



## استخراج و شناسایی توکسینهای قارچ *Monosporascus cannonballus* عامل پوسیدگی ریشه و زوال

### خریزه

بهنوش حسینی\*<sup>۱</sup>، ناصر فرخی<sup>۲</sup>، ابوالفضل سرپله<sup>۳</sup>، شاهرخ قرنجیک<sup>۴</sup>، مجتبی ممرآبادی<sup>۵</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی دانشگاه صنعتی شاهرود

۲. عضو هیئت علمی دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی شاهرود

۳. استادیار موسسه گیاهپزشکی کشور

\* [behnush.hb85@gmail.com](mailto:behnush.hb85@gmail.com)

### چکیده

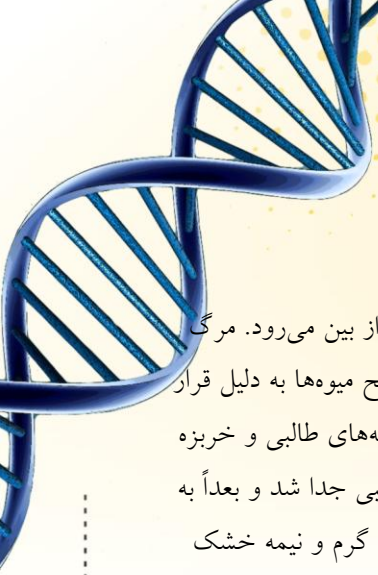
بیماری‌های خاک‌زاد از عوامل محدود کننده محصولات جالیزی به ویژه خربزه هستند و در این بین پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه بیماری مهمی است که به وسیله بسیاری از بیمارگرهای قارچی خاک‌زاد مانند *Monosporascus cannonballus* ایجاد می‌شود. کنترل این بیماری به کمک روش‌های co-suppression با استفاده از dsRNA، برداشت میوه، تولید و استفاده از ارقام مقاوم (تولید با یکی از روش‌های اصلاح موتاسیونی، دورگ‌گیری و تنوع سوماکلونال) و استفاده از قارچ‌کش‌ها و یا سایر مواد شیمیایی چون هورمون‌های گیاهی صورت می‌گیرد. راه دیگر کنترل، شناخت مواد مترشحه بیماری‌زای این قارچ است که می‌تواند به عنوان یک ابزار ردیابی انواع مقاوم به ویژه در کشت بافت به کار آید. در این تحقیق قارچ *Monosporascus cannonballus* بر روی محیط کشت مایع FCM<sup>۱</sup> کشت داده شد و متابولیت‌های بالا و زیر ۱۰ کیلو دالتون با فیلتر ۰.۴۵ میکرون (آمیگون) جداسازی شدند و اثبات بیماری‌زایی آنها بر روی گیاه انجام شد.

کلمات کلیدی: پوسیدگی ریشه و زوال، خربزه، قارچ مونوسپوراسکوس کانوبالوس، فیتوتوکسین‌های قارچی

### مقدمه

خربزه از خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) است و ایران با تولیدی بالغ بر ۱/۲۳ میلیون تن رتبه سوم جهانی را داراست. محصول خربزه و طالبی در آب و هوای گرم و خشک به دست می‌آید، و بیماری‌های خاک‌زاد از عوامل محدود کننده محصولات جالیزی است و در این بین پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه خسارات گسترده اقتصادی به این محصول می‌زند. بیمارگرهای قارچی خاک‌زاد مانند *Fusarium oxysporum* F. sp. *Melonis*، *Monosporascus cannonballus*، *Phythium* spp.، *Phytophthora drechsleri* جزو عوامل بیماری‌زای تولید پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه می‌دانند (۶) که رشد گیاه و تولید کدوئیانی چون خربزه و طالبی را شدیداً در مناطق گرم و خشک جهان محدود می‌نماید (۴). این بیماری در اسپانیا در طول ۱۵ سال باعث کاهش سطح زیر کشت خربزه تا ۴۰ درصد شده است و در جالیز کاری‌های کالیفرنیا همه ساله خسارت قابل توجهی به بار می‌آورد. علائم بیماری معمولاً ۲-۱ هفته مانده به برداشت محصول ظاهر و بیشترین خسارت وقتی ایجاد می‌شود که گیاه تحت استرس‌های گرما و خشکی به ویژه در موقع رسیدگی میوه باشد (۱). علائم بیماری به صورت زردی برگ‌های نزدیک به طوقه ظاهر، که به سمت انتهای بوته پیشرفت

