم کل پتری سیاه رنگ شد که در این حالت کلنی شامل میکرواسکلروت و میسلیوم بود. به مرور زمان توده قارچ تولید ریسه‌های هوایی کرد. ویژگی‌های جدایه‌ها بر اساس کلید شناسایی بارنت و هانتر (Barnett and Hunter, 1972) تشخیص داده شدند.

جدول ۲- مناطق نمونه‌برداری و درصد آلودگی طالبی و خربزه به بیماری پوسیدگی ذغالی ناشی از *M. phaseolina* در سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵

Table 1. Sampling areas and infestation percentage of melons to charcoal rot due to *M. phaseolina* through 2015-2016

ردیف Row	کد نمونه Sample Code	درصد آلودگی Infestation percentage	Area	منطقه	شهرستان Country
1	MP-VA-14	24	Research Station	ایستگاه تحقیقاتی	ورامین Varamin
2	MP-JV-11	36	Javadabad	جواد آباد	
3	MP-TO-18	58	Toghan	طغان	
4	MP-TO-21	46	Toghan	طغان	
5	MP-RO-15	38	Rostamabad	رستم آباد	
6	MP-KH-24	34	Khaveh	خاوه	
7	MP-EY-51	65	Eyvanekey	ایوانکی	ایوانکی Eyvanekey
8	MP-EY-54	58	Eyvanekey	ایوانکی	
9	MP-SH-34	79	Shah sefid	شه سفید	
10	MP-SH-37	77	Shah sefid	شه سفید	
11	MP-DV-41	62	Davarabad	داور آباد	گرمسار Garmsar
12	MP-DV-43	54	Davarabad	داور آباد	

رشته‌های میسلیوم این قارچ دارای دیواره عرضی هستند. هیف قارچ در محل دیواره عرضی باریک می‌شود و ریسه بندبند به نظر می‌رسد و در داخل هیف قطراتی وجود دارد. این قارچ برخلاف ریزوکتونیا دارای انشعابات بسیار زیاد و نزدیک به هم می‌باشد که اکثر این انشعابات زاویه ۴۵ درجه دارند. اسکلروت‌های این قارچ به‌عنوان ملاک اصلی شناسایی قارچ در زیر میکروسکوپ به رنگ قهوه‌ای متمایل به سیاه دیده می‌شوند (شکل ۳).

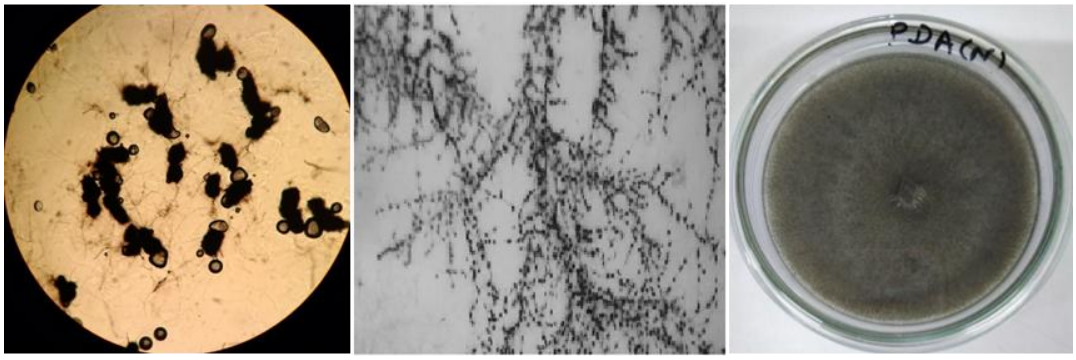
شکل ۲- مراحل اثبات بیماری‌زایی؛ چپ) قهوه‌ای شدن طوقه گیاهچه طالبی یک هفته بعد از مایه‌زنی و راست) خشکیدگی کامل طالبی به همراه نکروز و صمغ در ناحیه ساقه

Fig. 2. Level of pathogenicity; Left) browning of melon crown, one week after inoculation; Right) complete dryness of melon with necrosis and gum on the stem

اسکلروت‌ها برخلاف جنس Sclerotium بسیار ریز و دارای شکل کروی، بیضی و نامنظم بوده و حالت

مشبک داشتند. ابعاد سختینه‌ها ۸۶-۶۷ × ۹۰-۸۶ میکرون بود (شکل ۳).

