آفات و بيماري‌هاي گياهي
جلد ۸۰، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۱

تنوع بيماري‌زائي جدايه‌هاي *Pythium aphanidermatum* عامل پوسيدگي ريشه چغندرقند در ايران

مژده کاکوئي نژاد[۱]✉، سيد باقر محمودي[۱]، پيمان نوروزي[۱] و جمشيد سلطاني[۲]
۱- موسسه تحقيقات اصلاح و تهيه بذر چغندرقند، کرج
۲- مرکز تحقيقات کشاورزي و منابع طبيعي استان خراسان رضوي، بخش تحقيقات چغندرقند، مشهد
(تاريخ دريافت: خرداد ۱۳۹۱؛ تاريخ پذيرش: شهريور ۱۳۹۱)

چکيده

در سال‌هاي ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۹ از مناطق عمده کشت چغندرقند در مراحل مختلف رشد محصول نمونه برداري شد. از مجموع ۷۱ نمونه بيمار، ۲۳ جدايه *P. aphanidermatum* خالص سازي و شناسائي گرديد. بررسي تنوع بيماريزائي در مراحل بذر، گياهچه و گياه بالغ، نشان داد که جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* از نظر بيماريزائي اختلاف معني داري با يکديگر دارند. جدايه‌هاي مورد بررسي در سه گروه بيماريزاي قوي، متوسط و ضعيف گروه بندي شدند. در هر سه مرحله از آزمون بيماريزائي جدايه 8P از استان آذربايجان غربي، بيماريزاترين جدايه در بين جدايه‌هاي مورد بررسي بود. همچنين از واکنش زنجيره‌اي پلي مراز جهت تائيد شناسائي جدايه‌هاي*P. aphanidermatum* استفاده شد. نتايج نشان داد که در جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* آغازگر OPA-15 ايجاد يک قطعه تقريبي ۲۰۰۰ جفت بازي (bp) و آغازگر OPB-08 ايجاد دو قطعه تقريبي ۱۰۰۰ و ۱۸۵۰ جفت بازي (bp) نمود. اين سه قطعه در تمام جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* مورد بررسي، تکثير شد. الگوي بدست آمده در جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* با هيچکدام از جدايه‌هاي *P. ultimum*، *P. oligandrum*، *P. deliense*، *Phytophthora drechsleri*، *Fusarium solani* و *Rhizoctonia solani* شباهت نداشت. بدين ترتيب مي‌توان از دو آغازگر OPA-15 و OPB-08 در شناسايي جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* از گونه‌هاي ديگر پي‌تيوم و ساير قارچ‌هاي مسبب پوسيدگي ريشه چغندرقند استفاده نمود.
واژه‌هاي کليدي: چغندرقند، پوسيدگي ريشه، تنوع بيماريزائي، PCR.

Pathogenic variability of *Pythium aphanidermatum* isolates the causal agent of sugar beet root rot in Iran

M. KAKUEI NEZHAD[1]✉, S. B. MAHMOUDI[1], P. NOROOZI[1] and J. SOLTANI[2]
1- Sugar Beet Seed Institute, Karaj, Iran
2- Department of sugar beet research, Razavi-Khorassan Research Center for Agriculture and Natural Resources, Mashhad, Iran

Abstract

During 2007-2010, diseased samples of sugar beet were collected from fields in major sugar beet production areas of Iran in different growth stages. From 71 diseased samples, 23 isolates of *Pythium aphanidermatum* were isolated. On the basis of pathogenic variability in seed, seedling and mature stages of sugar beet, the results showed that *P. aphanidermaum* isolates have significant differences in their pathogenicity. All of the tested isolates were classified in 3 groups with high, moderate and low pathogenicity. 8P isolate from West Azarbaijan province had the highest pathogenicity among investigated isolates in each 3 stages. PCR fingerprinting was used to confirm identification of *P. aphanidermatum* isolates. The results showed an individual band approximately 2000 bp using OPA-15 and two bands (1000 and 1850 bp) using OPB-08 decamer primers. The bands were observed through all *P. aphanidermatum* isolates. The banding patterns of *P. aphanidermatum* was not similar to other species including *P. ultimum, P. oligandrum, P. deliense, Phytophthora drechsleri, Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani*. It seems that OPA-15 and OPB-08 primers are capable to identify *P. aphanidermatum* from other root rot agents of sugar beet as well as other *pythium* species.
Key words: sugar beet, root rot, pathogenic variability, PCR.

✉ **Corresponding author: m.kakuei@gmail.com**

مقدمه

پوسيدگي ريشه عامل اصلي محدود كننده توليد چغندرقند در بسياري از مناطق كشت‌اين محصول مي باشد (Gallian, 2001). عوامل پوسيدگي ريشه در مناطق كشت اين محصول در ايران متفاوت است.اين عوامل به تنهائي يا در كنار هم موجب پوسيدگي ريشه چغندرقند و ساير گياهان مي‌گردند (Behdad, 1996). Mahmoudi and Soltani (2005) گزارش كردند كه در ميان عوامل مسبب پوسيدگي ريشه، سه نوع پوسيدگي ريزوكتونيائي، فيتوفترائي و پي‌تيومي در ايران از اهميت بسيار بالائي برخوردار است. در ايران گزارش‌هاي مختلفي مبني بر وجود گونه‌هاي مختلف پي‌تيوم روي چغندرقند وجود دارد. Ahmadinejad and Okhovat (1976)، گونه *P. aphanidermatum* را به عنوان يكي از عوامل مهم فساد بذر، مرگ گياهچه و پوسيدگي ريشه در ايران معرفي كردند. بيمارگر *P. aphanidermatum* هم چنين عامل مرگ گياهچه و پوسيدگي ريشه در استان‌هاي فارس (Fasihiani, 1991)، خراسان (Abasi Moghadam *et al*., 1998; Afzali and Ershad, 2006)، البرز (Mahmoudi *et al*., 2000; Arzanlou *et al*., 2000)، كرمانشاه، آذربايجان‌غربي (Irani and Ershad, 1995; Sheikholeslami *et al*., 2005)، قزوين (Davoodee and Afzali, 2006)، مي‌باشد. در سال ۱۳۷۹، براي اولين بار *P. deliense* به عنوان عامل پوسيدگي ريشه چغندرقند معرفي گرديد (Afzali and Banihashemi, 2000). همچنين *P. ultimum* var *ultimum* نيز به عنوان عامل مرگ گياهچه و پوسيدگي ريشه در چغندرقند گزارش شده است (Kashi *et al*., 2000). Zamani Noor *et al.* (2004) در خوزستان نقش گونه‌هاي پي‌تيوم در پوسيدگي ريشه چغندرقند را مورد بررسي قرار داده و به ترتيب فراواني گونه‌هاي: *P. aphanidermatum*، *Pythium* group "F"، "G"، *P. oliganderum*، *P. deliense*، *Pythium* group "HS"، *P. ultimum* var *ultimum* و *Pythium* group "T" را به‌عنوان عوامل گياهچه ميري در چغندرقند عنوان كردند.

