شناسایی نژاد ۱ قارچ *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* جدا شده از جالیز در استان‌های خراسان رضوی، شمالی و برخی از مناطق استان فارس به روش کلاسیک و مولکولی

محمدرضا عالی منش- ماهرخ فلاحتی رستگار- بهروز جعفرپور - عصمت مهدیخانی مقدم[1]

تاریخ دریافت ۸۵/۸/۷

چکیده

قارچ *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* از عوامل مهم بیماری زا در محصولات جالیزی مختلف (هندوانه، خربزه، طالبی، خیار، کدو) در سراسر دنیا است. این قارچ دارای نژادهای ۱ و ۲ می باشد که نژاد ۱ آن در ریشه، طوقه و میوه ایجاد پوسیدگی می کند ولی نژاد ۲ فقط در میوه بیماریزا است. در طی سال های زراعی ۱۳۸۴ - ۱۳۸۳ از ۱۰۱ مزرعه هندوانه و ۳۱ مزرعه جالیز دیگر (خربزه، خیار و طالبی) شهرستان های استان های خراسان رضوی، خراسان شمالی و برخی مناطق استان فارس نمونه برداری هایی از گیاهان مشکوك انجام شد. ۳۷ جدایه *Fusarium solani* از مراحل مختلف رویشی هندوانه، خربزه، خیار و طالبی تهیه گردید. آزمون بیماری زایی به روش Root-dipping در مرحله گیاهچه روی هر چهار محصول و گیاهچه کدو انجام شد و ۳۳ جدایه بیماری زا بدست آمد. آزمون اثبات فرم اختصاصی علاوه بر هندوانه، خربزه، خیار و طالبی روی گیاهچه های گوجه فرنگی، نخود و لوبیا (گیاهان غیرمیزبان) نیز انجام شد. در نهایت از ۳۳ جدایه، ۳۰ جدایه منحصراً در جالیز بیماری زا بود که *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* تشخیص داده شد. بیماری زایی این ۳۰ جدایه علاوه بر ریشه و طوقه روی میوه های خیار هم به اثبات رسید، در نتیجه در مناطق بررسی شده فقط نژاد۱ شناسایی شد. جهت تایید نتایج کارهای کلاسیک، تعیین نژاد با استفاده از پرایمر اختصاصی Fsc1 که براساس ژن *tef*-1α طراحی شده بود نیز انجام شد و صحت نتایج به اثبات رسید.

واژه های کلیدی: *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae*، نژادهای ۱و۲، آزمون بیماری زایی، Root-dipping، فرم اختصاصی، پرایمر اختصاصی Fsc1، ژن *tef*-1α

مقدمه

قارچ *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* از عوامل بیماری زای مهم در جالیز است. دامنه میزبانی آن شامل عمده محصولات جالیزی نظیر هندوانه، خربزه، طالبی، خیار و کدو می باشد و گیاهان جالیزی و میوه ها در هر مرحله از رشد می توانند آلوده شوند (۱و۲). تعیین نژاد این قارچ بر اساس تخصصی بودن به بافت میزبان صورت می گیرد و تا به حال دو نژاد برای آن شناسایی شده است که نژاد۱ آن روی ریشه، طوقه و میوه گیاهان جالیزی بیماری زا است در حالیکه، نژاد۲ فقط روی میوه گیاهان جالیزی ایجاد بیماری می کند(۶و۱۱). اولین گزارش نژاد۱ این عامل بیماری زا روی کدو در سال ۱۹۳۰ در جنوب آفریقا و سپس به ترتیب در آمریکا، اروپا، استرالیا، نیوزلند و ژاپن گزارش شد (۴، ۶، ۸، ۱۲، ۱۴و۱۵). نژاد۲ در نقاط محدودی از دنیا نظیر تونس گزارش شده است(۲). هر دو نژاد زخم های حلقوی نرم روی میوه جالیز ایجاد می کنند(۱). معمولاً علائم اولیه به صورت پژمردگی برگها در مزرعه ظاهر می شود و در طی چندین روز گیاه کاملاً خشک می گردد و می میرد. روی میوه علائم به صورت پوسیدگی سفید آبکی دیده شده، کم کم رنگ آن تیره می گردد(۲). این قارچ هر سه تیپ اسپور غیر جنسی شامل ماکروکنیدی، میکروکنیدی و کلامیدوسپور را تولید می کند و کلامیدوسپور های تولید شده ۲ تا ۳ سال در خاك پایداری خود را حفظ می کنند(۱). جدایه های *F.solani* عموماً هتروتالیک اند. اگر Mating type وجود داشته باشد فرم جنسی ظاهر می شود ولی آسکوکارپ این قارچ تا به حال در طبیعت دیده نشده است (۵). مرحله کامل این قارچ *Nectaria haematococca* Berk & Broome می باشد(۱۳). تا قبل از این تحقیق وضعیت فرم اختصاصی و نژادهای *F. solani* در مزارع جالیز کشور مشخص نشده بود و اطلاع دقیقی از آلودگی در مزارع جالیز

۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استادان و استادیار دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

شهرستانهای استان های خراسان رضوی ، خراسان شمالی و فارس وجود نداشت. هدف اولیه این تحقیق تعیین فرم اختصاصی، نژاد و مناطق آلوده به این قارچ در استان های مذکور و سپس تعیین نژاد به روش مولکولی (با استفاده از پرایمر اختصاصی Fsc1)و مقایسه آن با روش کلاسیک بود.

مواد و روش ها

در فصل زراعی۱۳۸۴-۱۳۸۳ از ۱۳۲ مزرعه گیاهان جالیزی (هندوانه، خربزه، طالبی و خیار) در مناطق عمده جالیزکاری استان های خراسان رضوی (شهرستان های مشهد، فریمان، سرخس، چناران، تربت حیدریه، سبزوار، نیشابور، خواف، رشتخوار، تربت جام، کاشمر و قوچان)، خراسان شمالی (شهرستان های بجنورد، اسفراین، جاجرم و سنخواست) و برخی شهرستان های استان فارس (شیراز، استهبان، فسا و مهارلو) نمونه برداری صورت گرفت، به این نحو که در قطرهای مزرعه حرکت کرده و از هر مزرعه ده بوته مشکوک برداشته شد. بوته های آلوده هر مزرعه به طور جداگانه در پاکتهای کاغذی قرار گرفته و به آزمایشگاه منتقل گردیدند و در دمای ۴ درجه سانتیگراد در یخچال نگهداری شدند. ریشه، طوقه و میوه های مشکوك آلوده شستشوی سطحی شده و از مرز ناحیه بافت سالم و آلوده قطعاتی چند میلی متری تهیه گردید و با هیپوکلریت سدیم۱٪ به مدت ۱ تا ۲ دقیقه ضدعفونی سطحی انجام گرفت. نمونه ها پس از ضدعفونی با آب مقطر سترون شستشو شده و بعد از خشک شدن، به محیط کشت PDA[1] منتقل و در دمای۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. یک تا دو روز بعد قارچ عامل بیماری روی محیط کشت رشد نمود. جدایه های قارچ بعد از تک اسپورشدن برای نگهداری به مدت چند ماه به لوله های آزمایش حاوی محیط غذاییSNA[2] منتقل گردیدند. شناسایی *F.solani* بر اساس شکل و رنگ پرگنه، رنگ اسپوردوکیوم (در محیط CLA[3]) و مشخصات اندامهای زایشی مثل اندازه و شکل ماکروکنیدی های تولید شده در اسپور دوکیوم، فیالیدها، میکروکنیدی ها و کلامیدوسپورها بر اساس کلیدهای گرلاخ و نیرنبرگ(۷) و نلسون و همکاران (۱۳) صورت گرفت. آزمون بیماری زایی جهت مشخص کردن جدایه های بیماری زا روی گیاهچه های جالیزی شامل هندوانه (رقمPOP)، خربزه، (رقم خاتونی)، طالبی (رقم تیل مشهد)، خیار(رقم بتا آلفا) و کدو مسمایی به روش فروبردن ریشه گیاهچه در سوسپانسیون اسپور[4] انجام شد. بدین نحو که کلیه جدایه ها برروی محیط کشت هایPDB [5] کشت شدند و به مدت ۱۴ روز در دمای اتاق (حدود ۲۵درجه سانتیگراد) روی شیکر با دور آرام قرار گرفتند، بعد از تولید اسپور، سوسپانسیون اسپوربا غلظت[6] 1×10^{6} کنیدی در میلی لیتر توسط لام هموسایتومتر[6] تهیه شد (۱) . بذرهای جالیز توسط هیپوکلریت سدیم ۱٪ برای ۵ دقیقه ضدعفونی شدند و سپس در گلدان های حاوی خاك سترون(به نسبت مساوی خاك، خاك برگ و ماسه) کاشته شدند. بعد از ظهور برگهای اولیه یعنی ۱۴ روز بعد از کشت، گیاهچه ها از خاك بیرون آورده شدند و ریشه ها خوب شستشو شده و به مدت ۳۰ ثانیه در سوسپانسیون اسپور قارچ قرار گرفتند و سپس گیاهچه ها داخل گلدان های مربوطه نشاء گردیدند. تعداد گیاهچه های مایه زنی شده ۴ با سه تکرار(۳ گلدان) بود. ریشه گیاهچه های شاهد به جای سوسپانسیون اسپور در آب مقطر قرار داده شدند. ۲۱ روز بعد گیاهچه های دارای علائم و فاقد علائم به آزمایشگاه منتقل گردیدند و جداسازی قارچ طبق اصول کخ انجام گرفت(۲). به منظور تعیین دامنه میزبانی، جدایه های *F.solani* که در گیاهان جالیزی بیماری زایی آنها به اثبات رسیده بود انتخاب، و روی گیاهان گوجه فرنگی، نخود و لوبیا (که هر سه از میزبانهای دیگر *F.solani* هستند) و هندوانه (شاهد) مایه زنی شدند. تمام شرایط مانند شرایط آزمون بیماری زایی روی گیاهچه جالیز بود. تعیین نژاد بر اساس تخصصی بودن به بافت میزبان به روش بوقالب (۲) انجام شد، بدین نحو که قطعاتی به ابعاد ۰/۵ سانتی متر از محیط PDA حاوی کشت ۱۴ روزه قارچ روی پوست میوه(بدون خراش پوست) قرار داده شد و اطراف آن با پارافیلم مسدود گردید، سپس میوه ها در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در انکوباتورتاریک قرار گرفت(۲)، در نمونه های شاهد به جای محیط کشت PDAحاوی قارچ فقط از محیط کشت PDA استفاده شد. بعد از شناسایی فرم اختصاصی و نژاد به روش کلاسیک، تعیین نژاد و

