

واکنش هیستوپاتولوژیکی ارقام مقاوم و حساس خیار نسبت به قارچ عامل پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه  
*Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*

**Histopathological Response of Resistant and Susceptible Cultivars of  
Cucumber to *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, the Causal  
Agent of Fusarium Stem and Root Rot**

داریوش شهبازی<sup>۱</sup>، الهام مولوی<sup>۲</sup>، حشمت‌اله امینیان<sup>۳</sup> و حسن‌رضا اعتباریان<sup>۴</sup>

۱- مری، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، ورامین.

۲- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌های گیاهی، پردیس کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران، پاکدشت.

۳ و ۴- به ترتیب استادیار و استاد، گروه گیاهپزشکی پردیس کشاورزی ابوریحان دانشگاه تهران پاکدشت.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۳/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۲۹

چکیده

شهبازی، د.، مولوی، ا.، امینیان، ح.، و اعتباریان، ح. ر. ۱۳۹۰. واکنش هیستوپاتولوژیکی ارقام مقاوم و حساس خیار نسبت به قارچ عامل پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*. مجله به‌نژادی نهال و بذر ۱-۲۷: ۳۹۱-۳۷۵.

در این بررسی ارقام فستیوال (Festival) و نگین (Negeen) خیار که نسبت به قارچ عامل بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه به ترتیب مقاوم و حساس بودند، از نظر هیستوپاتولوژیکی مورد مطالعه قرار گرفتند. بعد از مایه‌زنی مصنوعی گیاهان از طریق تماس مستقیم پلاک‌های قارچ با طوفه و ریشه گیاهچه‌ها، از گیاهان آلوده شده در زمان‌های ۳، ۶، ۱۰ و ۱۸ روز پس از مایه‌زنی نمونه‌برداری شد. نمونه‌ها پس از برش و نگهداری در محلول‌های تثبیت‌کننده و رنگ‌آمیزی، مورد مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند. مهم‌ترین تغییرات هیستوپاتولوژیکی رخ داده تغییر رنگ در کورتکس گیاه، اضمحلال بافت گیاه، توسعه قارچ در ناحیه کورتکس ریشه و افزایش تولید ترکیبات پکتیکی در بافت‌های آلوده بود. نفوذ قارچ و تخریب بافت در رقم مقاوم تنها به چند لایه سطحی بافت کورتکس محدود شد در حالی که در رقم حساس این پدیده در تمام سیستم ریشه گسترش یافت و به استوانه مرکزی و آوندها نیز رسید. ترکیبات پکتیکی چند روز بعد از مایه‌زنی تولید شد و مقدار این ترکیبات ۱۸ روز بعد از مایه‌زنی در رقم مقاوم بیشتر از رقم حساس بود. بر اساس این نتایج استحکام دیواره سلولی و نیز بالا بودن مقدار ترکیبات پکتیکی دیواره سلولی می‌توانند به‌عنوان اجزاء مقاومت در تولید ارقام مقاوم به بیماری پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه خیار در برنامه‌های به‌نژادی مورد توجه قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: خیار، پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه، ترکیبات پکتیکی، دیواره سلولی، هیستوپاتولوژی مقاومت.

## مقدمه

پوسیدگی فوزاریومی ساقه و ریشه خیار (*F. oxysporum* Schlechtend.:Fr. f.sp.) *radicis-cucumerinum* f.sp. nov. از جمله مهم‌ترین بیماری‌های خاکزاد خیار است که خسارت زیادی به محصول خیار در گلخانه‌ها وارد می‌آورد.

این بیماری در سال‌های ۱۹۹۰-۱۹۸۹ در یونان با خسارت شدید روی کشت‌های گلخانه‌ای مشاهده و گزارش شد (Vakalounakis, 1996). در سال ۱۹۹۴ این بیماری در کانادا مشاهده شد (Cerkauskas et al., 2001; Punja et al., 1998) و در سال ۱۹۹۸ از فرانسه (Reverchon et al., 2000)، در سال ۱۹۹۹ از چین (Vakalounakis et al., 2004) و در سال ۲۰۰۰ از اسپانیا گزارش شد (Moreno et al., 2001). در ایران در سال‌های ۱۳۸۱ و ۱۳۸۲ این بیماری در گلخانه‌های جیرفت، یزد و بعد از آن در گلخانه‌های ورامین مشاهده و گزارش شد و اکنون به عنوان مهم‌ترین بیماری خیار گلخانه‌ای در آمده است. بر اساس مشاهدات و بررسی‌های انجام شده در کشور میزان آلودگی در برخی گلخانه‌ها تا حدود صد درصد روی ارقام حساس دیده شده است ولی به طور معمول میزان آلودگی بین ۶۰-۲۰ درصد است (Shahriari and Zare, 2006). بهترین راه کنترل بیماری از بین بردن زادمایه اولیه و اصلاح

ارقام مقاوم است (Gamliel et al., 1996). استفاده از ارقام مقاوم بهترین روش قابل قبول و اقتصادی برای کنترل بیماری‌های خاکزاد است، هر چند تعداد ارقام مقاوم در دسترس در برابر تعداد زیاد عوامل بیماری‌زای خاکزاد کافی نیست (Buchenaer, 1998). در آزمایشی که توسط شه‌ریاری و زارع (Shahriari and Zare, 2006) انجام شد واکنش ۲۸ رقم تجاری خیار در شرایط گلخانه نسبت به بیماری ارزیابی شد و ارقام Tkwl-52، Tkwl-45، Tkwl-87، Tkwl-127، Number one، Tkwl-228 Astoria، Rubah-s، Columvia، Festival و مقاوم و بقیه ارقام حساس به بیماری بودند. در آزمایش دیگری در گلخانه واکنش ۲۰ رقم هیبرید خیار گلخانه‌ای ارزیابی شد و هیبریدهای 120118، Ayat، FD-C101، Festival، Khasib، Jakie، PSR36-45007، SR36-45664 و Stom مقاوم و دیگر ارقام نیمه حساس تا حساس به بیماری تشخیص داده شدند (Molavi et al., 2008). بررسی‌های انجام شده در مورد مکانیزم‌های مقاومت به این بیماری نشان داده که یکی از اولین پاسخ‌های دفاعی بررسی شده درخیار، مقاومت دیواره سلولی در برابر نفوذ قارچ است (McNally et al., 2004). تحقیقات بسیاری نشان داده است که پاسخ‌های دفاعی فیزیولوژیکی و هیستوپاتولوژیکی مختلفی در بافت‌های آلوده به عوامل پژمردگی و پوسیدگی

حساس عمومی استفاده شد. برای انتخاب جدایه بیماری با توجه به بررسی‌های انجام شده و آزمایش‌های قبلی از جدایه J1 قارچ که قدرت بیماری‌زایی بالایی داشت، استفاده شد (Molavi et al., 2008).