شناسائي و تفكيك اين بيمارگرها با روش‌هاي سنتي وقت‌گير بوده و به مطالعات ميكروسكوپي گسترده نياز دارد. همچنين گونه *P. deliense* Meurs به عنوان يكي از گونه‌هاي پي‌تيوم از نظر موفولوژيكي به گونه *P. aphanidermatum* شباهت زيادي دارد (Van der Plaasts-Niterink, 1981) و تفكيك‌اين دو گونه از يكديگر مشكل مي‌باشد.

در سال‌هاي اخير، چندين روش مولكولي مبتني بر DNA پي‌تيوم براي رديابي و شناسائي گونه‌هاي مختلف آن توسعه يافته‌اند كه دقت بالايي در تفكيك در سطح گونه‌ها داشته‌اند (Olive and Bean, 1999). Herreo and Klemsdal (1998) با استفاده از دو آغازگر OPA-15 و OPB-08، ۲۰ جدايه *P. aphanidermatum* جداسازي شده از گياه خيار را كه از مناطق جغرافيايي مختلف (نروژ، انگلستان، اسپانيا، فرانسه، بلغارستان، اسرائيل، سوماترا،هاوائي و آمريكا) جمع آوري شده بودند را مورد بررسي قرار دادند. آن‌ها استفاده از PCR- RAPD را براي شناسايي *P. aphanidermatum* موثر دانستند و توانستند *P. aphanidermatum* را از ساير گونه‌هاي پي‌تيوم شامل *P. deliense*، *P. ultimum*، *P.irregular* و *P. paroecandrum* تفكيك كنند.

علي رغم اهميت بسيار بالاي بيمارگر پي‌تيوم در كاهش كميت و كيفيت چغندرقند تحقيقات كمي در سطح دنيا در رابطه با شبه قارچ *P. aphanidermatum* در چغندرقند صورت گرفته است چرا كه در اروپا كه مهد زراعت چغندرقند است، عواملي همچون *Aphanomyces cochlioides* و *P. ultimum* بيشترين خسارت را به‌اين محصول وارد مي‌سازد. در ايران نيز در غالب پژوهش‌ها بيشتر به شناسائي علل مسبب پوسيدگي ريشه چغندرقند پرداخته شده است و در مورد بيماريزائي اين گونه مهم و خسارتزا تحقيقات اندكي صورت گرفته است.

اهميت تنوع در بيماري‌زايي بيمارگرها، از زواياي مختلف مورد نظر بيماري شناسان گياهي و متخصصين اصلاح نباتات مي‌باشد. بيماري شناسان به دنبال بررسي علل و عوامل تأثيرگذار بر تغيير در بيماري‌زايي بيمارگرها، فراواني ژن‌هاي بيماري‌زا از نظر زماني و مكاني و مطالعه اپيدميولوژي بيمارگرهاي حامل ژن‌هاي مختلف بيماري‌زايي هستند. از طرفي متخصصين اصلاح نباتات تنوع در بيماري‌زايي بيمارگرها را بدليل تأثير آن بر پايداري مقاومت ميزبان حائز اهميت دانسته و شكسته شدن مقاومت ارقام را به اين مسئله نسبت مي‌دهند (Peever *et al*., 2000). دستيابي به ارقامي با مقاومت مطلوب و پايدار علاوه بر دسترسي به منبع مقاومت، به شناخت كافي از ژنتيک بيمارگر و ميزبان نيز وابسته است.

از آنجائيكه مؤثرترين روش مديريت بيماري‌هاي خاك‌زاد، اصلاح رقم‌هاي مقاوم و استفاده از آن‌ها در مزارع آلوده است (Hecker and Ruppel, 1977; Scholten *et al*., 2001; Büttner *et al*., 2004) و يكي از ملزومات ارزيابي‌هاي ژرم پلاسم كه با هدف تعيين مقاومت ژنتيكي انجام مي‌شود، دستيابي به جدايه‌اي با بيماري‌زائي بالا است، پژوهش حاضر با هدف جداسازي، شناسائي و بررسي تنوع بيماريزائي جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* از ريشه‌هاي چغندرقند با علائم پوسيدگي ريشه از مناطق مختلف كشور بوده است. اين تحقيق گام بنيادي و مقدمه‌اي براي توسعه استراتژي اصلاح ارقام مقاوم به پوسيدگي پي‌تيومي ريشه چغندرقند مي‌باشد.

روش بررسي

نمونه‌برداري و جداسازي جدايه‌ها: طي سال‌هاي ۱۳۸۶ تا ۱۳۸۹ از مزارع چغندركاري مناطق مختلف كشور از جمله استان‌هاي آذربايجان غربي، خراسان، اصفهان، فارس، البرز، كرمانشاه، لرستان، مركزي و همدان تعداد ۷۱ نمونه با علائم پوسيدگي ريشه به آزمايشگاه منتقل شدند. در آزمايشگاه پس از شستشو و ضدعفوني سطحي ريشه‌ها با الكل ۷۵ درصد، از مرز نواحي سالم و آلوده ريشه‌هاي چغندرقند قطعات ۵-۳ ميلي‌متر مربعي تهيه شد، قطعات به دست آمده روي كاغذ صافي و در زير هود خشك گرديد و تحت شرايط سترون به محيط كشت CMA (Corn meal agar) منتقل شد. تشتك‌هاي پتري در دماي ۲۷ درجه سلسيوس نگهداري شده و جهت مشاهده رشد قارچ، روزانه مورد بررسي قرار گرفتند. جهت خالص سازي پرگنه‌ها به روش نوك ريسه، بلوك‌هاي ميسليومي ۵-۶ ميلي‌متر مربعي از حاشيه پرگنه‌هاي جوان در حال رشد از محيط كشت CMA به محيط آب آگار ۲ درصد انتقال داده شد. بعد از ۲۴ تا ۴۸ ساعت با استفاده از روش كشت نوك ريسه، قطعات جدا شده به محيط CMA انتقال يافتند. بعد از رشد ريسه‌ها وايجاد پرگنه‌ها به منظور تشخيص جنس، با استفاده از بذور شاهدانه و برگ چمن طعمه گذاري شدند.