1) Potato Dextros Agar
2) synthetic Nutrient Agar
3) Carnation leaf Agar
4)Root- dipping
5) Potato Dextrose Broth
6) Hemacytometer

فرم اختصاصی به روش مولکولی با استفاده از پرایمر Fsc1 که بر اساس ژن *tef*-lα[1] برای جدایه های آمریکا طراحی شده بود، نیز انجام شد(۱۰). توالی این پرایمر به صورت زیر است:

Fsc1-EF1 (forward):

5' GCTAACAATCATCTACAGAC 3'

Fsc1-EF2 (reverse):

5' GACGGATGAGAGAGCAAC 3'

برای استخراج DNA قارچ ابتدا قطعه ای از میسلیوم قارچ از محیط PDA به محیط PDB منتقل شد و به مدت سه روز روی شیکر با دور آرام و دو هفته در زیر نور قرار گرفت، از میسلیوم تولید شده در محیط PDB به روش CTAB[2] استخراج DNA صورت گرفت. بررسی حضور یا عدم حضور DNA و نیز تعیین عدم شکستگی DNAی نمونه های استخراج شده، با الکتروفورز آنها بر روی آگارز ۱٪ انجام شد. برای بررسی کیفیت و کمیت DNA از دستگاه اسپکتروفتومتر استفاده گردید. نسبت جذب نور در طول موج ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر بین ۱/۸ تا ۲ گویای کیفیت مناسب DNA در نظر گرفته شد(۹). جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر کمیت DNA را مشخص کرد که در انتها جهت انجام PCR، DNA با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر رقیق شد. تکثیر در دستگاه ترموسایکلر (مدل Biometra Germany) و با برنامه حرارتی ۱۰ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۳۵ سیکل با ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد و ۱ دقیقه در ۵۶ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد و مرحله تکثیر نهایی با ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد انجام شد. مقدار مواد مورد استفاده در هر واکنش ۵۰ میکرولیتری PCR در جدول ۱ ذکر گردیده است. محصولات PCR روی ژل اکریلامید ۸٪ جهت تخمین اندازه قطعات تکثیر شده برده شدند.