ابتدا بذر ارقام مقاوم و حساس خیار با هیپوکلریت سدیم تجاری پنج درصد به مدت دو تا سه دقیقه ضدعفونی شده و پس از شستشو با آب مقطر سترون در گلدان‌های حاوی خاک سترون شامل کمپوست برگ، ماسه، پرلیت و خاک مزرعه به نسبت ۱:۱:۱:۲ به تعداد دو بذر در هر گلدان و سه تکرار برای هر تیمار کاشته شد. در مرحله دو برگ حقیقی، خاک کنار طوقه و ریشه گیاهچه‌ها کنار زده شد و مطابق روش بنه‌مامو و بلانجر (Benhamou and Blanger, 1998) یک پلاک قارچ به قطر نیم سانتی‌متر از محیط کشت چهار روزه قارچ در تماس مستقیم با طوقه و ریشه گیاه قرار داده شد. در گلدان‌های شاهد نیز به همین روش یک پلاک محیط کشت خالص بدون قارچ به قطر نیم سانتی‌متر در تماس مستقیم با طوقه و ریشه گیاهان حساس و مقاوم قرار داده شد. گلدان‌ها در گلخانه با متوسط دمای روزانه ۲۸-۳۰ و متوسط دمای شبانه ۱۵-۱۷ درجه سانتی‌گراد در ماه شهریور با نور طبیعی نگهداری شده و هر دو روز یک‌بار آبیاری شدند. در زمان‌های ۳، ۶، ۱۰ و ۱۸ روز پس از مایه‌زنی نمونه‌برداری از طوقه و ریشه گیاهچه‌ها به عمل آمد. ظهور علائم بیماری و

قارچی و باکتریایی از جمله گونه‌های مختلف قارچ فوزاریوم در ارقام مقاوم و حساس گیاهان نقش دارند. این تحقیقات حاکی از آن است که این بیماری‌ها توسط توکسین‌های قارچی و باکتریایی (Van Alfen, 1989)، انسداد آوندی توسط تیلوزها، ژل‌ها، صمغ‌ها و ترکیبات فنلی (Carlile and Watkinson, 1995)؛ (Agrios, 1997; Beckman et al., 197) توسعه می‌یابند. مهم‌ترین عامل در مقاومت به عوامل پوسیدگی قارچی و باکتریایی، دیواره سلولی گیاه و ترکیبات تشکیل‌دهنده آن از جمله ترکیبات پکتیکی و سلولزی است. تحقیقات بسیاری روی بیماری‌های مختلف گیاهی نشان می‌دهد که این ترکیبات و تغییرات دیواره سلولی در ارقام مقاوم و حساس گیاهان از فاکتورهای اصلی و اولیه در دفاع در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشد (Fang, 2006; Ouellette et al., 2002)؛ (Wydra et al., 2006). هدف از این مطالعه بررسی واکنش‌های هیستوپاتولوژیکی ارقام مقاوم و حساس خیار در برابر حمله قارچ *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* بود.

#### مواد و روش‌ها

در این آزمایش از رقم حساس نگین و رقم مقاوم فستیوال، که حساسیت و مقاومت آن‌ها در آزمایش‌های گلخانه‌ای پیشین مشخص شده بود، استفاده شد. از رقم سلطان نیز به عنوان رقم

۹۰ درصد، فنل، کلرال هیدرات و آنیلین بلو بر اساس روش بروزس و حسن (Bruzess and Hassan, 1983) استفاده شد. برش‌ها به مدت ۲۴ ساعت داخل شیشه‌های درب‌دار کوچک، به حجم ۱۰ میلی‌لیتر و محتوی محلول رنگ آمیزی در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس به مدت ۲۴-۱۲ ساعت در محلول غلیظ کلرال هیدرات (پنج گرم در دو میلی‌لیتر آب) قرار داده شده و نهایتاً با آب مقطر شسته شده و در زیر میکروسکوپ برای مشاهده سلول‌های گیاه و بافت‌های قارچی مورد بررسی قرار گرفتند.

برای مشاهده مواد پکتیکی بر اساس روش بیکن و هالموس (Beckman and Halmos, 1962) از معرف ساfranin الکی به نسبت ۰/۰۱ درصد به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. مواد پکتیکی در صورت وجود به صورت تجمع رنگ قرمز در دیواره سلول و درون بافت‌ها قابل مشاهده‌اند.

برای بررسی تغییرات لیگنین در بافت مطابق روش باین و همکاران (Baayen et al., 1996) بعد از قرار دادن نمونه‌ها در هیدروکسید سدیم یک مولار به مدت یک ساعت مشاهده نمونه‌ها زیر نور عادی و نور ماوراء بنفش انجام شد. لیگنین‌ها در صورت وجود زیر نور عادی به صورت تجمع مواد قهوه‌ای رنگ و زیر نور ماوراء بنفش به رنگ سبز فلورسنت قابل مشاهده‌اند.

برای مشاهدات بافتی و اندام‌های قارچ، از

شدت آلودگی ارقام نیز در طی روزهای مختلف نمونه‌برداری بررسی و ۱۸ روز پس از مایه‌زنی نتیجه نهایی ثبت شد.

میانگین شدت آلودگی بر اساس مقیاس ۰-۳ واکالوناکیس (Vakalounakis, 1996) به شرح زیر تعیین شد: ۰) گیاهچه بدون علائم، ۱) پوسیدگی ابتدایی تا متوسط روی ریشه اصلی، ریشه‌های ثانویه و طوقه و کمی تغییر رنگ آوندی در ساقه، ۲) پوسیدگی شدید روی ریشه اصلی، ریشه‌های ثانویه و طوقه همراه با پژمردگی یا کوتولگی و تغییر رنگ آوندی در ساقه، ۳) مرگ گیاهچه. هر تیمار شامل سه تکرار بود و میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن مقایسه شدند.

برای تثبیت نمونه‌ها از مخلوط فرمالین، اسید استیک و الکل اتیلیک بر اساس روش هوکر (Hooker, 1967) استفاده شد. نمونه‌های مورد آزمایش حداقل به مدت ۱۸ ساعت در این تثبیت کننده قرار داده شدند. برای بی‌رنگ کردن نمونه‌ها و شفاف شدن هر چه بیشتر آن‌ها مطابق روش Peterson and Pound, (1960) نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در محلول پتاس ۱۰ درصد قرار داده شدند و برای تثبیت، به مدت دو تا پنج ساعت در الکل اتیلیک ۹۶ درصد نگهداری شدند. پس از تثبیت نمونه‌ها، تهیه برش‌ها از بافت‌های ریشه و طوقه به روش دستی و با تیغ تیز سترون انجام شد.

برای رنگ آمیزی برش‌ها از مخلوط اتانل ۹۵ درصد، کلروفرم، اسید لاکتیک

مختلف نمونه برداری، در رقم مقاوم فستیوال فقط به چند لایه سلول سطحی اپیدرم و کورتکس محدود شد، در صورتی که در رقم حساس نگیب نفوذ قارچ و علائم پوسیدگی محدود نشده و از روز سوم بعد از مایه زنی با مرور زمان از کورتکس گذشته و به استوانه مرکزی و اجزاء آوندی نیز رسید. از روز دهم بعد از مایه زنی و پس از پوسیدگی کامل بافت ریشه رقم حساس، ریشه ها و کلایدوسپوره های قارچ در سطح ریشه قابل مشاهده بودند (شکل ۱).

