فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال اول، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۲
صص ۱۲-۱

شناسایی و بیماری‌زایی عوامل قارچی پوسیدگی ریشه و طوقه برخی گیاهان جالیزی در منطقه شاهرود

زهرا عراقی*[۱]، کامران رهنما[۲]، مجتبی ممرآبادی[۳]، فرخنده امتی[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۲۲

چکیده

پوسیدگی طوقه و ریشه از مهم‌ترین بیماری‌های کدوییان در جهان است. جهت شناسایی عوامل قارچی مولد این بیماری در سال زراعی ۹۰-۱۳۸۹ از مزارع محصولات جالیزی (هندوانه، خربزه و طالبی) در منطقه شاهرود، میامی و بیارجمند بازدید و نمونه‌های مشکوک به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. قطعات بافت‌های آلوده پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلرید سدیم ۱ درصد روی محیط کشت PDA و یا بدون ضدعفونی سطحی پس از شستشو با آب مقطر استریل روی محیط کشت نیمه‌انتخابی CMA-PARPH، CMA-PARP و CMA کشت شدند. خالص سازی جدایه‌های دارای اسپور به روش تک اسپور و آزمون بیماری‌زایی آنها با روش فرو بردن ریشه گیاهچه‌های کشت شده در گلخانه در سوسپانسیون حاوی $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر انجام شد. خالص‌سازی جدایه‌های بدون اسپور به‌روش نوک ریسه و آزمون بیماری‌زایی آنها به‌روش مایه‌زنی قطعاتی از پرگنه فعال قارچ اطراف طوقه و ریشه گیاهچه‌های میزبان مورد مطالعه قرار گرفت. جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی (خصوصیات ماکروسکوپی، میکروسکوپی) و خصوصیات فیزیولوژیکی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر شناسایی گردیدند. گونه‌های بیماریزای شناسایی شده شامل *Fusarium solani*، *F. oxysporum* f. sp. *melonis*، *F. oxysporum* f. sp. *niveum*، *F. equiseti*، *Phytophthora nicotianae* و *Rhizoctonia solani* بودند که گونه اول به عنوان گونه غالب شناسایی گردید. هم‌چنین نتایج نشان داد که گونه‌های *F.solani* و *F. oxysporum* از تمامی مراحل رویشی از گیاهچه تا میوه‌دهی قابل جدا سازی بوده و در سراسر منطقه پراکنش وسیعی دارند. این گونه‌ها برای اولین بار از مزارع جالیز شهرستان شاهرود گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه، گیاهان جالیزی، شاهرود، *Fusarium* spp.، *Phytophthora nicotianae*، *Rhizoctonia solani*

---

[۱]- گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. بخشی از یافته های پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول

[۲]- دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولیدات گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

[۳]- استادیار دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود

[۴]- مربی پژوهشی، مرکز تحقیقات کشاورزی استان سمنان (شاهرود)

*- نویسنده مسئول مقاله: zahiraqi@gmail.com

مقدمه

گیاهان تیره کدوییان گروهی پرتنوع از گونه‌های زراعی را تشکیل می‌دهند. گونه‌های این تیره از قرن‌ها پیش در رژیم غذایی انسان غنا و تنوع ایجاد نموده و در سراسر جهان در شرایط گوناگون آب و هوایی و با هدف‌های گوناگون پرورش داده می‌شوند (Shekari *et al.*, 2006). پژمردگی، پوسیدگی بذر، مرگ گیاهچه، بوته‌میری ناشی از پوسیدگی طوقه و ریشه از بیماری‌های مهم محصولات جالیزی به شمار می‌روند. بذر کدوئیان برای جوانه‌زنی و رشد به خاک‌های گرم نیاز دارد. بذرهایی که در سرما کشت می‌شوند با چندین عامل قارچی خاکزی مثل *Pythium* spp.، *Rhizoctonia* spp.، *Fusarium* spp. و *Phytophthora* spp. آلوده می‌شوند (Agrios, 2005).

شبه جنس فوزاریوم یکی از مهمترین قارچ‌های خاکزاد است که پراکنش جهانی داشته و از اهمیت اقتصادی ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Nelson *et al.*,1983). بسیاری از گونه‌های فوزاریوم بیماری‌زا بوده و بیماری‌های مهمی را در گیاهان زراعی ایجاد می‌کنند. برخی مولد پوسیدگی در انواع سبزیجات، بعضی عامل مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه، طوقه و شانکرهای ساقه هستند و بعضی عامل پژمردگی آوندی می‌باشند (Beckman, 1987). تنوع گونه‌های این جنس و قدرت سازگاری آنها با شرایط اقلیمی گوناگون موجب شده است که این قارچ در نواحی گوناگون جهان مانند خاورمیانه، ژاپن، تایوان، اروپا، جنوب آمریکا، کانادا، مکزیک و ایالت متحده خسارت فراوانی به محصولات کشاورزی وارد سازد. بعضی از گونه‌های این قارچ به شدت توکسین (زهرابه) تولید کرده و از این راه به حیات وحش، دام‌ها و انسان خسارت وارد می‌کنند (Nelson *et al.*, 1983). فیتوفتورا جنس مهمی از بیمارگرهای رده‌اامیست (Oomycetes) است. این جنس بیش از ۹۰ گونه مورفولوژیک دارد که به استثنای گونه آبزی و ساپروفیت *Ph. gonapodyides*، همگی آنها از بیمارگرهای مهم گیاهی و از عوامل پوسیدگی ریشه، ساقه، برگ و میوه روی طیف وسیعی از گیاهان میزبان (بیش از هزاران گونه) در جهان هستند و سالانه موجب میلیاردها دلار خسارت در سراسر دنیا می‌گردند (Cooke *et al,* 2007). قارچ *Rhizoctonia* نیز یک بیمارگر خاکزی است که در سراسر دنیا پراکنش دارد و عامل پوسیدگی ریشه، شانکر، مرگ ناگهانی، تخریب میوه و حتی بیماری اندام هوایی گیاه می‌باشد (Alexopoulos *et al.*, 1996).