شناسائي مرفولوژيك: جدايه‌هاي پي‌تيوم بر اساس كليدهاي موجود مورد شناسائي قرار گرفتند (Van der Plaasts-Niterink, 1981; Dick, 1990). خصوصيات مرفولوژيک مورد بررسی شامل نوع اسپورانژيوم (كروي، انگشتي و يا لپ‌دار)، تزئينات ااوگونيوم (صاف يا تزئين شده) گسترش ااوسپور در داخل ااوگونيوم (پلروتيک يا اپلروتيک)، نحوه اتصال آنتريدي به ااوگونيوم (منوكلينوس يا دي كلينوس) و تشكيل تورم هيفي بود.

تنوع بيماريزايي جدايه‌هاي ***P. aphanidermatum*** :

الف- روي ريشه چغندرقند در شرايط آزمايشگاهي: به منظور بررسي تنوع بيماريزائي ۲۲ جدايه *P. aphanidermatum* و يک جدايه *P. oligandrum* (به عنوان شاهد غير بيماريزا) در شرايط آزمايشگاه از ريشه‌هاي ۷۰۰-۵۰۰ گرمي رقم زرقان استفاده شد. بر اساس روش كرمارك و موفات (Cormarc and Moffat, 1961)، در دو طرف يک ريشه ضدعفوني شده، با چوب پنبه سوراخ كن دو حفره مقابل هم ايجاد شد. يك قرص پنج تا هشت ميلي‌متري از حاشيه‌ي فعال كشت دو روزه‌ي جدايه‌ي مورد نظر را در يك حفره ريشه قرار داده و در حفره طرف مقابل آن يك قرص از محيط آب آگار به عنوان شاهد

مايه زني و سپس قطعه خارج شده از ريشه در جاي خود قرار داده شد و بعد از پيچيدن پارافيلم دور آن به مدت يك هفته تا ۱۰ روز در دماي۲۷°C نگهداري شدند. آزمايش در قالب طرح كاملاً تصادفي با ۳ تكرار انجام شد. آزمايش با جدايه‌هاي منتخب با سطوح مختلف بيماريزائي بر اساس آزمايش اوليه با ۶ تكرار مجددا تكرار شد. پس از ۱۰ روز در محل مايه زني شده برش عرضي داده شد و در صورت مشاهده علائم پوسيدگي و تغيير رنگ ميزان پوسيدگي در داخل بافت توسط مقياس استاندارد (۹-۱) اندازه‌گيري گرديد (Büttner *et al.*, 2004). دراين مقياس ريشه‌هاي سالم نمره يک و ريشه‌هاي كاملاً پوسيده نمره نه را دريافت كردند.

ب- روش درون شيشه‌اي: در اين آزمايش از بذر چغندرقند رقم رسول استفاده شد. بذرهاي جوانه زده، پيرامون پرگنه در حال رشد جدايه‌هاي مورد نظر در تماس مستقيم با ميسليوم در تشتک پتري قرار گرفتند (Mahmoudi *et al.*, 2004). آزمايش در قالب طرح كاملاً تصادفي با ۱۰ تكرار انجام شد. شدت آلودگي گياهچه‌ها تا سه روز بعد با مقياس چهارگانه (Carling *et al.*, 2002) اندازه‌گيري شد.

شاخص شدت بيماري با محاسبه ميانگين نمرات گياهچه‌هاي هر تشتک پتري در هر يادداشت برداري محاسبه و در نهايت سطح زير منحني پيشرفت بيماري (Area Under Disease Progress Curve) براي هر جدايه بر اساس فرمول زير محاسبه شد.

$$\sum_{i}^{n-1}[(y_i+y_{i+1})/2][t_{i+1}-t_i]$$

كه در آن n تعداد دفعات ارزيابي بيماري، yi شدت بيماري در زمان i و ti زمان است.

- تهيه مايه آلوده كننده برگ چمن: بدين منظور ۰/۵ گرم برگ چمن كه به قطعات ۱ سانتي‌متري خرد شده بود به همراه ۱۰۰ ميلي ليتر آب مقطر در ارلن ۲۵۰ ميلي ليتري ريخته شد و دو روز متوالي توسط اتوكلاو استريل گرديد. هر جدايه نيز بر روي محيط PDA (potato dextrose agar) در تشتک پتري ۹ سانتي‌متري كشت داده شد. پس از اينكه قارچ كل تشتک پتري را پر كرد، محيط كشت به چهار قطعه تقسيم و در هر ارلن يک قطعه قرار داده شد. هفت روز پس از رشد قارچ در ارلن، محتويات هر ارلن به عنوان مايه آلوده كننده در مراحل مختلف رشد گياه در گلخانه مورد استفاده قرار گرفت.

ج- گياهچه: ابتدا در خاک هر گلدان يک كيلوئي، ۱۰۰ ميلي‌ليتر مايه آلوده كننده ريخته شد. سپس در هر گلدان ۲۰ عدد بذر رقم حساس چغندرقند (رسول) كاشته شد. آزمايش در قالب طرح كاملاً تصادفي با سه تكرار براي هر جدايه و براي تيمار شاهد مايه بدون قارچ در نظر گرفته شد. گلدان‌ها تا يک ماه پس از كشت نگهداري شدند. درصد مرگ و مير پس از يک ماه شمارش گرديد. درصد گياهچه استقرار يافته پس از يک ماه در تيمار شاهد غير آلوده كه در آن مايه بدون قارچ ريخته شده بود، بيانگر قوه ناميه بذر مورد استفاده بود. بنابراين اثر قوه ناميه در كليه تيمارها حذف گرديد و سپس نتايج مورد تجزيه و تحليل آماري قرار گرفت.