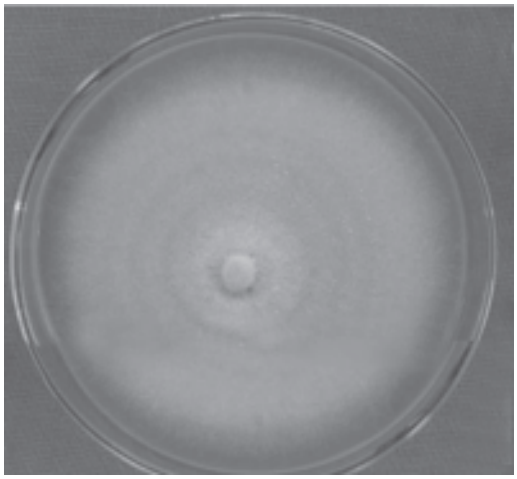
نتایج و بحث

شناسایی *Fusarium solani*: در اکثر جدایه ها تشکیل اسپوردوکیوم های کرم رنگ از مشخصات ظاهری اصلی تشخیص گونه *F.solani* بود. البته در برخی از جدایه ها اسپوروکیوم سبزرنگ یا اسپوردوکیومی که ابتدا کرم و بعد سبز رنگ گردید قابل مشاهده بود که این مورد با کلید برگس و همکاران(۳) مطابقت

جدول(۱) مقدار مواد مورد استفاده درهر واکنش ۵۰ میکرولیتری PCR

Reagent	Per rxn (µl)	Final conc.
10X PCR buffer	5.00	1X
$MgCl_2$ (25mM)	4.00	2.0 mM
dNTPs (2mM)	5.00	0.2 mM
Forward (10mM)	0.50	0.1 mM
Reverse (10 mM)	0.50	0.1 mM
BSA (100X)	0.50	1X
ddH_2O	32.30	
Ampli-taq (5u/µl)	0.20	1u/50µl
DNA	2.00	50 ngr/ µl
TOTAL	50.00	

داشت. اکثر جدایه ها تولید پرگنه با دوایر متحدالمرکز روی محیط PDA کردند(شکل ۱).



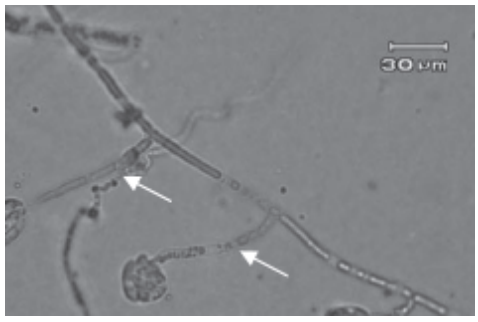
شکل(۱) تولید دوایر متحدالمرکز در پرگنه قارچ *F.solani* (جدایه ۳۰) روی محیط PDA

ماکروکنیدی های فراوان روی اسپوردوکیومهای کرم رنگ تولید شدند که دارای دیواره های ضخیم، غالباً سیلندری و کشیده بودند. سلول انتهایی مخروطی کند و درشت بود و سلول پایه، گرد یا به طور مشخصی پاشنه ای شکل و یا دارای فرورفتگی بود. طول ماکروکنیدی ها حدود ۴۸-۳۸ میکرومتر و عرض آنها در حدود ۵-۳/۷ میکرومتر بود و ماکروکنیدی ها معمولاً ۳ تا ۵ دیواره عرضی داشتند (عموماً ۴ دیواره عرضی) (شکل ۲). میکروکنیدی ها به تعداد زیاد، عموماً تک سلولی (شکل ۴A) به صورت مجتمع و بر روی فیالیدهای بلند و ساده (شکل ۳) و یا در سرهای دروغین تشکیل شدند. شکل آنها تخم مرغی، لوبیایی