در روزهای مختلف نمونه برداری و رنگ آمیزی مشاهده شد که هم زمان با نفوذ قارچ به سلول های کورتکس ترکیبات فنلی و لیگنین در بافت های آسیب دیده به شکل مواد قهوه ای رنگ و تیره تجمع می یابند. تجمع این ترکیبات در طی روزهای مختلف نمونه برداری هم در بافت رقم حساس و هم در بافت رقم مقاوم، فقط در ناحیه آلوده مشاهده شد و تا جایی پیشرفت داشت که نفوذ قارچ تا آن ناحیه صورت گرفته بود (شکل های ۲، ۶ و ۷). میزان این ترکیبات در هر دو رقم کم و محدود به ناحیه آلوده بود.

با گذشت زمان، از سه روز پس از مایه زنی ترکیبات پکتیکی (ژل ها) به صورت تجمع مواد قرمز رنگ در بافت های آلوده و دیواره سلول ها به خصوص بافت رقم مقاوم فستیوال، افزایش یافتند به طوری که ۱۸ روز بعد از مایه زنی این ترکیبات در بافت رقم فستیوال بر خلاف محدود

روش رنگ آمیزی فلورسانس پتاس-آنیلین بلو (Hood and Shew, 1966) استفاده شد. در این روش برش های تازه بافتی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد داخل ۵۰ میلی لیتر پتاس یک مولار اتوکلاو شدند. بعد از سه بار شستشو در آب مقطر سترون، نمونه ها داخل چند قطره محلول رنگ آمیزی فسفات دی پتاسیک روی اسلاید قرار داده شده و زیر نور ماوراء بنفش مشاهده شدند. محلول رنگ آمیزی آنیلین بلو در  $(K_2HPO_4)$  به مدت حداقل دو ساعت قبل از مشاهده استفاده شد.

برای عکس برداری از نمونه های میکروسکوپی از دوربین عکاسی اولیمپوس (Olympus C-35AD-4) نصب شده روی میکروسکوپ اولیمپوس (Olympus BH-2) و نیز برای عکس برداری زیر نور ماوراء بنفش از میکروسکوپ فلورسنت (Jenamed-2 Fluorescence) استفاده شد.

### نتایج و بحث

با توجه به ظهور علائم بیماری طی روزهای مختلف نمونه برداری در ارقام مقاوم و حساس خیار در مقایسه با رقم حساس عمومی (سلطان) و شاهد های مربوط به هر رقم، میانگین شدت آلودگی تیمارها بر اساس مقیاس ۰-۳ واکالوناکیس (Vakalounakis, 1996) محاسبه شد و نوع واکنش آن ها در برابر بیماری تعیین شد (جدول ۱).

نفوذ قارچ و علائم بیماری طی روزهای

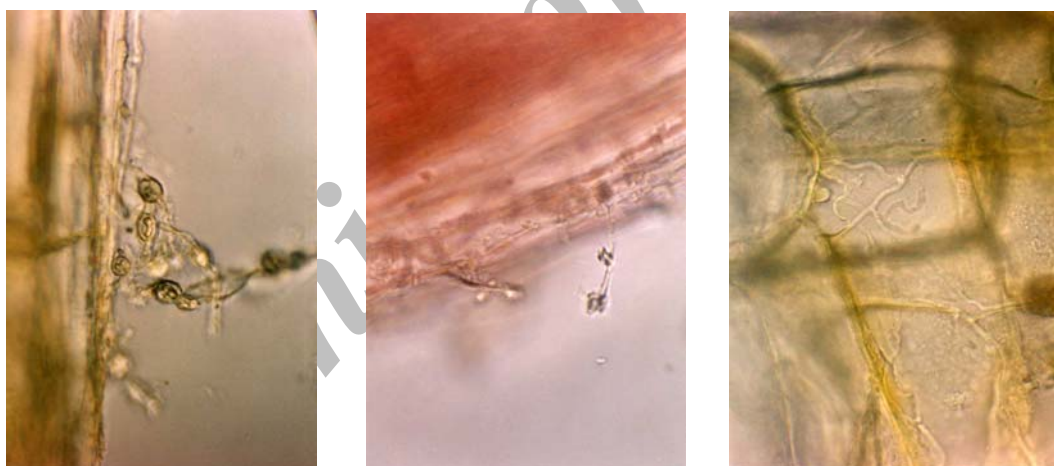
جدول ۱- میانگین شدت آلودگی و واکنش ارقام مقاوم و حساس خیار به جدایه J1 قارچ عامل بیماری *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*، ۱۸ روز بعد از مایه زنی با عامل بیماری

Table 1. Mean disease severity and reaction of resistant and susceptible cucumber cultivars to J1 isolate of *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, at day 18 after inoculation with the pathogen

Treatment	تیمار	میانگین شدت آلودگی Mean disease severity	واکنش Response
Negeen cv. Inoculated with the pathogen	رقم نگین مایه‌زنی با قارچ عامل بیماری	2.33	Susceptible
Negeen cv. Control	رقم نگین شاهد	0.00	-
Festival cv. inoculated with the pathogen	رقم فستیوال مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری	0.33	Resistant
Festival cv. control	رقم فستیوال شاهد	0.00	-
Soltan cv. inoculated with the pathogen	رقم سلطانی مایه‌زنی شده با قارچ عامل بیماری	2.00	Susceptible
Soltan cv. control	رقم سلطان شاهد	0.00	-

اعداد میانگین سه تکرار هستند و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ با هم اختلاف معنی‌دار دارند.

Data are means of three replications and are significantly different at 1% probability level according to Duncan's multiple range test.



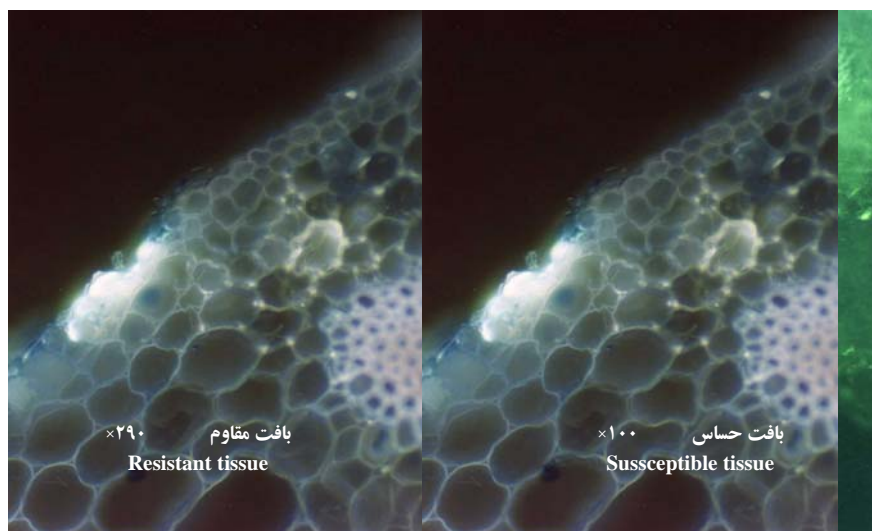
شکل ۱- اندام‌های قارچی *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* در بافت حساس آلوده (رقم نگین) در روزهای مختلف بعد از مایه‌زنی با عامل بیماری: (a) مونوفیالیدهای قارچ در سطح بافت، ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی با عامل بیماری (۲۹۰×)، (b) ریشه‌های قارچ درون بافت، ۱۸ روز بعد از مایه‌زنی با عامل بیماری (۴۸۰×)، (c) کلآمیدوسپورهای قارچ در سطح بافت، ۱۸ روز بعد از مایه‌زنی با عامل بیماری (۵۷۰×)