عوامل پژمردگی ناگهانی طالبی و خربزه در مناطق گوناگون فلسطین اشغالی قارچ‌های *Fusarium solani*، *F. equiseti*، *Macrophomina phaseolina*، *Rhizoctonia solani*، *Pythium aphanidermatum*، *Olpidium* sp. و *F. proliferatum* معرفی شده‌اند (Pivonia *et al*., 1997) و قارچ‌های *F. solani*، *M. phaseolina*، *Pythium* spp. و *Verticillium dahliae* از مزارع هندوانه در کالیفرنیا جداسازی شده‌اند (Aegerte, 2000). در ایران عوامل قارچی *Ph. drechsleri*، *Ph. capcisi*، *P. aphanidermatum*، *R. solani* و *F. oxysporum* به عنوان عوامل بیماری‌های بوته میری و مرگ گیاهچه معرفی شده‌اند (Behdad, 2006). قارچ‌های *P. aphanidermatum*، *M. phaseolina*، *R.solani*، *F. oxysporum*، *F. solani*، *F. equiseti*، *Sclerotium rolfsii*، *Ph. drechsleri*، *Ph. nicotianae*، *Ph. capsici* و *Ph. cryptogea* به‌عنوان عوامل بوته میری کدوئیان در خوزستان (Nasrollah nezhad, 1996) و *F. oxysporum* f. sp. *melonis*، *P. aphanidermatum* و *Ph. drechsleri* به‌عنوان عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه خربزه در استان خراسان معرفی شده‌اند (Jahanbakhsh, 1998). گرچه در زمینه بیماری‌های گیاهان جالیزی در ایران تحقیقاتی انجام شده است، ولی در مورد عوامل قارچی عامل پوسیدگی ریشه و طوقه این محصولات تاکنون تحقیقات منسجمی در منطقه شاهرود صورت نگرفته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌ها

طی بازدیدهایی که از اردیبهشت تا شهریور ماه فصول زراعی سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ از مزارع جالیز (هندوانه، خربزه و طالبی) روستاهای حومه شاهرود، شهرهای میامی و بیارجمند انجام شد، نمونه‌برداری از گیاهان دارای علائم پژمردگی، زردی، پوسیدگی ریشه و طوقه به صورت تصادفی انجام شد. نمونه‌های هر مزرعه جداگانه با ثبت زمان و محل نمونه‌برداری در پاکت‌های تمیز قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل گردیدند. پس از انتقال نمونه‌های جمع‌آوری شده به آزمایشگاه، قسمت‌های آلوده گیاه شامل ریشه،

طوقه و ساقه گیاهان بیمار در زیر جریان ملایم آب شستشو داده شدند. سپس قطعات یک سانتی‌متری از حد فاصل بافت آلوده و سالم تهیه شد و پس از ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک درصد به‌مدت ۲ تا ۳ دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل، نمونه‌ها روی کاغذ صافی استریل در زیر هود خشک و روی محیط کشت PDA (سیب‌زمینی دکستروز آگار) حاوی اسید لاکتیک (Hansen and Smith, 1932) کشت شدند و یا بدون ضدعفونی سطحی و پس از دو بار شستشو با آب مقطر استریل و خشک کردن روی کاغذ صافی، در محیط کشت‌های انتخابی CMA-PARPH (محیط کشت آرد- آگار حاوی پیماریسین، آمپی‌سیلین، ریفامپیسین، پنتاکلرونیتروبنزن و هیمکسازول)، CMA-PARP و CMA کشت و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Tsao and Guy, 1977). برای خالص‌سازی گونه‌های دارای اسپور از روش تک‌اسپور و برای خالص سازی گونه-های بدون اسپور از روش نوک ریسه استفاده شد (Teimouri, 2010).

بررسی ریخت شناسی جدایه‌ها و شناسایی گونه‌های فوزاریوم

برای شناسایی گونه‌های جنس فوزاریوم از محیط کشت‌های غذایی PDA، CLA و WA استفاده گردید. برخی از ویژگی‌ها که در شناسایی قارچ فوزاریوم استفاده می‌شوند مانند شکل، اندازه، محل تشکیل ماکروکنیدی، وجود یا عدم وجود میکروکنیدی، شکل میکروکنیدی و نحوه تشکیل آنها، وضعیت سلول مولد و حامل میکروکنیدی (مونو یا پلی‌فیالید بودن)، وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور و سرهای دروغین مورد ارزیابی قرار گرفت. تشخیص گونه‌ها نیز بر اساس کلیدهای شناسایی معتبر انجام گرفت (Leslie and Summerell, 2006; Nelson *et al.*,1983).

گونه‌های شبه جنس ریزوکتونیا

خالص‌سازی قارچ ریزوکتونیا با استفاده از روش نوک ریسه بر روی محیط کشت WA انجام شد و سپس این قارچ به محیط کشت PDA انتقال داده شد (Sneh *et al.*,1991). در این بررسی زاویه انشعاب، فرو رفتگی در محل انشعاب، وجود بند در نزدیکی محل انشعاب جهت شناسایی ریسه‌های ریزوکتونیا مورد بررسی قرار گرفت. قطر ۱۰۰ ریسه از هر جدایه با عدسی چشمی مدرج اندازه‌گیری شد و میانگین آنها محاسبه گردید. در این بررسی رنگ پرگنه قارچ، سلول‌های تسبیحی و سختینه‌ها در محیط کشت PDA مورد بررسی قرار گرفتند. برای رنگ‌آمیزی هسته در این جنس از محلول سافرانین او استفاده شد. برای این منظور مقداری از هیف قارچ از سطح محیط کشت برداشته شد و روی اسلاید میکروسکوپی در محلولی از یک قطره از آلکالین سافرانین و یک قطره از هیدروکسید پتاسیم (KOH) ۳ درصد رنگ‌آمیزی شد (Sneh *et al.*,1991).