<sup>۱</sup>. Fries Culture Medium



می‌کند. برگ‌ها سپس نکروزه و در صورت بالا بودن دما و استرس خشکی تمام تاج گیاه ظرف مدت کوتاهی از بین می‌رود. مرگ گیاه آن هم درست قبل از برداشت باعث عدم رسیدگی کامل میوه می‌گردد و میزان قند این میوه‌ها پایین و سطح میوه‌ها به دلیل قرار گرفتن در معرض آفتاب، سوخته و فاقد کیفیت لازم می‌باشند (۴). عامل بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های طالبی و خربزه اولین بار در سال ۱۹۷۰ به همراه *Rhizoctonia solani* و *Verticillium albo-atrum* از بوته‌های خربزه و طالبی جدا شد و بعداً به عنوان *Monosporascus cannonballus* شناسایی گردید (۵). در حال حاضر این بیماری از بسیاری از مناطق گرم و نیمه خشک گزارش شده است. در ایران این قارچ اولین بار از روی طالبی و خربزه از مناطق زاهدان، گرمسار و ایوانکی گزارش و بیماری‌زایی آن اثبات گردید (۶). هر چند به نظر می‌رسد این قارچ از مدت‌ها قبل نیز در خاک‌های ایران وجود داشته است ولی به لحاظ مجموعه‌ای از فاکتورها این قارچ به عنوان عامل بوته‌میری پایان فصل خربزه و طالبی معرفی نشده است. تشابه علائم ناشی از *M. cannonballus* با عوامل معمول بوته‌میری نظیر گونه‌های پیتیوم و فوزاریوم و پاره‌ای از بیماری‌های فیزیولوژیک مانند "عقب سفید" تشخیص و تفکیک این بیماری را از موارد اشاره شده دشوار می‌سازد. علاوه بر این، قارچ مذکور در مرحله رویشی صرفاً تولید هیف‌های قارچی می‌نماید و فاقد اندام‌های بارده غیرجنسی می‌باشد و بنابراین در این مرحله از رشد قابل تشخیص نمی‌باشند. مضافاً اینکه تولید مثل جنسی (یعنی تشکیل آسکوسپورها) که تنها راه تشخیص این قارچ می‌باشد، به ندرت و تحت شرایط خاص امکان‌پذیر است (۵). در کنار مطالعات ژنتیکی قارچ‌ها، مطالعه مواد مترشحه<sup>۱</sup> قارچی در بهینه سازی سیستم‌های گیاهی می‌تواند مؤثر باشد و این فیتوتوکسین‌ها هستند که منجر به بروز علائم ناخواسته در گیاه می‌گردند (۲). بسیاری از قارچ‌ها و باکتری‌های گوناگون دامنه‌ی وسیعی از متابولیت‌ها را در محیط کشت تولید می‌کنند که برای گیاهان، سمی و شامل مواد خاصی با ساختارهای شیمیایی گوناگون و متعلق به گروه‌هایی چون پلی‌پپتیدها، گلیکوپروتئین‌ها، مشتق‌های اسیدآمینه، پلی‌کتیدها، تربنئیدها، استرول‌ها و کوبینون‌ها هستند که به چنین ترکیباتی فیتوتوکسین‌ها می‌گویند. با توجه به این‌که اغلب فیتوتوکسین‌ها برای حیوانات و انسان‌ها از طریق تجمع آن‌ها در محصولات کشاورزی خطرناک و سمی هستند.

امروزه تحقیقات زیادی بر روی آن‌ها انجام می‌شود و در این تحقیق فیتوتوکسین‌های قارچ *Monosporascus cannonballus* استخراج شدند و شناسایی آنها در دست بررسی قرار دارد و در آینده در ایجاد ارقام مقاوم از آن‌ها استفاده خواهد شد.