نتایج حاصل از مقایسه شدت بیماری‌زایی جدایه‌های به‌دست آمده بر روی طالبی رقم سمسوری حساس نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌داری بین جدایه‌ها در سطح اعتماد ۹۹٪ بود (df= ۳۲، MS= ۱۵۶/۷).



شکل ۳- پرگنه و اندام مقاوم قارچ *M. phaseolina*؛ راست) مسیلیوم و اسکلرت متراکم روی محیط کشت؛ وسط) اسکلروت قارچ با بزرگ‌نمایی ۱/۵x و چپ) اسکلروت قارچ با بزرگ‌نمایی ۴x

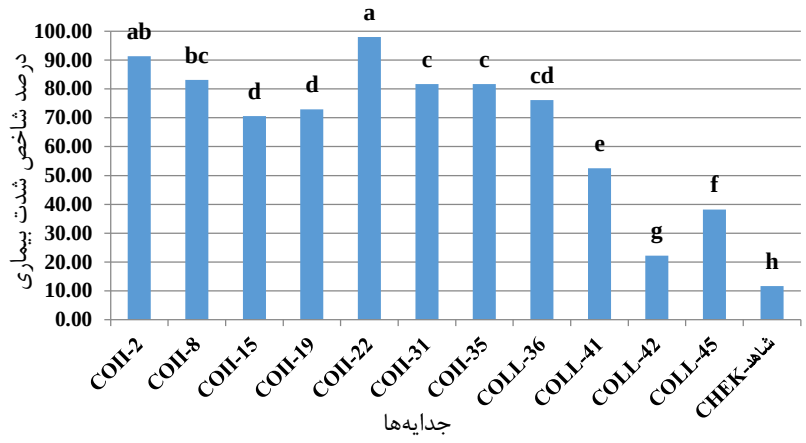
Fig. 3. Colony and resistant organs of *M. phaseolina*; Right) mycelia and dense sclerotes on growth medium; Middle) fungus sclerote X1.5; Left) fungus sclerote X4.

در بررسی مقایسه میانگین‌ها مشخص شد که جدایه‌های شه سفید ایونکی شامل MP-SH-37 و MP-SH-34 به ترتیب با شاخص بیماری ۹/۲۴ و ۹/۷۱ در سطح آماری ab و a قرار گرفتند. در ادامه جدایه‌های جمع‌آوری شده ازحومه ایوانکی شامل MP-EY-54 و MP-EY-51 با شاخص بیماری ۸/۱۰ و ۸/۰۷ در گروه آماری c و سپس جدایه‌های شهرستان ورامین شامل طغان، جواد آباد، رستم آباد و خاوه قرار گرفتند. کم‌ترین مقدار شاخص شدت بیماری برابر با ۱/۲۷ به جدایه حاصل از منطقه داور آباد در شهرستان گرمسار تعلق گرفت (جدول ۳، شکل ۴).

جدول ۳- مقایسه میانگین شاخص شدت بیماری جدایه‌های *M. phaseolina* روی طالبی رقم حساس سمسوری

Table 3. Comparison of the pathogenicity index mean among *M. phaseolina* strains on melon, susceptible variety, Samsouri

شماره No.	نام جدایه Strain Code	شدت شاخص بیماری (٪) Pathogenicity index (%)
1	MP-SH-37	9.24 ab
2	MP-VA-14	8.41 bc
3	MP-TO-18	7.15 d
4	MP-TO-21	7.19 d
5	MP-SH-34	9.71 a
6	MP-EY-54	8.07 c
7	MP-EY-51	8.11 c
8	MP-JV-11	7.52 cd
9	MP-RO-15	5.05 e
10	MP-KH-24	2.42 g
11	MP-DV-41	3.65 f
12	MP-DV-43	1.27 h