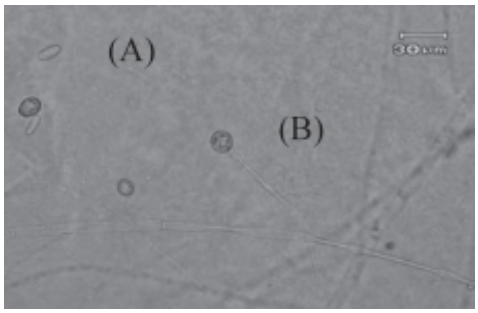
1) Translation Elongation Factor 1-alpha

2) Ctyl Trimethy Ammonium Bromide

شکل(۲) ماکروکنیدی های *F.solani* تشکیل شده در سطح محیط کشت CLA بعد از ۱۴ روز (خط مقیاس ۳۰ میکرومتر)



شکل(۳) فیالیدهای بلند در *F.solani* (خط مقیاس ۳۰میکرومتر)



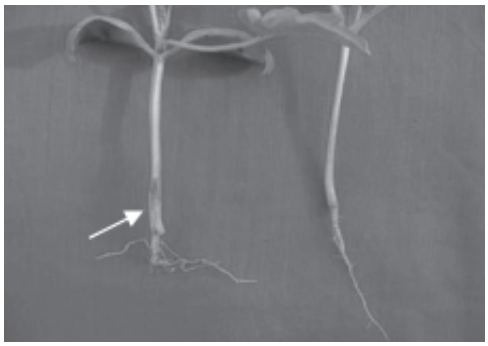
شکل(۴) (خط مقیاس ۳۰ میکرومتر)
A: میکروکنیدی
B: کلامیدوسپور انتهایی

و یا بیضی شکل بود. کلامیدوسپورها عموماً بعد از ۲ هفته ظاهر می شدند و به صورت تکی، دوتایی چندتایی و در وسط یا انتهای هیف (شکل ۴B) و در وسط یا انتهای ماکروکنیدی ها و میکروکنیدی ها تشکیل گردیدند.

از ۱۳۲ مزرعه بررسی شده در شهرستان های هر سه استان ۱۲۲ جدایه، جنس *Fusarium* بدست آمد که غالب آنها *F.oxysporum* بودند (۸۵جدایه)، ۳۷ جدایه *F.solani* مربوط به ۳۷ مزرعه از شهرستان های مختلف یا بخش ها و روستاهای هر شهرستان بدست آمد (شکل ۱).

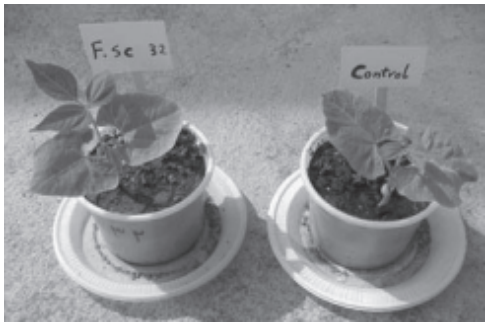
آزمون بیماری زایی: از ۳۷ جدایه، ۳۳ جدایه در تمام تکرارها بیماری زا بودند(شکل ۵) و علائم مرگ گیاهچه یا زخم هیپوکوتیل دیده شد(شکل ۶). جدایه های غیربیماری زا در هیچ تکراری بیماری زا نبودند.

شکل(۵) آزمون بیماری زایی روی گیاهچه هندوانه (سمت چپ شاهد و سمت راست تیمار)



شکل(۶) الف: سمت راست شاهد و سمت چپ علائم زخم هیپوکوتیل روی گیاهچه جالیز که با پیکان مشخص شده است.

آزمون اثبات فرم اختصاصی: ۳۰ جدایه، منحصراً روی جالیز بیماری زایی داشتند که به عنوان *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* شناخته شدند(۲و۱۵)(شکل۷).