د- گياه بالغ: براي آزمون گياه بالغ از گياهان ۲، ۳ و ۵ ماهه استفاده گرديد. چهار روز قبل از مايه زني از آب دادن به گلدان‌ها اجتناب گرديد به طوري كه در زمان مايه زني، گياهان كمي پژمرده بودند و خاک گلدان‌ها خشک بود. دراين حالت گلدان‌ها آبياري شدند تا خاک مرطوب گردد و برداشتن خاک اطراف گياه صدمه‌اي به گياه وارد نكند. سپس اطراف ريشه كمي كنار زده شد و در هر گلدان يک كيلوئي، ۱۰۰ ميلي‌ليتر مايه آلوده كننده برگ چمن در كنار ريشه قرار گرفت و روي آن با خاک سترون پوشانيده شد. سپس سوراخ زهكش گلدان را با پارافين جامد بسته و گلدان غرقاب گرديد. بعد از ۲۴ ساعت، سوراخ زهكش گلدان باز شده و از آن به بعد آبياري به صورت عادي صورت گرفت. آزمايش در قالب طرح كاملاً تصادفي با شش تكرار براي گياهان ۲ و ۳ ماهه و بيست تكرار براي گياهان ۵ ماهه اجرا شد. براي تيمار شاهد مايه بدون قارچ در نظر گرفته شد. پس از گذشت ۱۰ روز (گياهان ۲ و ۳ ماهه) و ۱۴ روز (گياهان ۵ ماهه) ريشه‌ها از خاک خارج گرديد. در صورت مشاهده علائم پوسيدگي و تغيير رنگ ميزان پوسيدگي

توسط مقياس استاندارد (۱- ۹) اندازه گيري شد و شاخص بيماري‌زائي (DI) بر اساس فرمول ذيل محاسبه گرديد (Büttner *et al.*, 2004).

Disease Index: DI = [∑(تعداد گياهان واجد آن نمره ×نمره آلودگي) /(تعداد کل گياهان در آن آزمايش]

بررسي‌هاي مولکولي

استخراج **DNA** ژنومي: از کليه جدايه‌هاي *P. aphanidermatum*، دوجدايه *P. ultimum*، يک جدايه *P.oligandrum*، يک جدايه *P. deliense* و همچنين دو جدايه *Rhizoctonia solani*، سه جدايه *Phytophthora drechsleri* و دو جدايه *Fusarium solani* براي مقايسه الگوهاي باندي با آغازگرهاي مورد استفاده، استخراج DNA با روش تغيير يافته دلاپورتا و همکاران انجام شد (Dellaporta *et al.*, 1983). اندازه گيري کميت و کيفيت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و الکتروفورز در ژل ۰/۸ درصد و رنگ آميزي با اتيديوم بروماید انجام گرفت.

واکنش زنجيره‌اي پلي مراز با دو پرايمر اختصاصي **OPA-15** و **OPB-08**: به منظور رديابي سريع جدايه‌هاي قارچي موجود با استفاده از دو آغازگر اختصاصي *P. aphanidermatum* OPA-15 (5' TTCCGAACCC-3') و OPB-08 (5'GTCCACACGG-3') که توسط Herreo and Klemsdal (1998)، جهت شناسائي و تفکيک گونه *P. aphanidermatum* از گونه‌هاي ديگر معرفي شده بود، استفاده گرديد. واکنش زنجيرهاي پلي مراز در حجم نهايي ۲۵ ميکروليتر براي هر واکنش انجام گرفت. حجم مورد نياز DNA در هر واکنش، ۱/۵ ميکروليتر با غلظت ۵۰ng/µl، ۲/۵ ميکروليتر 10x buffer، ۲ ميکروليتر dNTP ۲/۵ ميلي مولار، ۱/۸ ميکروليتر MgCl2 با غلظت ۲۵ ميلي مولار، ۱ ميکروليتر آغازگر با غلظت ۳۰ ng/µl، ۰/۲ ميکروليتر (يک واحد) آنزيم SmarTaq پلي‌مراز بود. واکنش زنجيره پلي‌مراز در دستگاه ترموسايکلر با مراحل زير صورت گرفت: ۵ دقيقه واسرشت سازي اوليه در ۹۴ °C، ۴۰ چرخه شامل واسرشته سازي به مدت ۴۵ ثانيه در دماي ۹۴°C، اتصال به مدت ۴۵ ثانيه در دماي ۳۴ °C، توسعه به مدت ۱۰۰ ثانيه در دماي ۷۲ °C و يک مرحله ۱۰ دقيقه‌اي توسعه نهايي در دماي ۷۲°C براي تکميل طول قطعات تکثير شده در واکنش. سپس الکتروفورز محصولات واکنش PCR در ژل آگارز ۱/۲ درصد با ولتاژ ۱۰۰، رنگ آميزي ژل در اتيديوم بروماید و عکس برداري در دستگاه مستند ساز ژل انجام گرفت. در نهايت الگوي نواربندي ژنوتيپ‌ها روي ژل مشخص شد. شناسائي گونه *P. aphanidermatum* بر اساس حضور (يك) و عدم حضور (صفر) هر يك از باندهاي مورد انتظار به صورت اعداد صفر و يك انجام گرديد.

محاسبات آماري: داده‌هاي بدست آمده از آزمايش‌هاي مختلف با استفاده از نرم افزارهاي SAS و SPSS مورد تجزيه و تحليل قرار گرفتند. تجزيه واريانس بر اساس آزمون دانکن و براي گروه بندي جدايه‌ها از نظرتنوع بيماريزائي، تجزيه خوشه‌اي بر روي مجذور فواصل اقليدسي و به‌روش UPGMA با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد.

نتيجه و بحث

مشخصات کليدي گونه ***P. aphanidermatum***: از مجموع ۷۱ نمونه بيمار، ۲۳ جدايه *P. aphanidermatum* خالص و جدا سازي شد (جدول ۱). مشخصات جدايه‌ها به‌اين شرح بود که: پرگنه‌ها در محيط کشت CMA، سفيد رنگ با ريسه‌هاي هوايي کرکي شکل، عرض هيف‌هاي اصلي بطور متوسط بين ۹-۷ ميکرومتر، اسپورانژيوم‌ها به صورت انگشتي شکل با ابعاد متنوع، ااوگونيوم به صورت انتهايي گرد، با ديواره صاف، قطر متوسط آن بين ۲۹- ۲۵ ميکرومتر، آنتريديوم‌ها اغلب بين ريسه‌اي گاهي انتهايي، کيسه‌اي يا گرزي شکل، نحوه اتصال ااوگونيوم به آنتريديوم به‌صورت پاراجينوس، منوکلاين، يا دي کلاين، قطر ااوسپور به‌طور متوسط بين ۲۲- ۱۸ ميکرومتر، ديواره ااوسپور صاف و بدون تزئينات به ضخامت ۲- ۱ ميکرومتر. متوسط رشد روزانه پرگنه در ۲۵ درجه سلسيوس ۳۳ ميلي‌متر بود.