شکل ۴- میانگین شاخص شدت بیماری جدایه‌های *M. phaseolina* روی طالبی سمسوری

Fig. 4. Mean of pathogenicity index of *M. phaseolina* strains on melon Samsouri

بحث

در رابطه با بیماری ساق سیاه آزمایش‌هایی در مورد بیماری‌زایی، جداسازی و شناسایی عامل بیماری و علایم بیماری برای جدایه‌های به‌دست آمده از نمونه‌های آلوده جمع‌آوری شده از مزارع خربزه و طالبی مناطق مختلف ایوانکی، گرمسار و ورامین انجام گردید. با نمونه‌برداری از محل طوقه گیاهان آلوده و ضدعفونی سطحی، قارچ *M. phaseolina* به سهولت روی محیط PDA جداسازی شد و نتایج این آزمایش با نتایج حاصل از تحقیقات شهریاری و ترابی (۱۳۹۴) مطابقت داشتند. در طی جداسازی قارچ از گیاهان آلوده، ۱۲ جدایه به‌دست آمد که شناسایی قارچ عامل بیماری پوسیدگی ذغالی خربزه بر اساس مشخصات رویشی قارچ در محیط PDA، تولید میکرواسکلروت، پیکنید و اندازه‌گیری آن‌ها و آزمون‌های اثبات بیماری‌زایی صورت گرفت.

این قارچ یک جنس مونوتیپیک است و تنها یک گونه دارد. در خصوص نام‌گذاری و تعیین جنس و گونه این قارچ تا مدت‌های زیادی بین دانشمندان اختلاف نظر بوده است. این اختلاف نظر به علت شباهت‌هایی است که در بعضی از مراحل زندگی آن با سایر قارچ‌ها وجود دارد. کلنی قارچ روی محیط کشت PDA ابتدا به رنگ سفید تا خاکستری بوده و با افزایش سن قارچ سیاه می‌شود. با رشد کامل قارچ ممکن است به مقدار خیلی کم میسلیوم هوایی تولید کند یا این‌که اصلاً میسلیوم هوایی تولید نکند. قارچ ماکروفومینا از نظر نوع ریسه و انشعابات آن که قائم است تا اندازه‌ای شبیه Rhizoctonia است و با توجه به وجود آناستوموز در بین هیف‌های این قارچ آن را به نام گونه‌ای از ریزوکتونیا به نام *R. bataticola* می‌دانند، ولی باید دانست که انشعابات قائم در این قارچ به ندرت یافت می‌شود و انشعابات با زاویه تند عمومیت دارند. در ضمن انشعابات هیف‌های اصلی این قارچ برخلاف ریزوکتونیا بسیار زیاد است و نمی‌توان دقیقاً آن را به قارچ ریزوکتونیا مربوط دانست (خیری، ۱۳۸۳).

قارچ ماکروفومینا و *Botryodiplodia theobromae* در دمای ۲۸ الی ۳۵ درجه سلسیوس به سرعت روی محیط PDA رشد و کلنی‌های خاکستری تولید می‌کنند. ولی قارچ ماکروفومینا میسلیوم هوایی تولید نمی‌کند یا به مقدار خیلی کمی تولید می‌کند. در حالی‌که *Botryodiplodia* میسلیوم هوایی فراوان و به‌صورت دسته‌ای تولید می‌کند و علاوه بر این تولید اسکلروت در ماکروفومینا عمومی است؛ اما در *Botryodiplodia* اسکلروت وجود ندارد (Sinclair, 1982). به علت تولید سختینه در این قارچ عده‌ای از دانشمندان آن را گونه‌ای از اسکلروتیوم به نام *Sclerotium bataticola* می‌دانند؛ اما سختینه‌های قارچ برخلاف گونه‌های اسکلروتیوم بسیار ریز بوده و در واقع میکرواسکلروت هستند و حداکثر اندازه آن‌ها ۲۰۰ میکرون می‌باشد؛ در صورتی‌که سختینه‌های گونه‌های اسکلروتیوم نسبتاً بزرگ‌تر بوده و به‌طور متوسط بین ۰/۳ تا ۳ میلی‌متر طول دارند. این قارچ دارای مرحله پیکنیدی نیز می‌باشد که