Fig.1. Fungal organs of *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* in infected susceptible tissue (Negeen Cv.) at different days after inoculation with the pathogen: a) fungal monophialides on tissue surface at day 10 after inoculation with the pathogen (×290), b) fungal mycelia in susceptible tissue at day 18 after inoculation with the pathogen (×480), c) fungal chlamydospores on tissue surface at day 18 after inoculation with the pathogen (×570)

بیمار رقم حساس نگین، نشان‌دهنده مضمحل شدن بخش قابل توجهی از سلول‌های کورتکس و پارانسیم آوندی ده روز بعد از مایه زنی بود در صورتی که در رقم مقاوم فستیوال، طی روزهای مختلف نمونه برداری آلودگی به قسمت‌های سطحی بافت محدود بود و حتی با پیشرفت آلودگی اضمحلال شدید بافت مشاهده نشد و سلول‌ها شکل اولیه خود را تا حدودی حفظ کرده بودند و پوسیدگی خیلی کم و محدود به لایه‌های سطحی مشاهده شد (شکل‌های ۲، ۳ و ۴). علاوه بر این در آلودگی و پوسیدگی پیشرفته در ۱۸ روز بعد از مایه‌زنی مشاهده شد که بر خلاف رقم حساس نگین که بافت دچار پوسیدگی شدید در محل طوقه و ریشه شده بود، در رقم مقاوم فستیوال پیشرفت آلودگی باعث مرگ سلولی و پلاسمولیز سلول‌های نزدیک منطقه آلوده شده و به این ترتیب باعث محدود شدن آلودگی و جلوگیری از پیشرفت قارچ عامل بیماری شده بود (شکل ۵). بر اساس تحقیقات هیستوپاتولوژیکی زو و همکاران (Xu et al., 2006) روی ارقام مقاوم و حساس گوجه‌فرنگی در برابر جدایه‌های مختلف *F. oxysporum* f.sp. *radicis-lycopercisi* بر خلاف پیشرفت سریع و گسترش قارچ از نوک ریشه‌ها به سمت آوندها و در نهایت پوسیدگی شدید طوقه در ارقام حساس، در ارقام مقاوم سرعت پیشرفت قارچ کندتر و محدود به سلول‌های پارانسمی کورتکس و پوسیدگی نیز

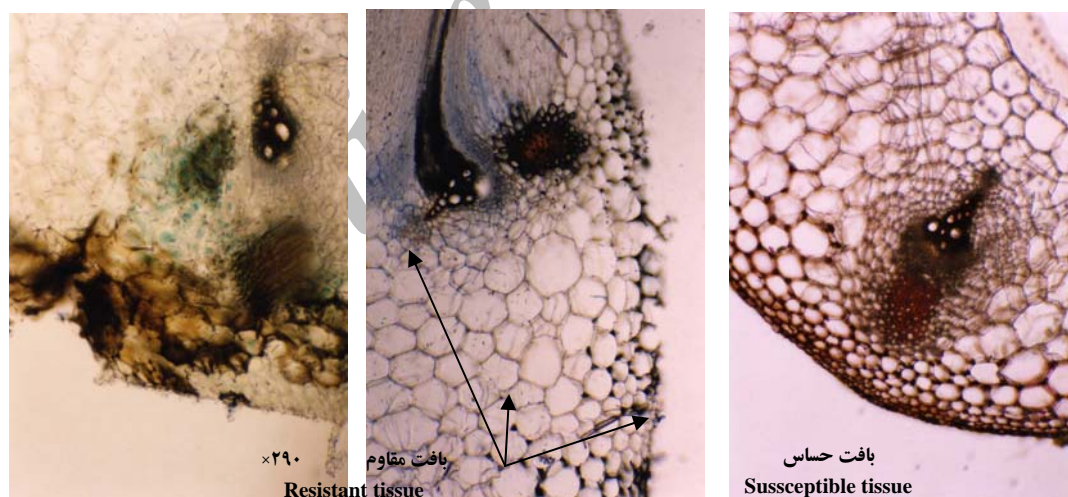
بودن قارچ به لایه‌های سطحی کورتکس و پوسیدگی سطحی، به حدی افزایش یافت که به عناصر آوندی نیز وارد شد (شکل‌های ۸ و ۹). ژل‌ها به طور عمده شامل ترکیبات پکتیکی هستند و به نظر می‌رسد نتیجه تورم و آب‌گیری دیواره سلولی اولیه و صفحات منفذدار و دیواره انتهایی عناصر آوندی هستند. رنگ آمیزی ترکیبات پکتیکی نشان داد گرچه در ابتدا (شش تا ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی) تجمع این ترکیبات در بافت رقم حساس سریع‌تر از بافت رقم مقاوم بود (شکل‌های ۲ تا ۹) ولیکن با گذشت زمان هم میزان و هم سرعت تجمع این ترکیبات در بافت رقم مقاوم، بیشتر از بافت رقم حساس بود به طوری که حتی فراتر از محل آلودگی (قسمت‌های بالاتر و پایین از ناحیه آلوده) تجمع یافته و به داخل بافت‌های آوندی نیز که هنوز مورد حمله قارچ قرار نگرفته بودند راه یافتند.

رخنه و توسعه قارچ عامل بیماری از طریق اپیدرم و کورتکس ریشه‌های آلوده به قارچ انجام می‌شود و هم‌زمان با نفوذ، باعث اضمحلال و پوسیدگی سلول‌ها حتی در چند سلول جلوتر از وجود قارچ می‌شود، از این رو ریشه‌ها و کنیدی‌های قارچ را بیشتر در نواحی آسیب دیده و پوسیده کورتکس قابل مشاهده بود. مشاهدات واکالوناکیس (Vakalounakis, 1996) نیز این نتایج را تأیید می‌کند. مشاهدات میکروسکوپ نوری مربوط به مقطع عرضی و طولی طوقه و ریشه بوته‌های



شکل ۲- ترکیبات فنلی و اضمحلال بافت حساس آلوده در رقم نگین (سمت راست)، در مقایسه با ترکیبات فنلی و استحکام دیواره سلولی در بافت مقاوم آلوده در رقم فستیوال (سمت چپ)، ۱۸ روز بعد از مایه‌زنی با *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum*