نتايج آزمون بيماريزايي

تنوع بيماريزايي جدايه‌هـاي ***P. aphanidermatum*** روي ريشه اصلي چغندرقند در آزمايشگاه: نتايج مقايسه ميـانگين داده‌هاي ثبـت شـده از آزمـون مقايسـه بيمـاريزايي در جـدول شماره ٢ آمده است. بر اين اساس جدايه‌هاي 8P و 24P در بين كليه جدايه‌هاي پي‌تيوم در دو آزمايش بالاترين شدت بيمـاري را از خود نشان دادند.

با توجه به حضور كليه جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* در آزمون اول، نتايج آن با استفاده از تجزيه خوشه‌اي، جدايه‌هـاي *P. aphanidermatum* را بـه ٣ گـروه شـديداً بيمـاريزا (HV)، بـا بيماريزايي متوسط (V) و ضعيف (WV) تقسيم نمود (شكل ١). دو جدايه 8P و 24P جمع آوري شده از استان آذربايجان غربي در گروه اول (HV)، جدايه‌هـاي 16P، 17P، 10P، 5P، و 46P در گـروه دوم (V) و جدايـه‌هـاي 13P، 18P، 14P، 19P، 20P، 11P، 15P، 12P، 21P، 23P، 7P، 22P در گروه سوم (WV) قرار گرفتند (شكل ١). تيمار شاهد و ريشه‌هـاي مايـه زنـي شـده بـا گونـه *P. oligandrum* نيز تا پايان آزمايش سـالم بـاقي مانـد. شـكل ٢ شدت بيماريزائي جدايه 8P را در مقايسه با شاهد غيـر آلـوده نشان مي‌دهد.

تنوع بيماريزايـي جدايـه‌هـاي ***P. aphanidermatum*** در روش درون شيشه‌اي: دراين آزمـون تعـداد ۶ تيمـار شـامل ۴ جدايه *P. aphanidermatum* براساس نتايج آزمون آزمايشـگاهي بـه عنـوان نماينـده انتخـاب گرديدنـد. دو جدايـه از گـروه بـا بيماريزاي بالا (8P, 24P) و يک جدايه از گـروه بـا بيمـاريزايي متوسط (46P) و يک جدايه از گروه بيماريزاي ضعيف (18P) و همچنين يـک جدايـه از گونـه غيـر بيمـاريزاي *P.oligandrum* (25P) و به عنـوان شـاهد محـيط كشـت CMA بـدون جدايـه قارچي مورد آزمون قرار گرفتند.

جدول ١- جدايه‌هاي *Pythium aphanidermatum* مورد بررسي

Table 1. *Pythium aphanidermatum* isolates used in this study

Geographic location محل جغرافيائي	**Isolate No** شماره جدايه
خراسان	5P
البرز	7P
آذربايجان غربي	8P
لرستان	10P
لرستان	11P
مركزي	12P
كرمانشاه	13P
لرستان	14P
مركزي	15P
همدان	16P
كرمانشاه	17P
خراسان	18P
آذربايجان غربي	19P
آذربايجان غربي	20P
لرستان	21P
كرمانشاه	22P
لرستان	23P
آذربايجان غربي	24P
خراسان	46P
خراسان	64P
شيراز	65P
شيراز	66P
شيراز	69P
همدان	25P*

*: جدايه *Pythium oligandrum* كه در آزمايشات بـه عنـوان شـاهد غيـر بيماريزا در نظر گرفته شده بود.

*: The *Pythium oligandrum* isolate was used as a non pathogenic check.

جدول ۲- مقايسه قدرت بيماريزائي نسبي جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* روي ريشه *چغندرقند در آزمايشگاه با مقياس (۹-۱)

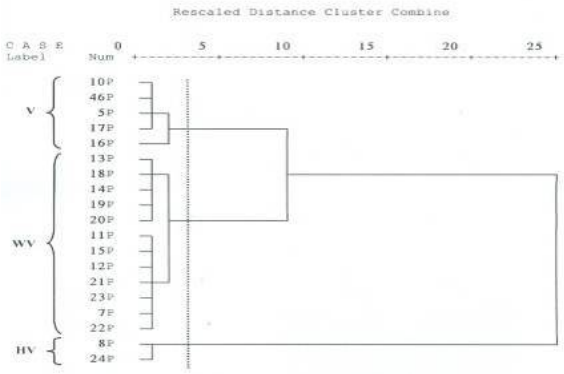
Table 2. Comparison of relative virulence of *P. aphanidermatum* on sugar beet root * in laboratory with scale (1-9)

شماره جدايه **Isolate No.**	آزمايش اول **First test 1**	آزمايش دوم **Second test 2**
5P	5.33 bcd**	---***
7P	4.00 cde	---
8P	8.50 a	8.50 a
10P	5.66 bcd	3.45 bcd
11P	3.33 de	---
12P	3.00 de	---
13P	2.00 e	---
14P	2.33 e	---
15P	3.33 de	---
16P	4.66 cde	---
17P	6.00 bc	4.66 bc
18P	2.00 e	1.91 d
19P	2.33 e	2.33 d
20P	2.66 e	---
21P	3.00 de	---
22P	3.66 cde	---
23P	3.16 de	---
24P	7.66 ab	5.33 b
46P	5.66 bcd	---
65P	---	2.58 cd
66P	---	4.58 bc
69P	---	3.16 bcd
25P * ** *	1	1
شاهد غير آلوده	1	1

*: وزن تقريبي ريشه‌هاي مورد استفاده ۵۰۰-۷۰۰ گرم بوده است؛ **: اختلاف بين ميانگين‌هاي داراي حروف مشترک در هر ستون طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵% معني دار نمي باشند؛ ***: آزمايش نشده است؛ * ** *: جدايه *P. oligandrum*.