گونه‌های جنس فیتوفتورا

برای شناسایی گونه‌های فیتوفتورا ویژگی‌های ریسه، نحوه اتصال آنتریدیوم[۱] با اگونیوم[۲] (آمفی ژینوس[۳] یا پاراژینوس[۴])، ریخت‌شناسی اسپورانژیوم (بیضوی، تخم‌مرغی، گلابی وارونه، لیمویی، کروی) و وضعیت پاپیل[۵] (پاپیل بزرگ، پاپیل کوچک، بدون پاپیل)، ریزان یا غیر ریزان بودن اسپورانژیوم، تولید مثل جنسی (هموتالیک یا هتروتالیک بودن)، دمای بیشینه برای رشد مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی ویژگی‌های ریسه، جدایه‌ها در محیط کشت آرد ذرت آگار کشت و برای رشد به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. برای تولید اسپورانژیوم، مقداری بذر شاهدانه را به مدت ۵ دقیقه در آب جوشانده و پس از خنک شدن تعداد ۱۵ تا ۲۰ عدد از آنها روی کشت جوان قارچ منتقل شد. پس از ۲۴ ساعت با کلنیزه شدن بذور به‌وسیله قارچ آنها را درون یک پتری قرار داده و روی آنها ۱۰ تا ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته شد. برای تولید اسپورانژیوم از محیط کشت تکه هویج نیز استفاده شد. برای تولید ااسپور از محیط کشت‌های لوبیا آگار و تکه هویج استفاده شد (Ershad, 1992). به‌منظور بررسی کلامیدوسپور[۶] و آماس ریسه[۷]، برش‌هایی به قطر یک سانتیمتر از پرگنه قارچ

[1]- Antheridium
[2]- Oogonium
[3]- Amphygynous
[4]- Paragynous
[5]- Papilla
[1]- Chlamydospore
[2]- Hyphal swelling

به پتری حاوی آب مقطر استریل منتقل و به مدت ۲ الی ۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای مشاهده ویژگی‌های پرگنه، جدایه‌ها در محیط کشت CMA کشت و به‌مدت یک هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. به‌منظورتعیین دماهای ویژه رشد جدایه‌ها، برش‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه پرگنه فعال قارچ در محیط کشت CMA در سه تکرار کشت شد. رشد قطری پرگنه‌ها از دماهای صفر الی ۳۷ درجه سانتی‌گراد به فواصل ۵ درجه سانتیگراد، پس از ۳ روز اندازه‌گیری گردید (Taheri, 2010). تشخیص جدایه‌ها نیز بر اساس کلیدهای شناسایی معتبر انجام گرفت (Stamps *et al.*,1990; Ershad, 1992).

بررسی بیماری‌زایی گونه‌ها در گلخانه

تهیه مایه تلقیح گونه‌های فوزاریوم

برای تهیه مایه تلقیح از کشت ۵ روزه جدایه‌های کشت شده بر روی محیط کشت PDA استفاده گردید. به پتری‌های حاوی کشت خالص هر جدایه از قارچ فوزاریوم ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه و سطح محیط کشت به‌وسیله اسکالپل خراشیده شد. تعداد اسپورها در هر میلی‌لیتر از سوسپاسیون حاصله با استفاده از لام هموسیتومتر تعیین گردید. غلظت مناسب جهت تهیه مایه تلقیح 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر برای هرجدایه در نظر گرفته شد (Elmer *et al.*, 1977).

مایه‌زنی گیاهان به روش غوطه ور کردن ریشه در سوسپانسیون اسپور Root Dip

بذور طالبی، خربزه و هندوانه به مدت یک دقیقه با هیپوکلریت سدیم یک درصد ضدعفونی و سه بار با آب مقطر سترون شستشو شد. سپس در گلدان‌های حاوی خاک اتوکلاو شده کشت و در گلخانه با شرایط دمایی ۲۶ درجه سانتی‌گراد در روز و ۱۸ درجه سانتی‌گراد در شب و تناوب نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی، نگهداری شد. گیاهچه‌ها پس از سبز شدن به آرامی از خاک خارج شده و پس از شستشوی ریشه آنها با آب، نصف طول ریشه به مدت ۷-۵ دقیقه درون مایه تلقیح با غلظت 10^6 اسپور در میلی‌لیتر قرار گرفت. در هر گلدان ۶ گیاهچه کشت گردید و هر دو روز یک بار آبیاری صورت گرفت (Zuniga *et al.*, 1977). برای هر جدایه ۳ تکرار و برای گیاهچه‌های شاهد به جای سوسپانسیون اسپور از آب مقطر استریل استفاده شد. یادداشت برداری از علائم ایجاد شده پس از مشاهده اولین علائم که حدوداً ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی بود آغاز و به مدت ۵ هفته ادامه یافت. جداسازی عامل بیماری از گیاهچه‌های مایه زنی شده مطابق اصول کخ انجام شد.

آزمون تعیین فرم اختصاصی جدایه‌های *Fusarium oxysporum*

به دلیل وجود فرم‌های اختصاصی در جمعیت *F. oxysporum* که هر کدام قادر به ایجاد بیماری در یک میزبان خاص می‌باشد، از چند گیاه که میزبان اختصاصی این قارچ هستند شامل خربزه و طالبی (رقم سمسوری)، هندوانه (رقم Crimpson sweet)، خیار (رقم Super dimenous) و نخود (رقم جم) برای جدایه‌های بیماری‌زا استفاده شد (Teimouri, 2010). تمامی ارقام در شرایط گلخانه و در مرحله گیاهچه با سوسپانسیون اسپور جدایه‌های بیماری‌زای *F. oxysporum* به‌گونه جداگانه به روش ذکر شده در آزمون بیماری‌زایی (Root Dip) مایه‌زنی شدند. ۵ جدایه بیماری‌زای بدست آمده از روی هندوانه روی سایر میزبان‌ها و ۵ جدایه بیماری‌زای بدست آمده از طالبی و خربزه روی سایر میزبان‌ها مایه‌زنی شدند. گیاهچه‌ها تا ۲۱ روز نگهداری و بعد از گذشت این زمان یادداشت برداری از علائم پژمردگی، زردی بوته‌ها و تغییر رنگ آوندی انجام شد.

آزمون بیماری‌زایی گونه‌های جنس ریزوکتونیا در گلخانه

بیماری‌زایی جدایه‌های ریزوکتونیا روی گیاهچه‌های هندوانه و خربزه با مایه‌زنی قطعاتی از پرگنه فعال قارچ اطراف طوقه و ریشه گیاهچه‌های میزبان مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور قطعاتی از حاشیه پرگنه فعال قارچ در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت و به‌مدت ۵ الی ۷ روز تا پر کردن کامل پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از این مدت قطعات میسلیوم از پرگنه بیمارگر در ۴ تکرار در اطراف طوقه و ریشه گیاهچه‌های هندوانه و خربزه با کنار زدن خاک اطراف آنها قرار داده شد و از خاک گلدان روی آنها برگردانده شد. در گلدان‌های شاهد از محیط کشت بدون میسلیوم قارچ استفاده شد. سپس گلدان‌ها آبیاری و در دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد و ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت

تاریکی نگهداری شدند (Tomaso-Peterson and Trevathan, 2004).