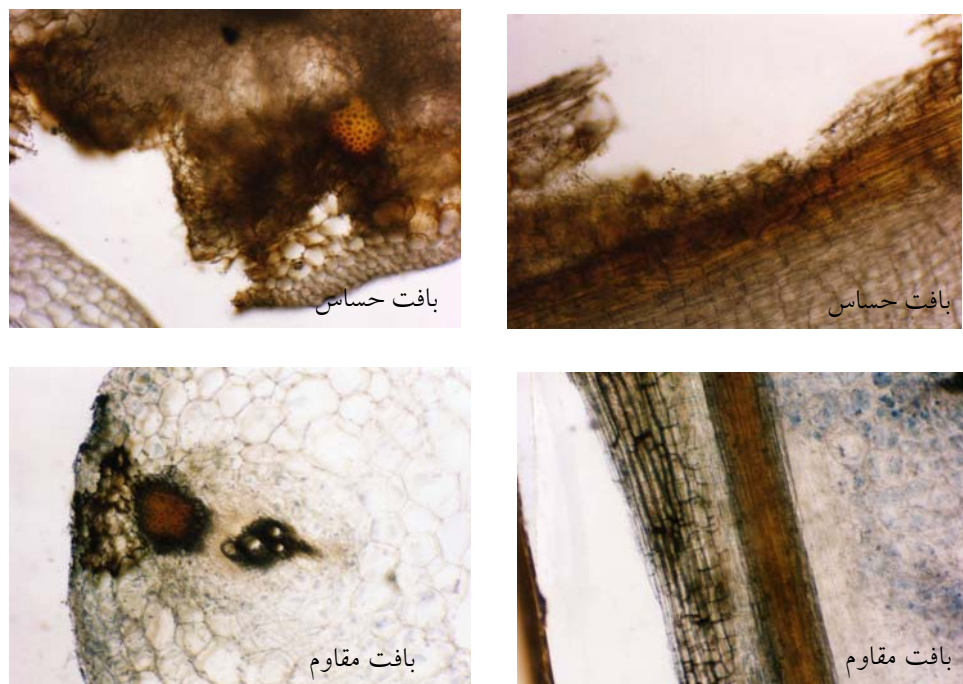
Fig. 2. Phenolic compounds and disintegration of infected susceptible tissue of Negeen cv. (right), in comparison with phenolic compounds and cell wall rigidity in resistant tissue of Festival cv. (left), at day 18 after inoculation with *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum*



شکل ۳- اضمحلال بافت حساس آلوده در رقم نگین (سمت راست)، در مقایسه با آلودگی سطحی و ضخیم شدن دیواره سلول‌ها در ناحیه آلودگی بافت مقاوم در رقم فستیوال (وسط و چپ)، ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی با *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum* (×۱۰۰)

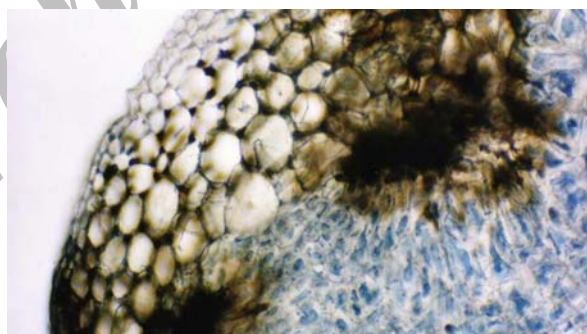
Fig. 3. Disintegration of the infected susceptible tissue of Negeen cv. (right), in comparison with superficial infection and cell wall thickening in infection site of resistant tissue of Festival cv. (middle and left), at day 10 after inoculation with *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum* (×100)





شکل ۴- پوسیدگی شدید بافت حساس در رقم نگین (بالا) در مقایسه با پوسیدگی سطحی بافت مقاوم در رقم فستیوال (پائین)، ۱۸ روز بعد از مایه‌زنی با *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (×۱۰۰)

Fig. 4. Sever rot of the susceptible tissue of Negeen cv. (up), in comparison with superficial rot of resistant tissue of Festival cv. (down), at day 18 after inoculation with *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* (×100)

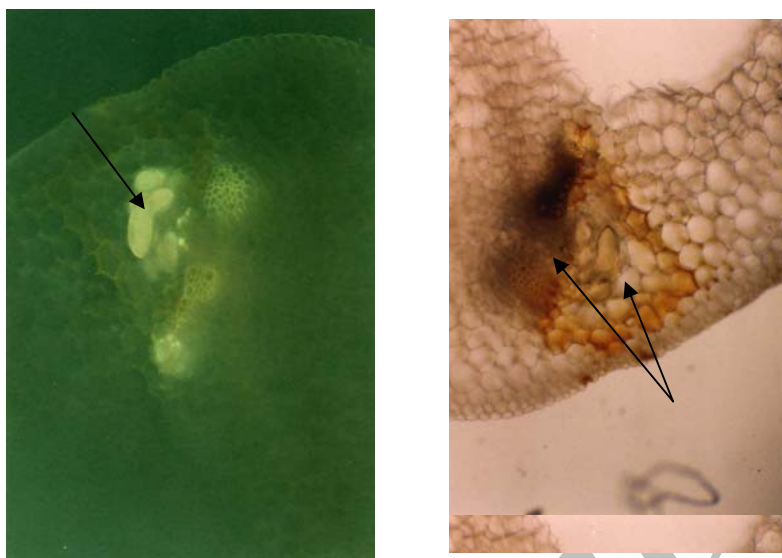


شکل ۵- مرگ سلولی و پلاسمولیز سلول‌های کورتکس و محدود شدن آلودگی در بافت طوقه آلوده رقم مقاوم (فستیوال) در اثر قارچ *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*، ۱۸ روز بعد از مایه‌زنی با قارچ (×۲۹۰)

Fig. 5. Cell death (necrosis or HR) and plasmolysis of cortical cells and restriction of rot in infected crown tissues of resistant cv. (Festival) with *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum*, at day 18 after inoculation with the pathogen (×290)

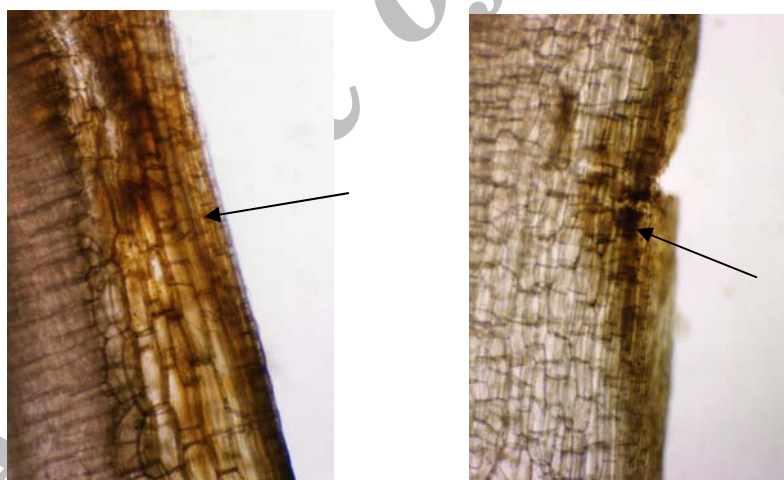
و در مورد انگل‌های اجباری مانند ویروس‌ها و برخی قارچ‌ها نظیر زنگ‌ها و سفیدک‌های پودری و داخلی، منجر به عدم توانایی عامل بیماری در گسترش بیماری و پدیده کلینزاسیون می‌شود، در مورد انگل‌های غیر اجباری نیز این پدیده به چشم می‌خورد ولیکن پیچیده‌تر بوده و به آستانه حساسیت عامل بیماری نیز مربوط می‌شود (Dehghani, 1988). اظهار نظر در این مورد به تحقیقات بیشتر نیاز دارد. تحقیقات مترن و نیوسال (Matern and Kneusal, 1988) نشان داده است که، اولین مرحله از فعالیت‌های دفاعی گیاه شامل تجمع سریع ترکیبات فنلی در نقطه آلودگی است که رشد عامل بیماری‌زا را محدود یا کند می‌کند، در این بررسی با توجه به چشم‌گیر نبودن این ترکیبات در بافت‌های آلوده می‌توان نتیجه گرفت که نقش ترکیبات فنلی در پاسخ‌های دفاعی گیاه در رقم مقاوم مربوط به ابتدای مراحل آلودگی بود و احتمالاً با تجمع سریع‌تر نسبت به بافت رقم حساس می‌تواند باعث محدود شدن رشد عامل بیماری‌زا شود ولی در رقم حساس چون این پاسخ دفاعی دیرتر اتفاق می‌افتد، عامل بیماری‌زا سریع‌تر از سیستم دفاعی گیاه عمل کرده و بافت را کلنیزه کرده است ولیکن با پیشرفت بیشتر عامل بیماری‌زا این ترکیبات دفاعی نیز هم‌چنان تولید می‌شوند. بنابر این به نظر می‌رسد، تجمع ترکیبات فنلی و اثر دفاعی آن‌ها نسبت به دیگر عوامل دفاعی گیاه در حدی نیست که به عنوان مهم‌ترین پاسخ دفاعی در ارتباط متقابل خیار-