#### مواد و روشها

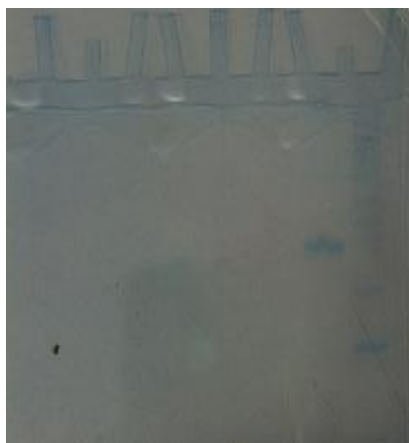
برای شناسایی و اندازه‌گیری فعالیت فیتوتوکسینی، آزمایشات بیولوژیکی در محیط کشت مایع صورت گرفت. قارچ مذکور بر روی محیط کشت مایع FCM کشت داده شد و پس از سه هفته رشد با استفاده از کیف باختر و پمپ خلا میسلیم‌ها جدا گردیدند. برای اطمینان از مونوسپورا بودن قارچ، استخراج DNA و PCR انجام شد و باند حاصل شده مربوط به قارچ مذکور مشاهده گردید، هم چنین مایع به دست آمده (شامل مواد با وزن مولکولی پایین و پروتئینها) با فیلترهایی با قابلیت تفکیک ۱۰ کیلودالتون در ۴۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مواد با وزن مولکولی بالاتر از ۱۰ کیلودالتون (در قسمت رویی فیلتر قرار گرفتند) بر روی ژل SDS-PAGE تک باندی با وزن مولکولی ۱۸ کیلودالتون تشکیل دادند (شکل ۱-الف) و مواد با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلودالتون (در زیر فیلتر قرار گرفتند) تغلیظ، خالص سازی و بر روی کاغذ در شرایط ولتاژ بالا الکتروفورز شدند که در نتیجه سه

<sup>1</sup>. elicitors (secretome)

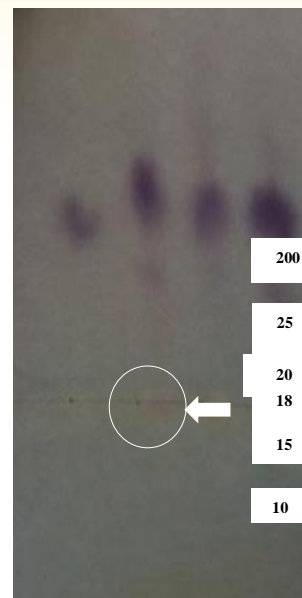


ترکیب با واکنش مثبت نسبت به نین هیدرین (دلیل استفاده از نین هیدرین به این علت است که قبلاً مواد دارای خاصیت فیتوتوکسیتی قارچها با نین هیدرین واکنش مثبت نشان دادهاند (۳)) روی الکتروفوروگرام مشاهده گردید (شکل ۱-ب).

Asp 1 2 3



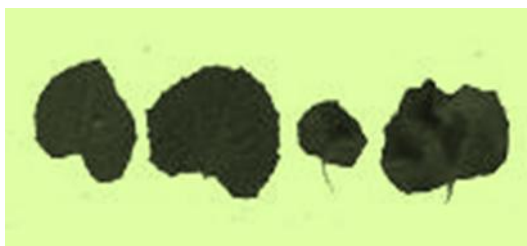
(شکل ۱-ب)



(شکل ۱-الف)

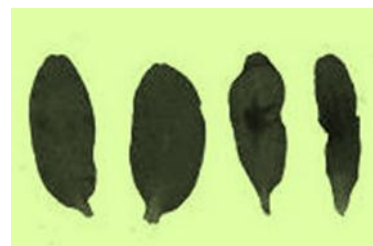
شکل ۱-الف: تک بانده ۱۸ کیلوالتونی ب: واکنش مثبت سه ترکیب با نین هیدرین

مواد با وزن مولکولی پایین<sup>۱</sup> (LMWCs) به برگهای کوتیلدونی و برگهای حقیقی باعث آسوخنگی و نکروز برگها گردید. آب مقطر استرلی (SDW) و محیط کشت فرنی (FCM) علائمی ایجاد نکردند (شکل ۲-الف و ب).



SDW FCM LMWCs LMWCs

(شکل ۲-ب)



SDW FCM LMWCs LMWCs

(شکل ۲-الف)

شکل ۲-الف: مشاهده تزریق مواد با وزن مولکولی پایین به برگهای کوتیلدونی ب: مشاهده تزریق مواد با وزن مولکولی پایین به برگهای حقیقی

<sup>1</sup>. Low Molecular Weight Compounds



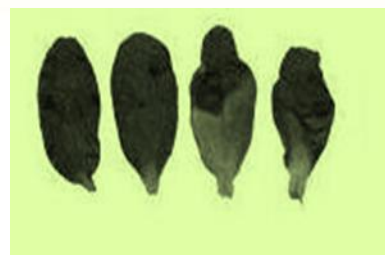


پروتئینها به برگهای کوتیلدونی و برگهای حقیقی باعث آبسختگی و نکروز برگها گردید. آب مقطر و محیط کشت فریز علائمی ایجاد نکردند (شکل ۳- الف و ب).