آزمون بیماری‌زایی گونه‌های جنس فیتوفتورا در گلخانه

آزمون بیماری‌زایی شبه قارچ فیتوفتورا با مایه‌زنی قطعاتی از پرگنه فعال قارچ اطراف طوقه و ریشه گیاهچه‌های هندوانه، خربزه و طالبی انجام شد. برای این منظور قطعاتی از حاشیه پرگنه فعال قارچ در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت و به‌مدت ۵ الی ۷ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. قطعاتی از میسلیوم در ۴ تکرار در اطراف طوقه و ریشه گیاهچه‌ها با کنار زدن خاک اطراف آنها قرار داده شد و از خاک گلدان روی آنها برگردانده شد. در گلدان‌های شاهد از محیط کشت بدون میسلیوم عامل بیماری استفاده شد. پس از مایه‌زنی گلدانها دو بار به فاصله ۳۰ دقیقه به‌گونه کامل اشباع شده و پس از آن هر دو روز یک‌بار آبیاری شد (Taheri, 2010).

تعیین دماهای ویژه رشد جدایه‌های فیتوفتورا

به‌منظور تعیین دماهای ویژه رشد جدایه‌های فیتوفتورا، برش‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه پرگنه فعال قارچ در محیط کشت CMA در سه تکرار کشت شد. رشد قطری پرگنه‌ها از دماهای صفر الی ۳۷ درجه سانتی‌گراد به فواصل ۵ درجه سانتیگراد، پس از ۳ روز اندازه‌گیری گردید. با مقایسه میزان رشد در دماهای گوناگون، دماهای ویژه رشد (کمینه، بهینه و بیشینه) برای جدایه‌ها مشخص گردید (Taheri, 2010).

نتایج و بحث

در این بررسی پس از نمونه برداری از مزارع گوناگون هندوانه، خربزه و طالبی در شهرستان شاهرود و حومه که علائم مربوط به پوسیدگی ریشه و طوقه در بوته‌های آن به چشم می‌خورد ۵ گونه *Fusarium solani*، *F. oxysporum* f. sp. *melonis*، *F. oxysporum* f. sp. *niveum*، *F. equiseti*، *R.solani* و *Ph. nicotianae* به عنوان عوامل قارچی بیماری‌زا بر روی ریشه و طوقه گیاهان جالیزی از مراحل گوناگون رشد گیاه شامل گیاهچه، گل دهی و میوه‌دهی جداسازی و شناسایی گردیدند (اشکال ۱، ۲ و۳).

گونه *Fusarium solani*

در بین گونه‌های جدا شده قارچ *F. solani* با ٤٤/٨٧ درصد فراوانی به عنوان گونه غالب شناسایی شد. این گونه از هر سه میزبان هندوانه، خربزه و طالبی با علائم پژمردگی و پوسیدگی در ناحیه طوقه و ریشه، از تمامی مراحل رویشی این گیاهان جداسازی گردید. جداسازی قارچ بیش‌تر از ناحیه ریشه صورت گرفت که می‌تواند نشان دهنده فعالیت بیش‌تر قارچ در این قسمت از گیاه باشد. پرگنه این قارچ دارای ظاهر پنبه‌ای شکل و میسلیوم جدایه‌ها به رنگ سفید تا سفید مایل به کرم مشاهده گردید. میزان رشد پرگنه در محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد پس از گذشت ۷۲ ساعت در تاریکی ۲/۵-۲سانتی-متر بود. میکرو کنیدی‌ها به تعداد زیاد عموماً تک سلولی به ابعاد (۱۴/۵-۶/۵)۱۰/۵ × (۵/۵-۳/۲) ۴/۲ میکرومتر و دو سلولی بیضوی شکل و یا تخم مرغی به ابعاد (۲۴-۱۴)۱۹×(۶-۳)۴/۵ روی مونوفیالیدهای بلند مشاهده شدند. ماکروکنیدی‌ها دارای ۲ تا ۵ دیواره عرضی، اکثریت با ۳ دیواره، کمی خمیده دارای سلول انتهایی گرد و سلول پایه کمی فرورفته با ابعاد (۴۰/۵-۳۷/۸)۳۹/۱۵×(۵/۲-۵/۵-۳/۵)۴/۳۵ اغلب به صورت آزاد روی محیط کشت یا بر روی اسپوردوکیوم به رنگ کرم مایل به قهوه‌ای در روی محیط برگ میخک آگار مشاهده گردید.کلامیدوسپور در این گونه به صورت تکی به شکل گرد تا تخم مرغی و گاهی در زنجیره‌های دوتایی تا سه تایی به ابعاد (۱۱-۷)۹×(۸/۵-۷)۷/۷۵ مشاهده گردیدند. این گونه خاک‌زاد بوده و پراکنش جهانی دارد و دارای تعداد زیادی میزبان از ۶۶ تیره گیاهی است و موجب بیماری‌های متنوعی مثل پژمردگی، بلایت و پوسیدگی‌های میوه، ریشه، و ساقه می‌شود. پراکنش این گونه چندان تحت تاثیر شرایط آب و هوایی نمی‌باشد و قادر است خود را با طیف وسیعی از دما و رطوبت تطابق دهد (Nelson *et al*, 1983). این گونه در ایران به عنوان یکی از عوامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز (Behrozin and Asadi, 1994) پوسیدگی سیب زمینی (Latani, 2006)، پوسیدگی ریشه گندم در منطقه گرگان (Zare and Ershad, 1997) و پوسیدگی ریشه و طوقه طالبی و خربزه در خراسان رضوی (Teimouri, 2011) معرفی شده است.