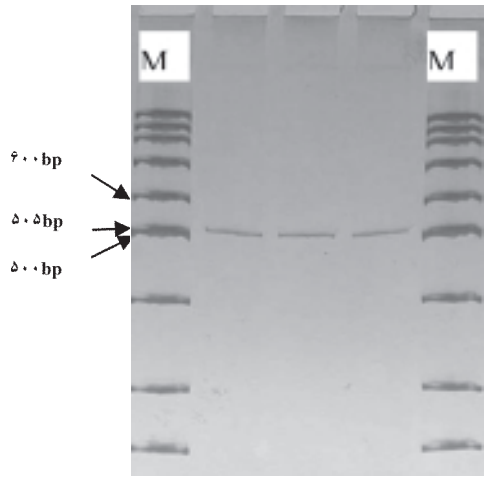
شکل(۷) آزمون اثبات فرم اختصاصی روی گیاهچه لوبیا (سمت راست شاهد و سمت چپ تیمار)

تعیین نژاد : نژاد ۱ روی ریشه، طوقه، گیاهچه و میوه جالیز و نژاد ۲ فقط روی میوه جالیز بیماری زا است ولی تمام جدایه های بیماری زای *F.solani* در این تحقیق از ریشه، طوقه و گیاهچه جالیز بدست آمده بود و در طی بررسی های انجام شده از میوه های جالیز مشکوك به آلودگی، قارچ *F.solani* جدا نگردید، بنابراین نژاد۲ در مناطق مورد بررسی وجود نداشت. هر ۳۰ جدایه بیماری زا هم روی میوه خیار و هم روی گیاهچه خیار قادر به ایجاد بیماری بودند بنابراین نژاد۱ تشخیص داده شدند (۱و۱۵) (شکل۸).

شکل(۸) آزمون بیماری زایی روی میوه خیار (سمت راست شاهد و سمت چپ تیمار)

استفاده از پرایمر اختصاصی جهت تعیین نژاد : پرایمر اختصاصی که جهت تعیین نژاد۱ قارچ *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* استفاده شد باند مورد نظر (۵۰۵bp) را روی ژل پلی اکریلامید ۸٪ برای تمام جدایه ها ایجاد کرد(شکل۹) و صحت عملکرد آن برای جدایه های مناطق بررسی شده ایران به اثبات رسید. پرایمر Fsc1 با استفاده از جدایه های آمریکا طراحی شده بود و جدایه های مناطق مختلف دنیا ممکن است با هم تفاوت داشته باشند(۱۰) بنابراین این پرایمر برای جدایه های ایران هم آزمایش شد.

با توجه به اینکه در روش های مولکولی امکان تشخیص دقیق تر و سریع تر عوامل بیماریزای گیاهی وجود دارد این روش ها به روش های کلاسیک ترجیح داده می شود(۵). ژن *tef*-1α که پرایمر بر اساس آن طراحی شده جزء ژن های کد کننده پروتئین های حفظ شده می باشند که در ترجمه اسکلت سیتوپلاسمی نقش دارند و



شکل(۹) پرایمر اختصاصی و باند مورد نظر روی ژل اکریلامید ۸٪ (M: سایز مارکر)

دارای اینترون های زیادی هستند، در حقیقت اینترونها جزء مناطق تغییر پذیر می باشند، و پرایمرها بر اساس مناطق اگزونی طراحی می شوند(۸). در این تحقیق مشخص شد که روش مولکولی، با روش کلاسیک انطباق دارد و در مورد جدایه های ایران و آمریکا یکسان عمل می کند، در نتیجه می توان از آن به جای روش کلاسیک برای تشخیص جدایه های ایران استفاده کرد. نام شهرستان ها و محل هایی که آلوده به این قارچ بودند در جدول(۲) آمده است. از روستاها و مناطق مختلف دو شهرستان سرخس و خواف در خراسان رضوی بیشترین جدایه های قارچی بدست آمد. این قارچ در اقلیم مرطوب ومزارع غیر دیم بیشتر خسارت می زند ولی از مزارع کشت آبی در اقلیم خشک مانند شهرستان خواف نیز جدایه های زیادی به دست آمد. شهرستان ها ومناطقی که به نام آنها در جدول (۲) اشاره نشده، فاقد مزارع آلوده به جدایه های بیماریزای قارچ *Fusarium solani* بودند. در این تحقیق برای اولین بار در ایران مشخص شد که مانند اکثر مناطق دنیا در مناطق بررسی شده در کشور نیز نژاد۱ قارچ *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* وجود دارد. نژاد۲ این قارچ در هیچکدام از مناطق بررسی شده در این تحقیق مشاهده نشد. با توجه به طولانی بودن روش کلاسیک و تغییرپذیر بودن آن با تغییر شرایط محیط، می توان از روش مولکولی با استفاده از پرایمر اختصاصی طراحی شده بر اساس ژن *tef*-1α جهت تشخیص فرم اختصاصی و نژاد ۱ جدایه های *F.solani* بیماری زا در گیاهان جالیزی استفاده کرد.