به سطح بافت ریشه محدود شده بود. واکر (Walker, 1935) نیز مشاهده کرد که ریشه‌های ارقام مقاوم نخود آلاسکا بر خلاف ارقام حساس در برابر پژمردگی فوزاریومی، آسیب کمتری دیده و تغییر رنگ آوندی نیز در ریشه‌های مقاوم دیده نمی‌شود. کروس و همکاران (Kroes et al., 2004) نیز در مشاهدات هیستوپاتولوژیکی خود بر روی ارتباط متقابل *F. oxysporum* f.sp. *lini* و ارقام مقاوم کتان به این نتیجه رسیدند که، توسعه قارچ و پوسیدگی بر خلاف ارقام حساس در ارقام مقاوم، به ۱۰ میلی‌متر نوک ریشه‌ها محدود شده و قسمت‌های بالایی ریشه و هیپوکوتیل از حمله عامل بیماری‌زا مصون ماندند. این محققان مقاومت را به ماهیت اپیدرم و آگزودرم خوب توسعه یافته در ریشه‌های مقاوم نسبت دادند. در مشاهدات هیستوپاتولوژیکی در برخی نمونه‌های رقم مقاوم علاوه بر ضخامت ترکیبات پکتیکی دیواره سلول‌ها، مرگ و نکروز سلول‌های ناحیه آلودگی و پلاسمولیز سلول‌های نزدیک به منطقه آلودگی نیز مشاهده شد که احتمالاً می‌تواند یکی از دلایل محدود شدن توسعه عامل بیماری‌زا باشد (Beckman and Talboy, 1981). تحقیقات متعددی نشان داده است که، مکانیسم مقاومت با طبیعت فیزیولوژیکی پروتوپلاست میزبانی برای ممانعت از رخنه و گسترش قارچ عامل بیماری مرتبط است. اگرچه این حالت موضعی است و منجر به مرگ موضعی سلول‌ها می‌شود



شکل ۶- تجمع ترکیبات فنلی و لیگنین در بافت حساس آلوده (رقم نگین) شش روز بعد از مایه‌زنی با *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum* ( $\times 100$ )

Fig. 6. The accumulation of phenolic compounds and lignin in susceptible tissue (Negeen cv.), at day 6 after inoculation with *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum* ( $\times 100$ .)

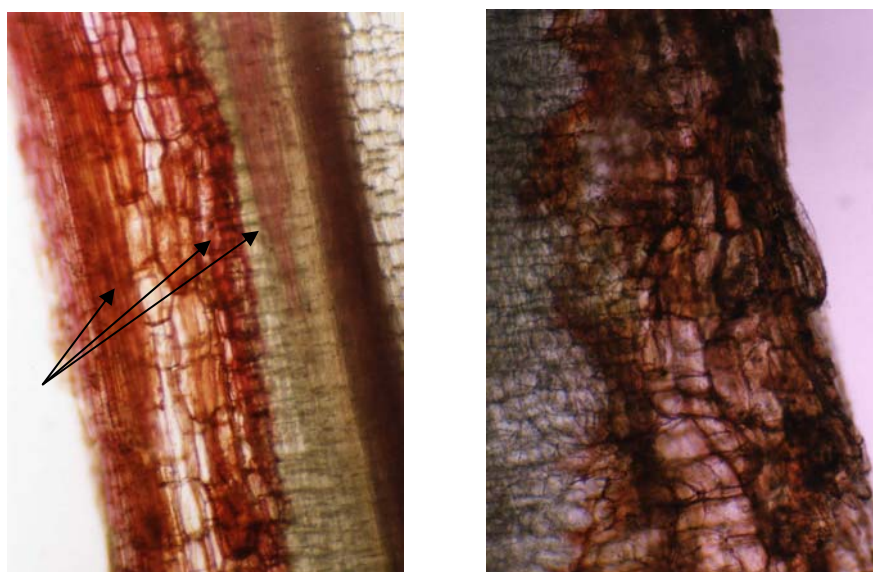


شکل ۷- تجمع ترکیبات فنلی و لیگنین در کورتکس بافت حساس آلوده (رقم نگین، سمت چپ)، در مقایسه با بافت مقاوم آلوده (رقم فستیوال، سمت راست)، ۱۰ روز بعد از مایه‌زنی با *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum* که با پیکان نشان داده شده است ( $\times 100$ )

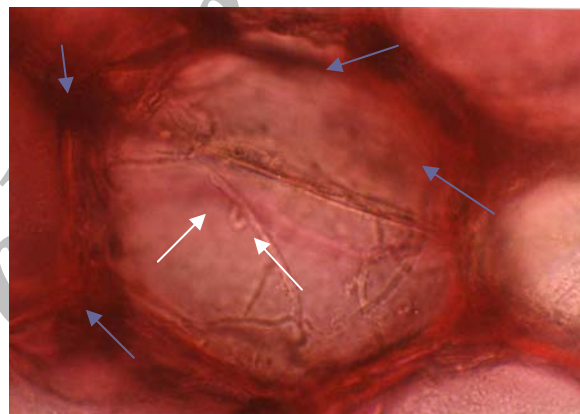
Fig. 7. Arrows shown phenolic compounds and lignin accumulated in infected susceptible cortical tissue (Negeen cv., left), in comparison with infected resistant tissue (Festival cv., right), at day 10 after inoculation with *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum* ( $\times 100$  )

معتقدند که روند بیماری‌زایی، عمدتاً به واسطه زمان و مدت وقوع واکنش‌ها تعیین می‌شود.