از این نظر می‌توان آن را با قارچ *Dothiorella* و *Macrophoma* مربوط دانست؛ اما پیکنیدها در قارچ *Dothiorella* به‌صورت مجتمع در بافت استروما تشکیل می‌شوند؛ در حالی‌که در ماکروفومینا همانند قارچ *Macrophoma*، پیکنیدها به‌صورت انفرادی تشکیل می‌شوند. بنابراین این جنس قارچ منحصر به فرد و فاقد سختینه بوده و به نام *Macrophomina* شناخته شده است (Singleton *et al.*, 1992). با توجه به مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، همه جدایه‌های قارچی در این تحقیق متعلق به گونه *M. phaseolina* بودند.

نتایج آزمون اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچی روی رقم طالبی سمسوری ورامین که یکی از ارقام حساس به این بیماری است، نشان داد که جدایه‌های قارچ *M. phaseolina* از نظر توانایی بیماری‌زایی با هم تفاوت داشتند؛ با توجه به این که جدایه‌های قارچی از مناطق مختلف و از محصولات مختلف (خربزه و طالبی) جداسازی شده بودند، امری طبیعی است. محققان دیگر نیز این مطلب را تأیید کرده‌اند. مطالعات نشان داده است که جدایه‌های مناطق مختلف و همچنین جدایه‌های قسمت‌های مختلف یک گیاه از نظر شدت بیماری‌زایی متفاوت هستند (رعیت پناه و همکاران، ۱۳۸۱). سطح بالایی از تنوع در مرفولوژی، فیزیولوژی و بیماری‌زایی این قارچ گزارش شده است (Dhingra and Sinclair, 1978).

در آزمون اثبات بیماری‌زایی، گیاهان مایه‌زنی شده علایم را به صورت لکه قهوه‌ای روی ساقه و نزدیک طوقه نشان دادند که با گذشت زمان به‌صورت شکافی قهوه‌ای رنگ در روی ساقه‌ها و برگ‌ها گسترش یافت. قارچ به آوندها حمله کرده و گیاهچه‌ها خشکیده شدند که علایم مشاهده شده با گزارشات دیگر محققان (ارشاد و شیرزادی، ۱۳۴۸؛ اعتباریان ۱۳۸۱) مطابقت داشت.

نتایج این تحقیق نشان داد بیماری پوسیدگی ذغالی خربزه و طالبی در استان تهران (ورامین) و سمنان (ایوانکی وگرمسار) یکی از مهم‌ترین بیماری‌های دو محصول خربزه و طالبی محسوب می‌شود و در بین جدایه‌های به‌دست آمده از نواحی مختلف تفاوت‌های معنی‌داری به لحاظ شدت بیماری وجود داشت؛ به طوری‌که جدایه منطقه شه سفید ایوانکی از نظر قدرت بیماری‌زایی برتری بیش‌تری نسبت به سایر جدایه داشت. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق، پیشنهاد می‌شود تحقیقات سراسری در کشور به منظور شناسایی سویه‌ها یا نژادهای احتمالی به روش‌های مرفولوژیکی و مولکولی صورت گیرد و همچنین بررسی‌های بیش‌تر برای یافتن ارقام مقاوم خربزه و طالبی به‌ویژه شناسایی ژن‌های مؤثر در مقاومت و انتقال آن به ارقام پر محصول توصیه می‌شود.

منابع References

احمدی، ک.، عبادزاده، ح. ر.، حاتمی، ف.، عبداه، ه. و کاظمیان، ا. ۱۳۹۸. آمارنامه کشاورزی سال زراعی ۹۷-۱۳۹۶، جلد اول: محصولات زراعی. وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات. ۹۵ صفحه.