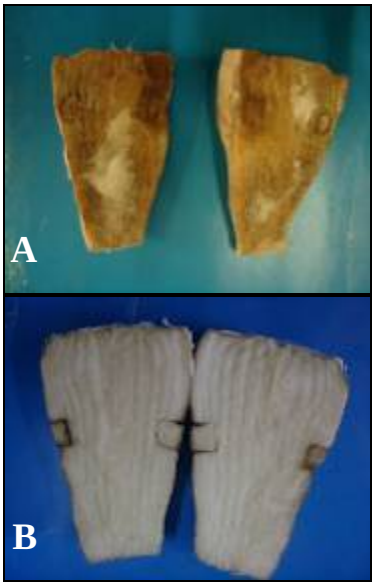
*: Approximate weight of used roots was 500-700 gram; **: Values means followed by the same letter in each column are not significantly different at 5%, according to Duncan's multiple-range test; ***:Not Tested; ****: *P. oligandrum* isolate.

مرگ و مير بذرهاي جوانه زده بسيار سريع صورت گرفت و در ۷۲ ساعت پس از مايه زني آلودگي‌به اوج خود رسيد. بيماري روي بذرهاي جوانه زده از محل برخورد ريسه‌هاي عامل بيماري به سطح ريشه شروع شده و به سرعت پيشروي نمود. در جدايه 25P (*P. oligandrum*) سه روز پس از مايه زني تغيير رنگ بسيار جزئي در برخي از تكرارها مشاهده گرديد.



شكل ۱- دندروگرام حاصل از تجزيه خوشه‌اي جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* در روش آزمايشگاهي(HV: بيماريزاي قوي، V: بيماريزاي متوسط وwv : بيماريزاي ضعيف).

Fig 1. The dendrogram was generated using clusteral analysis *P. aphanidermatum* isolates in laboratory tests (HV: Highly virulent, V: Virulent, WV: Weak virulent)



شكل ۲- شدت بيماري در جدايه 8P (A) در مقايسه با شاهد سالم (B) در روش مايه زني ريشه اصلي پس ۱۰ از روز

Fig 2- Disease severity of 8P isolate (A) in comparison with health check (B) in root inoculation after 10 days

نتايج تجزيه واريانس نشان داد که در روزهـاي اول و دوم بـين جدايـه‌هـاي *P. aphanidermatum* در سـطح احتمـال پـنج درصد اختلاف معني داري وجـود داشـت. ولـي در روز سـوم يادداشت برداري بين جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* اخـتلاف معني‌داري مشاهده نگرديد. با توجه به تمايز بهتر جدايـه‌هـا در روز دوم و پيشرفت مناسب بيماري دراين يادداشـت بـرداري، داده‌هاي ايـن يادداشـت بـرداري معيـار مقايسـه جدايـه‌هـا در روش درون شيشـــه‌اي قـــرار گرفـــت. کليـــه جدايـــه‌هـــاي *P. aphanidermatum* در روز سوم يادداشت برداري از نقطه نظر شدت بيماري مشـابه هـم بـوده و منجـر بـه پوسـيدگي کامـل گياهچه‌ها شدند. با توجه به نتايج مقايسات ميـانگين يادداشـت برداري دوم (جدول ۳)، جدايه 8P در گروه بيمـاريزاي زيـاد و جدايه‌هاي 24P و 46P در گروه بيماريزاي متوسط و جدايه 18P در گروه بيماريزاي ضعيف مشخص شدند.

جـــدول ۳- مقايســـه قـــدرت بيمـــاريزائي نســـبي جدايـــه‌هـــاي *P. aphanidermatum* روي بذر جوانه زده در مجاورت مستقيم ميسـليوم در شرايط درون شيشه‌اي با مقياس(٤- ۰)

Table 3. Comparison of relative virulence of *P. aphanidermatum* isolates on germinated seed in direct contact with mycelium in Petri dish with scale (0-4)

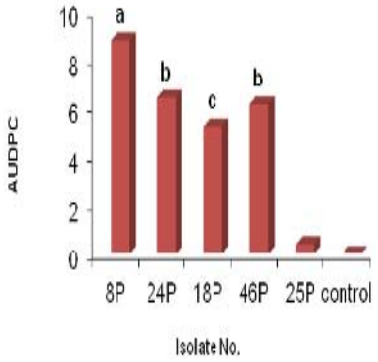
Days after inoculation تعداد روز بعد از مايه زني			Isolate No. شماره جدايه
3	2	1	
4 a	3.64 a	2.06 a*	8P
4 a	2.55 c	1.06 c	18P
3.97 b	2.92 b	1.39 b	24P
4 a	2.94 b	1.27 bc	46P
0.34	0.31	0.04	25P**
0.02	0	0	Control

*:اختلاف بين ميانگين‌هاي داراي حروف مشترک در هر سـتون طبـق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵% معني‌دار نمي‌باشند.

**: جدايه *P. oligandrum*

*: Values means followed by the same letter in each column are not significantly different at 5%, according to Duncan's multiple-range test; **: *P. oligandrum* isolate

همچنين بر اساس نتايج AUDPC نيز جدايه 8P بالاترين سـطح زير منحني و جدايه 18P کمترين سطح زيـر منحنـي را داشـت (شکل ۳).



شکل ۳- مقايسه سطح زير منحني پيشـرفت بيمـاري در جدايـه‌هـاي نماينده *P. aphanidermatum* در آزمايشات درون شيشه‌اي پس از دو روز

Fig. 3. Comparison of AUDPC of representative isolates of *P. aphanidermatum* in *in vitro* tests after two days

تنوع بيماريزايي در مرحله گياهچه: در اين آزمـايش نيـز شش جدايه منتخب *P. aphanidermatum* شامل جدايـه‌هـاي بـا قدرت بيماري‌زايي زياد و ضعيف بر اساس گـروه‌بنـدي روش آزمايشگاهي و شاهد غير آلوده جهت بررسي‌هاي گلخانه‌اي در مرحله گياهچه انتخاب شـدند. چهـار هفتـه پـس از کشـت در شاهد غير آلوده ۸۳/۳۵ درصد از بذور جوانه زدند. اين درصـد جوانه زني بيانگر قوه ناميه بذر مورد استفاده بود. بنابراين پـس از حذف اثر قوه ناميه نتايج مورد تجزيه و تحليل آمـاري قـرار گرفت. نتايج تجزيه واريـانس نشـان داد کـه بـين جدايـه‌هـاي منتخب *P. aphanidermatum* از نظر قدرت بيماري‌زايي اختلاف معني‌داري در سطح احتمال پـنج درصـد وجـود دارد. پـس از گذشت چهار هفته بيشترين درصد مـرگ و ميـر در جدايـه 8P (۹۵/۹۹%) و کمتـــرين درصـــد مـــرگ و ميـــر در جدايـــه 10P (۴۳/۷۷%) مشاهده گرديد (جدول ۴).