جدول(۲) جدایه هایی که به روش کلاسیک و مولکولی به عنوان نژاد ۱ شناخته شدند

شماره	کد جدایه	محل نمونه‌برداری	منطقه	میزبان	مرحله رشدی گیاه	قسمت جدا شده گیاه
۱	۳۰	استهبان	گرده	هندوانه	گلدهی	ریشه
۲	٤۱	مهارلو		طالبی	میوه دهی	طوقه
۳	۵۰	خواف	چهارده	هندوانه	میوه دهی	ریشه
٤	۵۲	خواف	چالیندر	هندوانه	میوه دهی	ریشه
۵	۵۸	خواف	حومه	هندوانه	میوه دهی	ریشه
٦	٦۱	تربت حیدریه	حومه	هندوانه	چند برگی	ریشه
۷	٦۷	سبزوار	جوین	هندوانه	میوه دهی	ریشه
۸	۷۰	مشهد	آبروان	هندوانه	گیاهچه	هیپوکوتیل
۹	۷۱	سرخس	جاده گمرک	هندوانه	میوه دهی	ریشه
۱۰	۷۲	سرخس	مزارع شمالی	هندوانه	میوه دهی	ریشه
۱۱	۷۳	مشهد	حومه	هندوانه	گیاهچه	هیپوکوتیل
۱۲	۷٦	سرخس	نوبنیاد	هندوانه	میوه دهی	ریشه
۱۳	۸٤	اسفراین	روستای فریمان	هندوانه	چند برگی	ریشه
۱٤	۸٦	اسفراین	حومه	خیار	میوه دهی	ریشه
۱۵	۸۹	سن خاست	حومه	هندوانه	میوه دهی	ریشه
۱٦	۹۰	چناران	حومه	خیار	میوه دهی	طوقه
۱۷	۹۳	بجنورد	حومه	خیار	میوه دهی	طوقه
۱۸	۹٦	جاجرم	قوشان	خیار	میوه دهی	طوقه
۱۹	۹۸	سرخس	قلعه قصاب	خربزه	میوه دهی	طوقه
۲۰	۹۹	سرخس	قوش علی جان	خربزه	میوه دهی	ریشه
۲۱	۱۱۸	کاشمر	فرگ	طالبی	میوه دهی	طوقه
۲۲	۱۲۰	مشهد	تپه سلام	خربزه	میوه دهی	طوقه
۲۳	۱۲۲	مشهد	جاده تربت	خربزه	میوه دهی	ریشه
۲٤	۱۲٦	خواف	جاده رشتخوار	خربزه	میوه دهی	طوقه
۲۵	۸۳	سرخس	حومه	خربزه	میوه دهی	طوقه
۲٦	٤۲	شیراز	حومه	طالبی	میوه دهی	طوقه
۲۷	۳۲	استهبان	خیر	هندوانه	گلدهی	ریشه
۲۸	۳۸	استهبان	حومه	هندوانه	گلدهی	ریشه
۲۹	۵۸٤	خواف	مزارع غربی	هندوانه	میوه دهی	ریشه
۳۰	۸۱	کاشمر	حومه	هندوانه	میوه دهی	ریشه

منابع

1. Armengol, J., C. Gose and M. Moya. 2000 . *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* race l, a potential pathogen of grafted watermelon production in Spain. Plant Disease 92 (5): 919-938.
2. Boughalleb, N. 2005. Detection of races 1 and 2 of *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* and their Distribution in watermelon Field in Tunisia. Phytopathology 153:162-163.
3. Burgess, L., B. Summerell, S. Bullock, K. Gott, and D. Backhouse. 1994. Laboratory manual for *Fusarium* research. Third Edition 133pp.
4. Champaco E.R., R. Martyn and M. Miller. 1993. Comparison of *Fusarium solani* and *F. oxysporum* as causal agents of fruit rot and root rot of Musk melon. Hort. Science 28:1174-1177.
5. Crowhurst, R., B. Hawthorn, E. Rikkerink, and M.D. Templeton. 1991. Differentiation of *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* race 1 and by random amplification of polymorphic DNA .