ارشاد، ج. و شیرزادی، غ. ۱۳۴۸. بیماری ساقه سیاه خربزه. نشریه بیماریهای گیاهی ۵(۱): ۷-۱.

اعتباریان، ح. ر. ۱۳۸۱. بیماریهای سبزی و صیفی و روشهای مبارزه با آنها. انتشارات دانشگاه تهران، ۶۰۰ صفحه.

خیری، ع. ۱۳۸۳. بررسی امکان کنترل بیولوژیک بیماری پوسیدگی ذغالی خربزه با استفاده از سودوموناس‌های فلورسنت. پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌شناسی گیاهی. مجتمع آموزش عالی ابوریحان. دانشگاه تهران. ۱۴۷ صفحه.

رافضی، ر. ۱۳۹۳. زراعت خربزه و طالبی. نشریه فنی. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مؤسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر. ۱۰۷ صفحه.

رعیت‌پناه، س.، فروتن، ع. و اولادی، م. ۱۳۸۱. ارزیابی واکنش ارقام رایج سویا به بیماری پوسیدگی ذغالی در استان مازندران. خلاصه مقالات پانزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، کرمانشاه. صفحه ۱۵۸.

شهریاری، د. و ترابی، ب. ۱۳۹۴. واکنش ژنوتیپهای محلی و اصلاح شده خربزه و طابی به بیماری ساق سیاه ناشی از قارچ *Macrophomina phaseolina*. یافته‌های تحقیقاتی در گیاهان زراعی و باغی ۲(۲): ۱۷۶-۱۶۵.

مبلی، م. و پیراسته، ب. ۱۳۷۷. تولید سبزی. مرکز نشر دانشگاه صنعتی اصفهان، چاپ دوم، اصفهان. ۸۷۷ صفحه.

Abawi, G. S. and Pastor-Corraless, M. A. 1990. Root rots of beans in Latin America and Africa: Diagnosis, Research methodologies, and management of strategies CIAT. Cali, Colombia. 114pp.

Barnett, H. L. and Hunter, B. B. 1972. Illustrated genera of imperfect fungi. Burgess Publishing Company. 241pp.

Chattopadhyay, C. and Sastry, R. K. 1999. Effect of soil solarization on the sesame stem-root-rot pathogen *Macrophomina phaseolina* population. Sesame and Safflower Newsletter. No 14. 137pp.

Claudino, M. R. and Soares, D. J. 2014. Pathogenicity and aggressiveness of *Macrophomina phaseolina* isolates to castor *Ricinus communis.* Tropical Plant Pathology 39(6): 453-456.

Cloud, G. L. and Rupe, J. C. 1991. Morphological in stability on a chlorate medium of isolates of *Macrophomina phaseolina* from soybean and sorghum. Phytopathology 81: 892-895.

Cohen, R., Elkabetz, M. and Edelstein, M. 2016. Variation in the response of melon and watermelon to *Macrophomina phaseolina.* Crop Protection 85: 46-51.

Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. 1978. Biology and pathology of *Macrophomina Phaseolina*. Universidade Federal De Vicosa, Brazil. 166 pp.

Etebarian, H. R. 2002. Evaluation of *Streptomyces* isolates for biological control of charcoal rot. XXVI International Horticultural Congress, Toronto, Canada. 43pp.

Huda-Shakira, A. R., Kee, Y. J., Mohd Hafifi, A. B., Mohammad Azni, N. N., Zakaria, L. and Hawa Mohd, M. 2019. Identification and characterization of *Macrophomina phaseolina* causing leaf blight on white spider lilies *Crinum asiaticum* and *Hymenocallis littoralis* in Malaysia. Mycobiology 47(4): 408-414.

Iqbal, S. M., Ghafoor, A., Arshad, M. and Bashir, M. 2003. Screening of Urdbean bean (*Vigna mungo* L.) germplasm for resistance to charcoal rot disease. Pakistan Journal of Plant Pathology 2(2): 107-110.