فوزاریوم عامل پوسیدگی شمرده شوند. بیکن و همکاران (Beckman *et al.*, 1974) نیز



شکل ۸- تجمع ترکیبات پکتیکی در بافت حساس (سمت راست) و مقاوم (سمت چپ) آلوده به قارچ، ۱۸ روز بعد از مایه‌زنی با *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum* (×۱۰۰)  
Fig. 8. Accumulation of pectic compounds in infected susceptible (right) and resistant tissue (left), at day 18 after inoculation with *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum* (×100)



شکل ۹- ضخیم شدن دیواره سلول و محصور شدن ریشه‌های قارچ (پیکان‌های روشن) توسط ترکیبات پکتیکی (پیکان‌های تیره رنگ) در بافت مقاوم، ۱۸ روز بعد از مایه‌زنی با *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum* (×۵۷۰)  
Fig. 9. Cell wall thickening and restriction of fungal hyphae (light arrows) with pectic compounds (dark arrows) in resistant tissue at day 18 after inoculation with *F. oxysporum* f.sp. *radicis- cucumerinum* (×570)

بیماری شود. از طرفی اگر صدمه دیدن سلول‌ها و آزاد شدن ترکیبات فنلی به صورت تدریجی و فعالیت این ترکیبات با تأنی همراه باشد،

صدمه سریع به سلول‌ها می‌تواند به آزاد شدن سریع و فعالیت این ترکیبات فنلی متمرکز یافته منجر شده و باعث جلوگیری مؤثر از نفوذ عامل



تجمع مواد تیره الکترونی و کریستال‌ها در دیواره سلولی را از مهم‌ترین عوامل مقاومت بر شمردند. مقایسه نمونه‌هایی از ارقام مقاوم و حساس میخک آلوده با *F. oxysporum* از نظر ترکیبات دیواره سلولی (سلولز، پکتین و کیتین) در بافت‌های آوندی و پارانشیم اطراف آن نشان داد که، واکنش‌های سریع سلولی و تغییرات دیواره سلول از جمله افزایش میزان این ترکیبات، به خصوص سلولز و رسوب سوبرین در بافت‌های هیپر پلاستیک، از اصلی‌ترین فاکتورهای اولیه محدود کننده توسعه عامل بیماری‌زا و دفاع میزبان و در نهایت توقیف نهایی عامل بیماری‌زا است (Ouellette et al., 2002). در گوجه‌های آلوده به پوسیدگی باکتریایی *Ralstonia solanacearum* درجات بالاتری از استریفیکاسیون متیلی هومو گالاکتورونان (Homogalactronan)، یکی از پلی ساکاریدهای پکتیکی دیواره‌های سلولی ساقه و ریشه رقم مقاوم Hawaii7996 نسبت به رقم حساس L390 دیده شد و نیز با کاربرد روش‌های زیست‌سنجی و نشان‌دار کردن این ترکیبات، حضور بیشتر ترکیبات نشان‌دار پکتیکی در لوله‌های منفرد آوندی در رقم مقاوم به اثبات رسید (Wydra and Beri, 2006). البته مکانیسم مقاومت ممکن است با پدیده‌های دیگر مثل تولید فیتوالکسین ارتباط داشته باشد (Pandey et al., 1997)؛

گسترش بیشتر عامل بیماری‌زا و نهایتاً توسعه علائم را به دنبال دارد. نتایج آزمایش‌های متعدد نشان داده تجمع ترکیبات پکتیکی و تغییرات دیواره سلول‌های گیاه، ارتباط مستقیم با ضخامت دیواره‌های سلولی در ارقام مقاوم دارد و گسترش عامل بیماری‌زا در این ارقام به بافت‌های سطحی محدود می‌شود. مشاهده این ترکیبات دلیل بر فعال بودن آنزیم‌های پکتیکی و هیدرولیتیک در پوسیدگی‌ها، آلودگی‌های آوندی و گرفتگی آوندی بوده و عموماً مربوط به بافت‌هایی است که مورد حمله بیمارگر قرار گرفته‌اند (Beckman and Halmos, 1962)؛ علاوه بر (Beckman and Zarogian, 1967). این، در شکل‌های مربوط به اضمحلال سلول‌ها در رقم مقاوم و حساس دیده شد که دیواره سلول‌های رقم مقاوم بر خلاف رقم حساس، در برابر مضمحل شدن مقاومت بیشتری از خود نشان داده است بنابراین می‌توان گفت آزاد شدن و تجمع ترکیبات پکتیکی در دیواره سلول‌های رقم مقاوم، می‌تواند همراه با استحکام و جلوگیری از مضمحل شدن دیواره سلول در این ارقام و محصورکننده عامل بیماری‌زا و به مرور زمان اضمحلال بافت قارچ و جلوگیری از توسعه بیشتر آن باشد. او و هنسن (Oh and Hansen, 2007) نیز تغییرات ساختمانی در ریشه و ساقه‌های مقاوم در برابر عوامل پوسیدگی قارچی مانند *Phytophthora spp.* شامل اضمحلال سلول‌ها، ضخامت دیواره سلولی، اندام‌های ترشحی،

جمله ترکیبات سلولزی و پکتیکی و در درجات پایین‌تر، ترکیبات لیگنینی باشد. ولی با این حال نمی‌توان مکانیسم پیچیده مقاومت در گیاهان را به چند دلیل عمده محدود کرد و لذا این فرضیات به مطالعات بیشتر از جمله بررسی‌های بیوشیمیایی آنزیم‌های عمده هیدرولیتیک (کتینازها، پکتینازها و سلولازها) و نیز فیتوالکسین‌ها نیاز دارد.

#### سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران انجام شده که بدین وسیله قدردانی می‌شود. از محققین و تکنیسین‌های بخش تحقیقات گیاهپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی استان تهران، ورامین که به نحوی در اجرای این تحقیق نگارندگان را یاری دادند، سپاسگزاری می‌شود.

#### References

- Agrios, G. N. 1997. Plant Pathology. Academic Press, New York, U.S.A. 803pp.
- Baayen, R. P., Ouellette, G. B., and Rioux, D. 1996. Compartmentalization of decay in carnations resistant to *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. Phytopathology 86: 1018-1031.
- Beckman, C. H., and Halmos, S. 1962. Relation of vascular occluding reactions in banana roots to pathogenicity of root invading fungi. Phytopathology 52: 893-897.
- Beckman, C. H., Muller, W. C., and Mace, M. E. 1974. The stabilization of artificial and natural cell wall membranes by phenolic infusion and its relation to wilt disease resistance. Phytopathology 64: 1214-1220.
- Beckman, C. H., and Talboys, P. W. 1981. Anatomy of resistance. pp. 487-521. In: Mace, M. E., Bell, A. A., and Beckman, C. H. (eds.). Fungal Wilt Disease of Plants.