گونه *Fusarium oxysporum*

این گونه پس از *F. solani* با دارا بودن ۳۲/۰۵ درصد، بیش‌ترین فراوانی را داشته و از هر سه میزبان دارای علائم پژمردگی آوندی از تمامی مراحل رویشی این گیاهان جداسازی شد. مشخصات ظاهری پرگنه جدایه‌های گوناگون قارچ *F. oxysporum* در محیط PDA از نظر شکل ظاهری متنوع بودند. پرگنه قارچ به صورت میسلیومی پراکنده و تا حدودی پنبه‌ای و رنگ پرگنه از سفید تا صورتی و ارغوانی متغیر بود این تغییر رنگ از قسمت پشت ظرف پتری کاملاً نمایان بود. قطر پرگنه پس از ۷۲ ساعت نگهداری در تاریکی و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در محیط PDA بین ۲/۵- ۳سانتی متر بود. میکروکنیدی به تعداد زیاد و عموماً تک سلولی ولی بندرت دو سلولی بیضی شکل به ابعاد (۱۱-۶/۵) ۸/۷۵ × (۵/۳-۲) ۲/۷۵ میکرومترکه به صورت مجتمع روی فیالیدهای کوتاه باریک بودند. ماکرو کنیدی‌ها اندکی خمیده که به تدریج در دو انتها باریک می‌شدند و سلول انتهایی آن قلاب مانند، دارای ۳ تا ۴ دیواره عرضی به ابعاد (۳۹-۲۳/۵) ۳۱/۲۵ × (۵-۳) ۴ میکرومتر به صورت آزاد روی محیط کشت یا بر روی اسپوردوکیوم به رنگ نارنجی روی محیط برگ میخک آگار مشاهده گردید. کلامیدسپورها به صورت تکی یا دو تایی و یا به شکل زنجیره‌های ۳-۲ سلولی در انتها یا وسط ریسه به ابعاد (۱۰-۶)۸×(۸-۶/۵)۷/۲۵ مشاهده گردید. گونه *F. oxysporum* همانند *F. solani* همه‌جا زی بوده و در اغلب مناطق مزروعی و اقلیم‌های معتدل یافت می‌شود. این قارچ عامل بیماری‌هایی از قبیل پژمردگی آوندی، مرگ ناگهانی و پوسیدگی ریشه و طوقه در گیاهان گوناگون می‌باشد (Nelson *et al.*, 1983). این قارچ با دارا بودن فرم‌های اختصاصی دامنه میزبانی وسیعی دارد. ۷ فرم اختصاصی این قارچ به کدوییان حمله می‌کند (Suarez *et al.*, 2004). در آزمون بیماری‌زایی، گیاهان مایه‌زنی شده با این قارچ علائم زردی و پژمردگی خفیف تا شدید و مرگ گیاهچه را نشان دادند. نتایج بدست آمده در آزمون تعیین فرم اختصاصی *F. oxysporum* نشان داد که با مایه زنی جدایه‌های بدست آمده از هندوانه، علائم مشخص بیماری پژمردگی فوزاریومی شامل پژمردگی آوندی و زردی تنها در گیاهچه‌های هندوانه مشاهده شد در نتیجه فرم اختصاصی این قارچ *F. oxysporum* f. sp. *niveum* تشخیص داده شد. بیماری پژمردگی فوزاریومی هندوانه از مهم‌ترین بیماری‌های هندوانه در مناطق رشد این گیاه در سراسر جهان می‌باشد (Suarez *et al*, 2004). هم‌چنین با مایه‌زنی جدایه‌های بدست آمده از طالبی و خربزه، علائم پژمردگی آوندی و زردی تنها در طالبی و خربزه مشاهده شد و در سایر میزبان‌ها علائم بیماری مشاهده نشد و در نتیجه فرم اختصاصی این قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* تشخیص داده شد. این نتایج مطابق با نتایج تحقیقات قبل بود (Teimouri, 2010) (شکل۴). قارچ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* عامل پژمردگی فوزاریومی، خربزه اولین بار در ایران در سال ۱۳۴۷ از مشهد گزارش شد. این بیماری در نقاط معتدله و سردسیر شایع است و هم‌چنین در فرانسه، ایتالیا، اسپانیا، کانادا و امریکا خسارت زیادی وارد می‌کند (Risser *et al.*, 1976). فرم‌های اختصاصی *F. oxysporum* انگل اختصاصی ریشه میزبان یا میزبان‌های خاص هستند که روی گیاه غیر میزبان قادر به ایجاد بیماری نیستند (Banihashemi, 2009).

گونه *Fusarium equiseti*

این گونه با ۳/۸۴ درصد، نسبت به سایر گونه‌ها از فراوانی کمتری برخوردار بود و تنها از میزبان طالبی و از مراحل رویشی گیاهچه و میوه‌دهی جداسازی گردید. در آزمایش بیماری‌زایی در گیاهچه‌های طالبی علائم زردی و پژمردگی برگ‌های پایینی و پوسیدگی ریشه و طوقه مشاهده گردید. با کشت مجدد گیاهان آلوده در محیط کشت PDA قارچ عامل بیماری مجددا جداسازی گردید. رنگ پرگنه این قارچ ابتدا سفید و سپس زرد مایل به قهوه‌ای و در سطح زیرین پتری قرمز سوخته مایل به سیاه می‌باشد. این گونه میسلیوم‌های پنبه‌ای و افراشته تولید می‌کند. میزان رشد پرگنه روی محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد پس از گذشت ۷۲ ساعت در تاریکی ۳/۵-۲/۴سانتی متر بود. در این قارچ میکروکنیدی بسیار نادر و ماکرو کنیدی بسیار فراوان و به صورت باریک و سوزنی شکل بر روی اسپوردوکیوم نارنجی رنگ تشکیل می‌شود. ماکرو کنیدی‌ها دارای ۵-۳ دیواره عرضی به ابعاد (۴/۸-۳/۵)۴/۱۵×(۴۵-۲۲)۳۳/۵ میکرومتر می‌باشد. ماکرو کنیدیها داسی شکل و سلول پایه آن حالت پاشنه‌ای شکل و سلول انتهایی باریک و طویل است. در این گونه کلامیدوسپورها به فراوانی به صورت زنجیری، تکی یا دوتایی به قطر (۱۴-۹/۵)۱۱/۷۵ میکرومتر می‌باشد. این قارچ از ریشه، ساقه، برگ و دیگر بخش‌های تعداد زیادی از گونه‌های گیاهی

نظیر لوبیا چشم بلبلی (Aigbe and Fawole, 1999) و سویا (Gally *et al*., 1998) جدا شده است و هم‌چنین این قارچ علاوه بر ریشه و طوقه، باعث آلودگی غده و میوه شده و از ریشه‌های آسپاراگوس (مار چوبه) و گندم نیز جدا شده است (Vujanovic *et al*., 2006). این قارچ به عنوان عامل لکه برگی منداب از ایتالیا (Garibaldi *et al*., 2011) گزارش شده است و در ایران از پنبه، زیره سبز، سیب زمینی (Latani, 2006) و ریشه و طوقه خربزه و طالبی (Teimouri, 2010) گزارش شده است.