Curr. Genet. 20(5) : 391 - 396.

6. Fantino, M., F. Fantuz and S. gennari. 1989. Study of squash rot caused by *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae*. La Difese delle piante. 12:147-154.
7. Gerlach, W. and H. Nirenberg. 1982. The Genus *Fusarium* a pictorial atlas. 209. Land Forstwirtschaft, Berlin-Dahlem: Mitt. Biol. Bundesanst, 406pp.
8. Hawthorne, BT., J. Ress-George and P. Broadhurst. 1992. Mating behavior and Pathogenicity of NewZealand island isolates of *Necteria haematococa* (*Fusarium solani*). NZJ crop hortic Sci. 20:51-57.
9. Liu, D., S. Coloe , R. Baird and J. Pederson. 2000. Rapid Mini preparation of fungal DNA for PCR. Journal of Clinical Microbiology. 38 (1), p. 471.
10. Mehl, HL. and Epstein L. 2006. Diagnosis and control of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* race 1 (teleomorph, *Necteria haematococca* mating population I). APS/CPS/MSA Joint Meeting, Québec City, Québec. July 29-August 2. Poster.
11. Messiane, C.M., D. Blancard., F. Rounel and R. Lafou. 1991. Les maladies descultures marai cheres, 3rd edn. Paris, France, INRA. 1991. 552pp.
12. Nagao, H., Suto and S. Orgiwara. 1994. Succeptibility of cucurbitae spp. to the cucurbit root-rot fungus, *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae* race 1.Agronomie 2:95-102.
13 Nelson, P., T. Tousson and W. Marasas. 1983. *Fusarium* species, An illustrated manual for identification. Penn. State University Press. 193p.
14. Shert, A., A. Macnab. 1986. Vegetable diseases and their control , 2nd edn. New york , USA , Wiley.
15. Snyder, W.C., S.G. Georgopoulos., R.K. Webster and S.N. Smith. 1975. Sexuality and genetic behaviors in the fungus *Hypomyces (Fusarium) solani* f. sp. *cucurbitae*. Hilgardia. 43: 161-184.

Identification of *Fusarium solani f.sp. cucurbitae* race 1 on cucurbit plants from Khorasan Razavi, Northern Khorasan and some regions of Fars provinces, using classic and molecular methods

M.R. Alymanesh-M. Falahati Rastegar-B. Jafar pour-E. Mahdikhanimoghadam[1]

Abstract

Fusarium solani f.sp. *cucurbitae* is an important pathogen on cucurbit plants (watermelon, melon, cucumber and squash) all over the world, having two races namely 1 and 2. Race1 causes rots on the root, crown and fruit, while race2 has pathogenicity on the fruit only. Samples from infected plants were collected during 2004-2005 from 101 watermelon fields and 31 fields of other cucurbit plants, in townships of Khorasan Razavi, Northern Khorasan and some regions in Fars. 37 isolates of *Fusarium solani* were isolated from different growth stages of watermelon, melon and cucumber. Pathogenicity test was conducted by the Root-dipping method on seedlings of watermelon, melon, cucumber and squash and 33 pathogenic isolates were obtained. Formae specialis detection test was also performed on seedlings of tomato, pea and bean (non-host plants). In conclusion, 30 isolates out of 33 showed pathogenicity only on cucurbit plants and were confirmed as *Fusarium solani* f.sp *cucurbitae*. The 30 isolates showed pathogenicity on fruit in addition to root and crown and there fore race 1 was detected in the studied regions. Race detection was also conducted utilizing the Fsc1 specific primer (based on the *tef-1*α gene), confirmed the results of classical experiments.

Key words: *Fusarium solani* f.sp. *cucurbitae*, races 1 and 2, Pathogenicity test, Root-dipping, Formae specialis, FSC1 specific primer, *tef-1*α gene

1- Contribution from College of Agriculture Ferdowsi University of Mashhad.