(Ullstrup, 1937؛ Bell and Mace, 1981). از طرفی ممکن است مقاومت به علت وجود ترکیبات ضد قارچی یا بازدارنده در بافت‌های گیاهان آلوده به فوزاریوم باشد (MacHardy and Beckman, 1981)؛ (McCance and Drysdale, 1975) و یا ممکن است حساسیت به قارچ عامل بیماری به علت سمیت‌زدایی ترکیبات بازدارنده قارچی که به اندازه کافی برای محدود کردن حمله قارچ وجود دارد باشد (Talboys, 1983). آنچه که در مورد مطالب بالا و نتایج به دست آمده در تحقیق حاضر شایان توجه است این است که، اگر مقاومت در رقم مقاوم مربوط به دیواره سلولی سلول‌های کورتکس باشد، همان‌طور که در مشاهدات هیستوپاتولوژیکی مربوط به ترکیبات پکتیکی مشاهده شد، یکی از دلایل استحکام دیواره سلولی و مضمحل نشدن سریع آن می‌تواند مربوط به ترکیبات دیواره سلول از

- Academic Press, New York, U.S.A.
- Bell, A. A. and Mace, M. E. 1981.** Biochemistry and physiology of resistance. pp: 431-480. In: Mace, M. E., Bell, A. A., and Beckman, C. H. (eds.) Fungal Wilt Disease of Plants. Academic Press, New York, U.S.A.
- Benhamou, N., and Blanger, R. R. 1998.** Benzothiadiazole-Mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. Plant Physiology 118: 1203–1212.
- Bruzzess, E., and Hassan, S. 1983.** A whole leaf clearing and staining technique for host specificity studies of rust fungi. Plant Pathology 32: 335-358.
- Buchenauer, H. 1998.** Biological control of soil-borne diseases by rhizobacteria. Journal of Plant Disease Protection 105: 329-348.
- Carlile, M. J., and Watkinson, S. C. 1995.** The Fungi. Academic Press, San Diego, California, U.S.A.
- Cerkauskas, R. F., and Brown, J. 2001.** First report of fusarium stem and root rot of greenhouse cucumber. Plant Disease 85: 1028.
- Dehghani, A. 1998.** Studies on resistance of lettuce cultivars to fusarium wilt. MSc. Thesis, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran. 136 pp. (in Persian).
- Fang, X. 2006.** Chemical composition of soybean root epidermal cell walls. MSc. Thesis, UK. 161 pp.
- Gamliel, A., Katan, T., Yunis, H., and Katan, J. 1996.** Fusarium wilt and crown rot of sweet basil: Involvement of soilborne and airborne inoculum. Phytopathology 86: 56-62.
- Hood, M. E., and Shew, H. D. 1996.** Applications of KOH-aniline blue fluorescence in the study of plant- fungal interactions. Phytopathology 86: 704-708.
- Hooker, W. J. 1967.** A microtome for rapid preparation of fresh sections of plant tissue. Phytopathology 57: 1126-1130.
- Kroes, G. M., Baayen, R. P., and Lange, W. 2004.** Histology of root rot of flax seedlings (*Linum usitatissimum*) infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lini*. European Journal of Plant Pathology 104: 725-736.
- Matern, U., and Kneusal, R. E. 1988.** Phenolic compounds in plant disease resistance. Phytoparasitica 16: 153-170.
- McCance, D. J., and Drysdale, R. B. 1975.** Production of tomatine and rishitin in

- tomato plants inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopercisi*. *Physiological Plant Pathology* 7: 221- 230.
- MacHardy, W. E., and Beckman, C. H. 1981.** Vascular wilt Fusaria: Infection and pathogenesis. In: Tousson, T. A., and Cook, R. J. (eds.). *Fusarium: Disease, Biology and Taxonomy*. Nelson, P. E., Pennsylvania State University Press, U.S.A.
- McNally, D. J., Wurms, K. V., Labbé, C., and Bélanger, R. R. 2004.** Synthesis of C-glycosyl flavonoid phytoalexins as a site-specific response to fungal penetration in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63: 293-303.
- Molavi, E., Aminian, H., Etebarian, H. R., and Shahriari, D. 2008.** Fusarium stem and root rot of greenhouse-cucumber, determination of pathogen host range and comparison the resistance of several greenhouse-cucumber cultivars to disease. *Proceedings of the 18<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress*, Hamedan, Iran. p. 20. (in Persian).
- Moreno, A., Alferez, A., Aviles, M., Dianez, F., Blanco, R., Santos, M., and Tello, J. C. 2001.** First report of *F. oxysporum* f.sp. *radicis-cucumerinum* on cucumber in Spain. *Plant Disease* 85: 1206.
- Oh, E., and Hansen, E. M. 2007.** Genetics and resistance histopathology of infection and colonization of susceptible and resistant Port-Orford-cedar by *Phytophthora lateralis*. *Phytopathology* 97: 684-693.
- Ouellette, G. B., Rioux, D., Simard, M., and Baayen, R. P. 2002.** Reactions of paratracheal cells of resistant and susceptible carnation (*Dianthus caryophyllus*) cultivars to vascular invasion by *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*. *New Phytologist* 156: 113-128.
- Pandey, R. N., Pauer, S. E., and Bhatia, C. R. 1997.** Interaction between *Fusarium udum* and wilt susceptible and resistant pigeonpea genotypes: fungal growth and histopathology. *Indian Phytopathology* 50: 53-58.
- Peterson, J. L., and Pound, G. S. 1960.** Studies on resistance in raddish to *Fusarium oxysporum* f.sp. *conglutinans*. *Phytopathology* 50: 807-816.
- Punja, Z. K., Parker, M., Rose, S., and Louie, D. 1998.** Occurrence of fusarium crown and root rot a new disease on greenhouse cucumber in British.Columbia, caused bt *Fusarium oxsporum* f.sp. *radicis*. *Canadian Journal of Planr Pathology* 98: 174-185.



- Reverchon, S., Monnet, Y., Beliard, E., and Albouvette, C. 2000.** Du nouveau sur les Fusariosis du concombre. *Phytoma* 530: 36-38.
- Shahriari, D., and Zare, R. 2006.** Fusarium stem and root rot of greenhouse-cucumber. Proceedings of the 17th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran (in Persian).
- Talboys, P. W. 1983.** Water deficits in vascular disease. pp. 255. In: *Water Deficits and Plant Growth, Vol 1.* Academic Press, New York, U.S.A.
- Ullstrup, A. J. 1937.** Histological studies on wilt of China aster. *Phytopathology* 27: 737-748.
- Vakalounakis, D. J. 1996.** Root and stem rot of cucumber caused by *Fusarium oxysporum* f.sp *radicis-cucumerinum*. *Plant Disease* 80: 313-316.
- Vakalounakis, D. J., Wang, Z., Fragkiadakis, G. A., Skaracis, G. N., and Li, D. B. 2004.** Characterization of *Fusarium oxysporum* isolates obtained from cucumber in China. *Plant Disease* 88: 645-649.
- Van Alfen, N. K. 1989.** Reassessment of plant wilt toxins. *Annual Review of Phytopathology* 27: 533-550.
- Walker, J. C. 1935.** A study of resistance to fusarium wilt in Alaska peas. *American Journal of Botany* 22: 849-857.
- Wydra, K., and Beri, H. 2006.** Structural changes of homogalacturonan, rhamnogalacturonan I and arabinogalactan protein in xylem cell walls of tomato genotypes in reaction to *Ralstonia solanacearum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 68: 41-50.
- Xu, L., Nonomura, T., Suzuki, S., Kitagawa, Y., Tajima, H., Okada, K., Kusakari, S., Matsuda, Y., and Toyoda, H. 2006.** Symptomatic evidence for differential root invasion by Fusarium crown and root rot pathogens between common tomato (*Lycopersicon esculentum*) and its varieties. *Phytopathology* 96: 577-586.