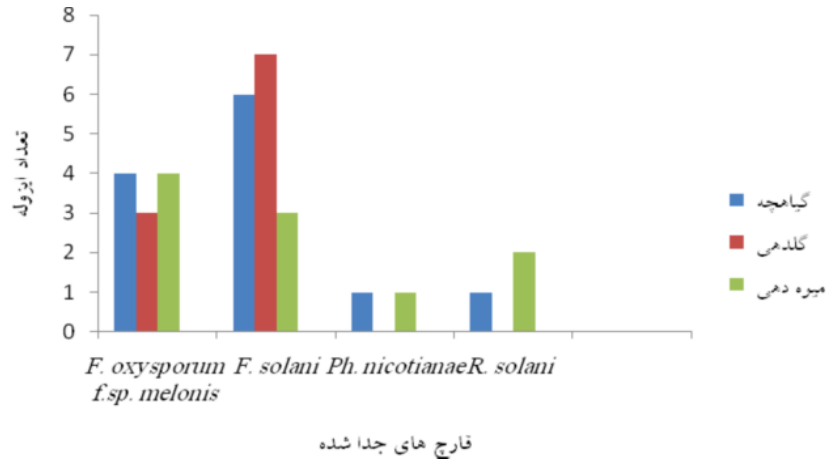
گونه *Phytophthora nicotianae*

این گونه از هر سه میزبان هندوانه، خربزه و طالبی و از تمامی مراحل رویشی این گیاهان از گیاهچه تا میوه‌دهی جداسازی گردید. کلنی این قارچ روی محیط کشت آگار دار رشد متوسطی دارد. منظره رویشی جدایه یکنواخت، کم و بیش پنبه‌ای و از قسمت پشت پتری منظره‌ای بدون ساختار دارد. ریسه‌ها تقریبا یکنواخت و دارای انشعاباتی با زاویه حاده و یا قائمه می‌باشند. قطر ریسه‌ها (۵-۱/۸)۳/۴ میکرومتر اندازه گیری شد. آماس ریسه در محیط کشت PDA مشاهده شد ولی در محیط-های مایع بیش‌تر تولید شد و به اشکال کروی یا تخم مرغی و به صورت منفرد و یا چند تایی دیده می‌شوند. قطر توررم ریسه (۲۴-۱۱)۱۷/۵ میکرومتر اندازه گیری شد.کلامیدوسپورها به تعداد زیاد در محیط کشت مایع بوجود می‌آیند و به اشکال کروی گاهی مایل به بیضوی دیده شدند. قطر کلامیدوسپورها (۴۰-۱۵)۲۷/۵ میکرومتر است. اسپورانژیوم‌ها اغلب کروی یا تخم مرغی به ابعاد ۳۰-۱۹×۲۴/۵-۵۰ میکرومتر، دارای یک و به ندرت دو پاپیل بودند. نسبت طول به عرض اسپورانژیوم‌ها ۱/۳ بود. دماهای ویژه رشد ریسه این گونه به ترتیب کمینه ۱۰، بهینه ۳۰-۲۵ و بیشینه ۳۶ درجه سانتیگراد تعیین گردید (شکل ۵). ااگون‌های این قارچ کروی و قطر آنها (۳۳-۲۷)۳۱ میکرومتر اندازه گیری شد. آنتریدی‌های این قارچ آمفیژن و شکل آنها متغیر اغلب بیضی تا کروی و ابعاد آنها (۲۱-۱۱)۱۶ میکرومتر تعیین شد. شروع علائم چند روز بعد از مایه‌زنی گیاهچه‌ها بسته به میزبان متفاوت بود. علائم پژمردگی و پوسیدگی طوقه و ریشه ابتدا در گیاهچه‌های طالبی، سپس در گیاهچه‌های خربزه و در نهایت در گیاهچه‌های هندوانه ۵ تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی مشاهده شد (شکل۶). این تفاوت در بروز علائم بیماری به‌دلیل تفاوت در مقاومت میزبان‌ها در برابر قارچ عامل بیماری می‌تواند باشد. گونه *Ph. nicotianae* از بیش از ۷۰ گونه گیاهی از قبیل هندوانه، بادمجان، گوجه فرنگی، لوبیا، جعفری، پاپایا، توتون و برخی از گیاهان زینتی مثل بنت قنسول گزارش شده است (Yoshimura *et al*., 1985). این گونه از روی کدو و هندوانه در گرگان، خیار و فلفل در شندآباد، گوجه‌فرنگی از تهران و شهریار، آذربایجان‌غربی، گرگان، هم‌چنین از روی زردآلو در فارس، سویا در گرگان، گندم در کرج و ورامین، پسته در یزد، چغندر در مرودشت و عجب شیر و از ریشه و ساقه تعدادی از گیاهان زینتی جداسازی شده است (Taheri, 2010).