Jana, T., Sharma, T. R., Prasad, R. D. and Arora, D. K. 2003. Molecular characterization of *Macrophomina phaseolina* and *Fusarium* species by a single primer RAPD technique. Microbiological Research 158 (3): 249-257.

Koike, S. T., Daugovish O., Ajwa, H., Bolda, D. M. and Legend, D. 2009-2010. UCCE Projects Reports. California strawberry commission annual production research report.

Mayek-Perez, N., Lopez-Castaneda, C., Gonzales-Chavira, M., Garcia-Espenosa, R., Acosta-Gallegos, J., Martinez de Vega, O. and Simpson, J. 2001a. Variability of Mexican isolates of *Macrophomina phaseolina* based on pathogenesis and AFLP genotype. Physiology Molecular Plant Pathology 59: 257–264.

Mayek-perez, N., Lopez-castaneda, C. and Lopez-Salinas, E. 2001b. Resistance to *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid in common bean under field condition. Agrociencia 35: 649-661.

Nischwitz, C., Olsen, M. and Rasmussen, S. 2004. Effect of irrigation type on inoculum density of *Macrophomina phaseolina* in melon fields in Arizona. Journal of Phytopathology 152: 133-137.

Padder, B. A., Sharma, P. N., Kapil, R., Pathania, A. and Sharma, O. P. 2010. Evaluation of bioagents and biopesticides against *Colletotrichum lindemuthianum* and its integrated management in common bean. Notulae Scientia Biologicae 2(3): 72-76.

Purkayastha, S., Kaur, B., Dilbaghi, N. and Chaudhury, A. 2006. Characterization of *Macrophomina phaseolina,* the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. Plant Pathology 55(1): 106-116.

Shaner, G., Abney, T. S. and Scott, D. **2006**. Charcoal rot of soybeans. Department of Botany and Plant Pathology. Purdue University. Available at http://www.agcom.purdue.deu/AgCom/Pubs/menu.html.

Sinclair, J. B. 1982. Compendium of Soybean Disease. American Phytopathological Society. 2: 30-33.

Singleton, L. L., Mihail, J. D. and Rush, C. M. 1992. Methods for research on soil borne phytopathogenic fungi. American Phyto-pathological Society 5: 265 pp.

Distribution and strains diversity of charcoal rot, *Macrophomina phaseolina* in melon farms of Varamin, Garmsar and Eyvanekey areas

F. Mirabdollahi Shams[1], D. Shahriari[2], M. Maleki[3*] and N. Kheradpir[4]

Received: 27 Sep., 2019 Accepted: 04 Feb., 2020

ABSTRACT

Charcoal rot on melon *Macrophomina phaseolina* is one of the most important soil borne diseases of melons. The disease has an economical importance throughout the world. So, infested samples from eight sampling points of Varamin Country (south-east of Tehran Province) and Garmsar and Eyvanekey Countries (Semnan Province) were collected, purified and admitted for pathogenicity on melon variety Samsouri. Then, pathogenicity of the sampled strains were compared using susceptible variety of melon, Samsouri. Totally, twelve strains of *M. phaseolina* were collected from the area with variable pathogenicity; although significant difference was observed among them. Strains MP-SH-34 and MP-SH-37 from Shah Sefid in Eyvanekey country had the highest pathogenicity ability and on the other hand, strain from Davarabad in Garmsar area showed the lowest pathogenicity; so, the strongest and infecting strain was MP-SH-34. According to the results, different strains of *M. phaseolina* is spread in melon farms of Tehran and Semnan Provinces which is needed to be managed.

Key words: melons, *Macrophomina phaseolina*, strains, Varamin, Garmsar, Eyvanekey

1 and 3. Former MSc. Student and Assistant Professor, respectively, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Plant Protection Research, Tehran Agricultural and Natural Resources Research and Education, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Varamin, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

Corresponding author: mojdehmaleki@yahoo.com