جدول ٤- مقايسه بيماريزائي نسبي جدايه‌هـاي *P. aphanidermatum* در مرحله گياهچه چغندرقند در شرايط گلخانه

Table 4. Comparison of relative virulence of *P. aphanidermatum* in seedling stage in greenhouse conditions

Damping - off (%) درصد مرگ و مير	**Isolate No.** جدايه
95.99 a*	8P
43.77 b	10P
85.94 a	15P
47.79 b	17P
91.97 a	22P
83.94 a	46P
0	Control

*:اختلاف بين ميانگين‌هاي داراي حروف مشترک در هر ستون طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵% معني دار نمي باشند.

*: Values means followed by the same letter in each column are not significantly different at 5%, according to Duncan's multiple-range test.

تنوع بيماري‌زايي در مرحله گياه بالغ

آزمون اول (گياهان دو ماهه): آلودگي از قسمت‌هاي انتهاي ريشه شروع و پوسيدگي نرم به رنگ قهوه‌اي رنگ ايجاد شد. با شدت يافتن آلودگي عامل بيماري پوسيدگي به قسمت‌هاي بالاتر گسترش يافته و تمام ريشه سياه گرديد.

نتايج تجزيه واريانس نشان داد که بين جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* در سطح احتمال پنج درصد اختلاف معني‌داري از نظر بيماري‌زائي در گياهچه‌هاي دو ماهه وجود دارد. پس از ده روز جدايه 8P با نمره ۸/۳۳ بالاترين آلودگي را داشت و جدايه 18P با نمره ۳/۵ کمترين ميزان آلودگي را نشان داد (جدول۵).

آزمون دوم (گياهان سه ماهه): نتايج حاصل از تجزيه واريانس نشان داد که بين جدايه‌ها از نظر قدرت بيماري‌زايي اختلاف معني‌داري در سطح احتمال پنج درصد وجود دارد. جدايه‌هاي 8P، 22P، 46P، 14P، 64P و 20P روي گياهان بالغ به ترتيب با نمره‌هاي ۹، ۹، ۹، ۸/۸۳، ۸/۶۶ و ۸/۵ نسبت به ساير جدايه‌ها از بيماري‌زايي بالاتري برخوردار بودند. جدايه 15P با نمره ۳/۵ کمترين ميزان بيماريزايي را در بين جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* به خود اختصاص داد. تيمار شاهد نيز تا پايان آزمايش سالم باقي ماند (جدول ۵).

آزمون سوم (گياهان پنج ماهه): نتايج حاصل از تجزيه واريانس نشان داد که بين جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* از نظر قدرت بيماري‌زايي اختلاف معني داري در سطح احتمال پنج درصد وجود دارد. با توجه به نتايج مقايسه ميانگين، جدايه 8P روي گياهان بالغ نسبت به ساير جدايه‌ها با ميانگين نمره ۷/۸ از بيماري‌زايي بالاتري برخوردار بود و جدايه 18P با نمره ۴/۷۵ کمترين ميزان بيماريزايي، در بين جدايه‌ها را به خود اختصاص داد. تيمار شاهد نيز تا پايان آزمايش سالم باقي ماند (جدول ۵). در صورت بالا بودن رطوبت و مناسب بودن درجه حرارت رشد ميسليوم‌هاي سفيد رنگ روي ريشه‌ها قابل مشاهده بود.

بررسي‌هاي مولکولي: نتايج نشان داد که در جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* آغازگر OPA-15 ايجاد يک قطعه تقريبي ۲۰۰۰ جفت بازي[1] (bp) و آغازگر OPB-08 ايجاد دو قطعه تقريبي ۱۰۰۰ و ۱۸۵۰ جفت بازي (bp) نمود.اين سه قطعه از تمام جدايه‌هاي مورد بررسي بدست آمد (شکل ۴). آغازگر ۱۰ نوکلئوتيدي OPB-08 در جدايه *Phytophthora drechsleri* ايجاد يک قطعه تقريبي ۹۵۰ جفت بازي (bp) و در جدايه *P. ultimum* ايجاد سه قطعه تقريبي ۱۴۰۰، ۹۵۰ و ۶۵۰ جفت بازي (bp) و در جدايه *P. oligandrum* ايجاد سه قطعه تقريبي ۱۸۰۰، ۹۵۰ و ۷۵۰ جفت بازي (bp). نمود ولي در جدايه‌هاي *P. deliense* و *Fusarium solani* هيچ باندي مشاهده نشد. آغازگر ۱۰ نوکلئوتيدي OPA-15 در جدايه *Phytophthora drechsleri* ايجاد يک قطعه تقريبي ۲۴۰۰ جفت بازي (bp)، در جدايه *P. deliense* ايجاد دو قطعه تقريبي ۱۶۵۰ و ۱۳۰۰ جفت بازي (bp) نمود ولي در جدايه‌هاي *P. oligandrum*، *P. ultimum* و *F. solani* هيچ باندي مشاهده نشد (شکل ۴).

۱- Base pair

جدول ۵- مقايسه قدرت بيماريزائي نسبي جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* در گياهان بالغ چغندرقند در شرايط گلخانه با مقياس (۹-۱)

Table 5. Comparison of relative virulence of *P. aphanidermatum* in mature plants in greenhouse conditions with scale (1-9)

5 Months plants گياهان پنج ماهه	3 months plants گياهان سه ماهه	2 months plants گياهان دو ماهه	Isolate No. جدايه
---	8 abc	---	5P
7.8 a	9 a	8.33 a	8P
6 b	5 efg	5.25 bc	10P
---	7.66 abcd	---	11P
---	7.33 abcdef	---	13P
---	8.83 a	---	14P
---	3.5 g	---	15P
---	8 abc	6 b	16P
---	5.83 cdefg	5.5 bc	17P
4.75 c	7.5 abcde	3.5 c	18P
---	6.5 abcdef	---	19P
---	8.5 ab	---	20P
---	5.16 defg	---	21P
---	9 a	---	22P
---	6 bcdefg	---	23P
6.7 b	8 abc	7.5 ab	24P
6.16 b	9 a	5.25 bc	46P
---	8.66 a	---	64P
---	4.83 fg	---	65P
---	2	---	25P**
1	1	1	Control

*:اختلاف بين ميانگين‌هاي داراي حروف مشترک در هر ستون طبق آزمون دانکن در سطح احتمال ۵% معني دار نمي باشند.