SDW FCM Proteins

(شکل ۳- ب)



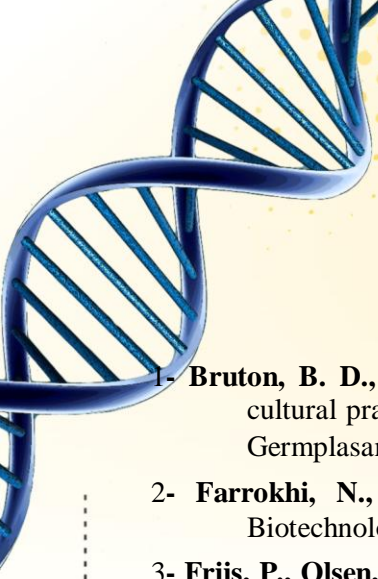
SDW FCM Proteins

(شکل ۳- الف)

شکل ۳- الف: مشاهده تزریق پروتئینها به برگهای کوتیلدونی ب: مشاهده تزریق پروتئینها به برگهای حقیقی

### نتایج و بحث

پوسیدگی ریشه و زوال بوتههای خربزه بیماری مهمی است که به وسیله بسیاری از بیمارگرهای قارچی خاکزاد مانند *Monosporascus cannonballus* ایجاد میشود. از کشت قارچ *M. cannonballus* بر روی محیط کشت FCM توانستیم مواد دارای خاصیت فتوتوکسیک را که شامل پروتئینها (بالای ۱۰ کیلودالتون) و مواد با وزن مولکولی پایین (زیر ۱۰ کیلودالتون) بودند را جدا کنیم و بیماری زایی آنها را بر روی گله اثبات کنیم. شناسایی این مواد و پروتئینها در دست بررسی قرار دارد که با شناخت این مواد میتوانیم از آنها به عنوان یک ابزار ردیابی انواع مقاوم به ویژه در کشت بافت استفاده کنیم که از مهمترین راههای کنترل این بیماری به حساب میآید.



منابع

- 1- Bruton, B. D., Russo, V. M., Garcia-Jimenes, J., Miller, M. E., 1998. Carbohydrate partitioning, cultural practices, and vine decline diseases of cucurbits. Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germplasm. Pacific Grove, CA, U.S.A.: ASHS Press, 189-200.
- 2- Farrokhi, N., Whitlege, J. P., Brusslan, J. A., 2008. Plant peptides and peptidomics. Plant Biotechnology Journal. 6: 105-134.
- 3- Friis, P., Olsen, CE., Moller, BL., 1991. Toxin production in *Pyrenophorateres*, the ascomycete causing the net-spot blotch disease of barley (*Hordeum vulgare* L.). The Journal of Biological Chemistry 266: 13329-13335.
- 4- Martyn, R. D., Miller, M. E., 1996. *Monosporascus* root rot and vine decline. An emerging disease of melons worldwide. Plant Disease. 80: 716-725.
- 5- Pollack, F. G., Uecker, F. A., 1974. *Monosporascus cannonballus* an unusual Ascomycete in cantaloupe roots. Mycologia. 66: 346-349.
- 6- Sarpeleh, A., 2008. The role of *Monosporascus cannonballus* in melon collapse in Iran. Australasian Plant Disease Notes. 3: 162-164.

### Analysis of *Monosporascus cannonballus* secretome that causes root rot and vine decline

Hosseini, Behnoush<sup>1</sup>; Farrokhi, Naser<sup>2</sup>; Sarpele, Abolfazl<sup>3</sup>; Gharanjik Shahrokh<sup>2</sup>; Mamarabadi Mojtaba<sup>2</sup>  
1,2. Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran  
2. Institute of Plant Pathology, Tehran, Iran

The soil-borne diseases are limiting factors in melon grounds. Amongst which root rot and vine decline that is caused by *Monosporascus cannonballus* has a major devastating effect in warm and dry places. Either of the following methods can be used to control the disease: co-suppression via the use of dsRNA against elicitors, early harvest to avoid wilting and distribution of the disease, use of resistant varieties and application of fungicides or other chemicals such as plant hormones. Recently, study of the secretome and its components bearing the pathogenicity effectors promise to deliver a rapid approach for screening of the resistant varieties, especially the ones that have been generated via tissue culture and somewhat undergone somaclonal variation. In this study, cell free filtrates were extracted from *M. cannonballus* grown on Fries Culture Medium (FCM) and separated by 0.45  $\mu$ m Amicon centriplus filter devices caused metabolites severance above and below 10 kDa.