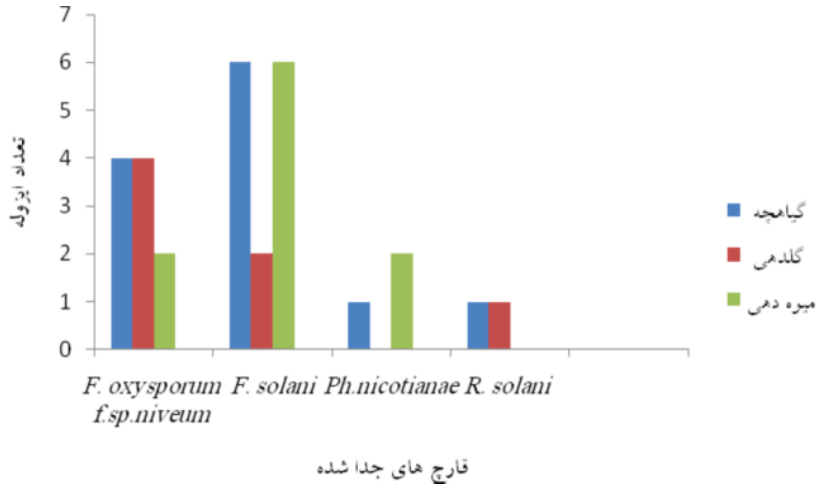
گونه *Rhizoctonia solani*

این گونه از هندوانه در مراحل گیاهچه و گلدهی و از خربزه در مرحله رویشی میوه‌دهی جداسازی گردید. رنگ کلنی این قارچ ابتدا بی‌رنگ و تقریبا کرم و با گذشت زمان به زرد و قهوه‌ای تغییر کرد. قطر ریسه جدایه‌های *R. solani* بین ۶ تا ۷ میکرومتر اندازه گیری شد. هسته‌ها پس از رنگ آمیزی به رنگ نارنجی تا قرمز مشاهده شدند. تعداد هسته‌ها در هر سلول به طور متوسط ۴ عدد مشاهده شد. علائم بیماری در گیاهچه‌های خربزه ۶ تا ۸ روز و در گیاهچه‌های هندوانه ۸ تا ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی در ناحیه طوقه و ریشه گیاهچه‌های به صورت پوسیدگی‌هایی به رنگ قهوه‌ای مشاهده شد. با کشت نواحی آلوده در محیط کشت PDA قارچ عامل بیماری مجدداً جداسازی گردید. گونه *R. solani* در سراسر جهان پراکنده است و تعدادی از مخربترین بیمارگرهای گیاهی را شامل می‌شود (Ohkura *et al*, 2009). این قارچ از لحاظ ژنتیکی بسیار متنوع است و در محصولات کشاورزی با ارزش، طیف وسیعی از بیماری‌ها را ایجاد می‌کند (Cubeta and Vilgalys, 1997). این گونه از کدوییان گوناگون در خوزستان (Nasrollahnezhad, 1996) و سیستان و بلوچستان (Safarnezhad, 2004) و از طالبی و خربزه در برزیل (Michereff, 2008) هم‌چنین از محصولات دیگری چون برنج، گندم، پنبه، چغندر قند، حبوبات، هویج، کلم، ذرت، سویا، توت‌فرنگی، فلفل، سیب زمینی، تربچه، پسته، و انواع چمن‌ها در سراسر دنیا گزارش شده است (Sneh *et al*, 1991). با توجه به اهمیت این عوامل بیماری‌زا و وجود گونه‌های گوناگون قارچی در محصولات جالیزی در سطح منطقه، مدیریت و کنترل این بیمارگرها و هم‌چنین تلاش برای تولید ارقام مقاوم و متحمل ضروری به‌نظر می‌رسد. اجرای مدیریت صحیح زراعی شامل

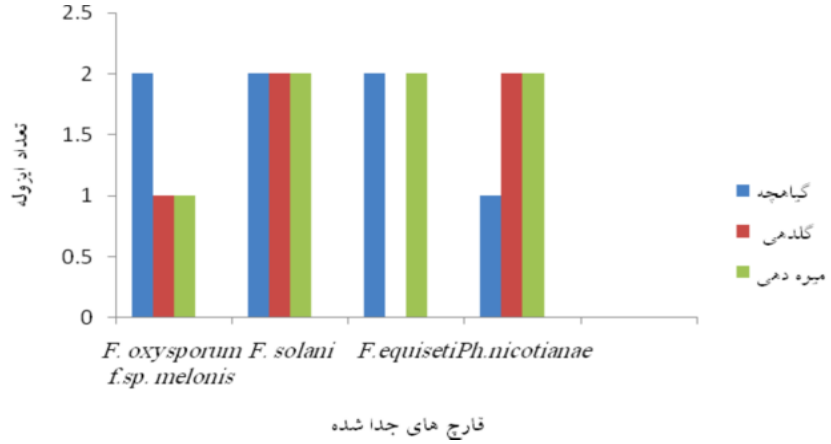
انتخاب خاک‌های سبک‌تر در محصولاتی با نیاز آبی شدید، نرم کردن بستر خاک به‌منظور جلوگیری از توقف آب، جلوگیری از آبیاری غرقابی سنگین و با فواصل کوتاه در کاهش بیماری مفید خواهد بود. با استفاده از ارقام مقاوم، روش‌های مناسب آبیاری، کودهای آلی و شیمیایی می‌توان خسارت حاصل از این قارچ‌ها را به حداقل رساند و در نتیجه کمیت و کیفیت محصولات را ارتقا بخشید.



شکل ۱- گونه‌های قارچی جداسازی شده طی مراحل گوناگون رویشی خربزه.



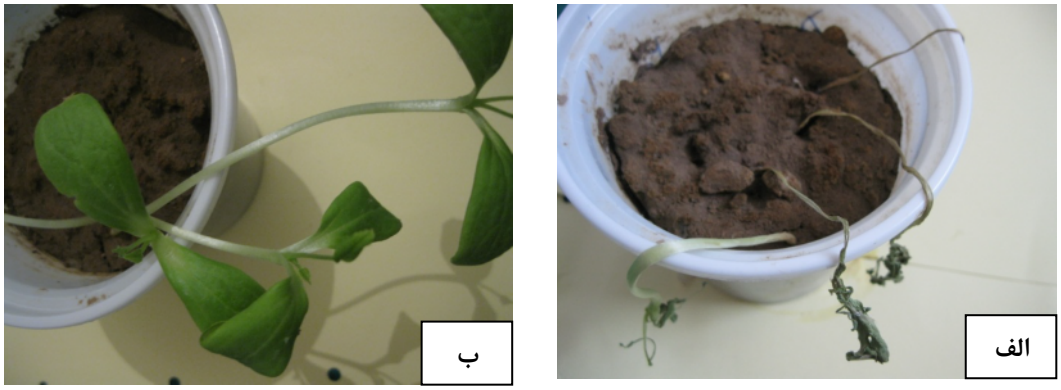
شکل۲- گونه‌های قارچی جداسازی شده طی مراحل گوناگون رویشی هندوانه.



شکل ۳- گونه‌های قارچی جداسازی شده طی مراحل گوناگون رویشی طالبی.

شکل ۴- الف) علائم پژمردگی در گیاهچه‌های طالبی مایه‌زنی شده با *F. oxysporum* . ب) شاهد.

شکل ۵- میزان رشد شعاعی روزانه گونه *Ph. nicotianae* در دماهای گوناگون.



شکل ۶ – الف) علائم پژمردگی در گیاهچه‌های هندوانه مایه‌زنی شده با *Ph. nicotianae*. ب) شاهد.

References

1. Agrios GN. 2005. Plant Pathology. 5th ed. New York: Academic Press. 635 p.
2. Aigbe SO, Fawole B and Berner DK. 1999. A cowpea seed rot disease caused by *Fusarium equiseti* identified in Nigeria. Plant Disease 83: 964 (Abstract).
3. Aegerter BJ, Gordon TR and Davis RM. 2000. Occurrence and pathogenicity of fungi associated with melon root rot and vine decline in California. Plant Disease 84: 224–230.
4. Alexopoulos GJ, Mims GW and Blackwell M. 1996. Introductory Mycology. 4th ed. London: John Wiley & Sons, Inc. 868 p.
5. Banihashemi SZ. 2009. Reaction of *cucumis melo* cultivars to races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* the cause of melon vascular wilt. Iranian Journal of Plant Pathology 46: 11–22.
6. Beckman CH. 1987. The Nature of Wilt Diseases of Plants. St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press. 175 p.
7. Behrozin M and Asadi P. 1994. Report on three *Fusarium* species as the causal agent of the basal root rot of onion and their distribution in East Azarbaijan. Iranian Journal of Plant Pathology 3: 41–49.
8. Behdad E. 2006. Phytopathology And Important Plant Disease In Iran. Tehran: Atr-e-Etrat Publication. 800 p.
9. Cooke DE, Schena L and Caccipla SO. 2007. Invited review tools to detect, identify and monitor *Phytophthora* species in natural ecosystems. Plant Pathology 89: 13–28.
10. Cubeta MA and Vilgalys R. 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. Phytopathology 87: 480–484.
11. Elmer WH, Covert SF and Donnell K. 2007. Investigation of an outbreak of *Fusarium* foot and fruit rot of pumpkin within the United States. Plant Disease 91: 1142–1146.
12. Erwin DC and Ribeiro OK. 1996. *Phytophthora* Diseases Worldwide. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press. 563p
13. Ershad J. 1992. *Phytophthra* Species in Iran. Ministry of Agriculture. Tehran: Agricultural Research Organization. 217 p.
14. Gally T, Gonzalez B and Soberoy Rojo MB. 1998. Plumele soft rot caused by *Fusarium equiseti, F. oxysporum*, and *F. pallidoroseum* on soybean seedlings in Argentina. Plant Disease 82: 1063 (Abstract).
15. Garibaldi A, Gilardi G, Bertoldo C and Gullino ML. 2011. First report of leaf spot of rocket (*Eruca sativa*) caused by *Fusarium equiseti* in Italy. Plant Disease 95: 1315 (Abstract).

16. Hansen HN and Smith RE. 1932. The mechanisms of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinerea*. Phytopathology 37: 369–371.
17. Jahanbakhsh V. 1998. Investigation on foot and root rot of honeydew melon in Khorasan provinces [MSc]. [Mashhad, Iran]: University of Ferdowsi Mashhad.
18. Pivonia S, Cohen R, Kafkafi U, Ben Ze'ev IS and Katan J. 1997. Sudden wilt of melons in southern Israel: Fungal agents and relationship with plant development. Plant Disease 81: 1264–1268.
19. Leslie JF and Summerell BA. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. Oxford: Wiley-Blackwell. 388p.
20. Latani S, Taheri AH and Rahnama K. 2006. Identification and pathogenicity of *Fusarium* species isolated from root and crown of potato in Gorgan area. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 13: 115–126.
21. Michereff SJ, Andrade DE and Junior RS. 2008. Reaction of melon genotypes to *Rhizoctonia solani*. Horticultura Brasileira 26: 639–643.
22. Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* Species-An Illustrated Manual for Identification. Pennsylvania: Pennsylvania State University Press. 193 p.
23. Nasrollah nezhad S. 1996. An investigation on fungal root and crown rots of cucurbits in Khuzestan province. [MSc]. [Khuzestan, Iran]: University of Shahid Chamran.
24. Ohkura M, Abawi GS, Smart CD and Hodge KT. 2009. Diversity and aggressiveness of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-like fungi on vegetables in New York. Plant Disease 93: 615–624.
25. Risser G, Banihashemi Z and Davis DW. 1976. A proposed nomeclature of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* races and resistance genes in *cucumis melo*. Phytopathology 66: 1105–1106.
26. Safarnezhad MR. 2004. Investigation root rot of cucurbits in sistan region. Paper presented at: 16th Iranian Plant Protection Congress; August 28- September 1; Tabriz, Iran.
27. Sneh B, Burpee L and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. St. Paul, Minnesota: American Phytopathological Society Press. 133 p.
28. Stamps DJ, Waterhouse GM, Newhook FJ and Hall GS. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycological Papers 162: 1-28.
29. Shekari F, Masiha S and Esmailpour B. 2006. The Physiology of Vegetable Crops. Zanjan: Zanjan University Press. 394 p.
30. Suarez-Estrella F, Vargas-Garcia MC, Lopez MJ and Moreno J. 2004. Survival of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* on plant waste. Crop Protection 23: 127–133.
31. Taheri M. 2010. Identification of *Phytophthora* species from some crops in Gorgan region [MSc]. [Gorgan, Iran]: Gorgan University of Agricalture and Natural Resource.
32. Tomaso-Peterson M and Trevathan LE. 2004. *Rhizoctonia solani* AG-13 isolated from corn in Mississippi. Plant Disease 88: 908 (Abstract).
33. Tsao PH and Guy SO. 1977. Inhibition of *Mortierella* and *Pythium* in a *Phytophthora* isolation medium containing hymexazol. Phytopathology 67: 796–801.
34. Teimouri S. 2010. Identification of the most fungal agents cause muskmelon wilting and damping off in Khorasan Razavi province [MSc]. [Gorgan, Iran]: Gorgan University of Agriculture and Natural Resource.
35. Teimuri S, Rahnama K, Hajian Shahri M and Afzali H. 2011. Identification, distribution and pathogenicity of *Fusarium* species isolated from root and crown of cantaloupe and melon in Khorasan Razavi province. Researches in Plant Pathology 1: 33–44.
36. Vujanovic V, Hamel C, Yergeau E and St-Arnaud M. 2006. Biodiversity and biogeography of *Fusarium* species from northeastern North American asparagus fields based on microbiological and molecular approaches. Microbial Ecology 512: 242–255.
37. Yoshimura MA, Uchida JY and Aragaki M. 1985. Etiology and control of poinsettia blight caused by *Phytophthora nicotianae* var. *parasitica* and *P. drechsleri*. Plant Disease 69: 511–513.
38. Zare R and Ershad D. 1997. *Fusarium* species isolated from cereal in Gorgan area. Iran Journal

of Plant Pathology 33: 1–14.
39. Zuniga TL, Zitter TA, Gordon TR, Schroeder DT and Okamoto D. 1977. Characterization of pathogenic races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* causing *Fusarium* wilt of melon in New York. Plant Disease 81: 592–596.