**: جدايه *P. oligandrum*

*: Values means followed by the same letter in each column are not significantly different at 5%, according to Duncan's multiple-range test; **: *P. oligandrum* isolate

آغازگر OPA-15 در جدايه‌هاي *R. solani* ايجاد پنج قطعه تقريبي ۲۲۰۰، ۱۲۵۰، ۱۰۰۰، ۱۵۸۰ و ۷۵۰ جفت بازي (bp) و آغازگر OPB-08 ايجاد هفت قطعه تقريبي ۲۵۰۰، ۲۲۰۰، ۱۷۰۰، ۱۵۸۰، ۱۲۰۰، ۱۱۰۰ و ۷۵۰ جفت بازي (bp) نمودند (داده‌ها نشان داده نشدند).

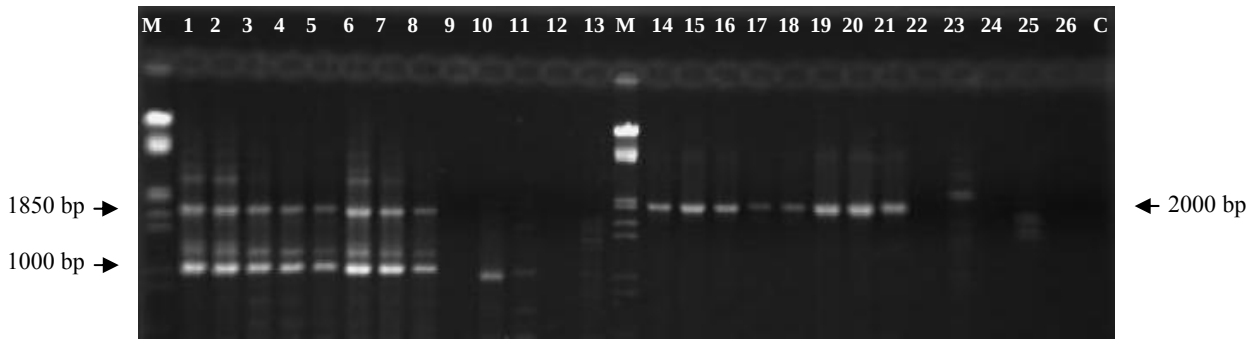
در اين پژوهش، ۲۳ جدايه متعلق به گونه *P. aphanidermatum* جدا شده از ريشه چغندرقند در طي فصل رشد، از مناطق مهم كشت چغندرقند درايران مورد بررسي قرار گرفتند. گونه *P. aphanidermatum* يك بيمارگر خاك‌زاد بوده در دامنه وسيعي از گياهان عامل‌ايجاد مرگ گياهچه و پوسيدگي نرم ريشه‌ها مي‌باشد.اين گونه در ايران به عنوان يكي از عوامل مهم مرگ گياهچه و پوسيدگي ريشه چغندرقند مي‌باشد و در بيشتر مزارع چغندركاري داراي خاک‌هاي سنگين، به‌ويژه در زمين‌هايي كه بيش از حد آبياري مي‌گردند، ديده شده است و در دماهاي بالاي خاک بيشترين خسارت را ايجاد مي‌كند (Zamani noor *et al*., 2004; Babai-Ahary *et al*., 2004).

خصوصيات جدايه‌هاي مورد بررسي در گونه *P. aphanidermatum* با توصيف‌هاي واندر پلات (Van der Plaasts-Niterink, 1981) و ديک (Dick, 1990) تطابق داشت. اين گونه از لحاظ داشتن اسپورانژيوم‌هاي انگشتي متورم با ابعاد مختلف، آنتريديم‌هايي كه معمولاً بين سلولي بوده و ااوسپورهايي كه فضاي داخلي ااوگونيوم را پر نمي‌كنند، شباهت‌هاي بسياري با *P. deliense* دارد. اما در گونه *P. deliense*، ااوگونيوم در محل پايه خود به سمت آنتريديوم خميده شده و قطر كمتري دارد.

در اين بررسي جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* ابتدا به روش آزمايشگاهي مطابق روش كرمارك و موفات (Cormarc and Moffat, 1961)، از نظر بيماريزائي مورد مقايسه قرار گرفتند. بر اساس نتايج به دست آمده، مشخص شد كه دامنه تغييرات بيماريزائي در جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* مورد بررسي گسترده است و در سه گروه بيماريزاي زياد، بيماريزاي متوسط و بيماريزاي ضعيف قرار گرفتند.

همچنين بر اساس نتايج آزمايش‌هاي درون شيشه‌اي دومين روز پس از مايه زني جدايه‌ها براي بررسي تنوع بيماريزائي جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* مناسب مي باشد.

به طوري كه از روز سوم به بعد در كليه جدايه‌ها آلودگي به حداكثر مي رسد و امكان تفكيک جدايه‌ها از نظر بيماريزائي وجود ندارد. بنابراين ازاين روش نيز مي توان براي گروه‌بندي جدايه‌ها از نظر بيماري‌زايي در مرحله جوانه‌زني و رشد اوليه گياهچه‌ها در مدت زمان كوتاه و غربال كردن اوليه جدايه‌ها بهره جست.



شكل ۴- الگـوي بانـدي جدايـه‌هـاي (PA) *Pythium aphanidermatum*، (PU)*Pythium ultimum*، (PD) *Pythium deliense*، (PO) *Pythium oligandrum*، (PHD) *Phytophthora drechsleri*، (FS) *F. solani* با استفاده از آغازگرهاي OPA- 15 و OPB-08. ستون‌هاي ۱-۱۳ جدايـه‌هـاي۱- PA1 ۲- PA2 ۳- PA3 ۴- PA4 ۵-PA5 ۶- PA6 ۷- PA7 ۸- PA8 ۹- FS ۱۰-PHD ۱۱- PU ۱۲- PD ۱۳- PO با استفاده از آغازگر OPB-08 و ستون‌هاي ۲۶-۱۴ جدايه‌هاي ۱۴- PA1 ۱۵- PA2 ۱۶- PA3 ۱۷- PA4 ۱۸-PA5 ۱۹- PA6 ۲۰- PA7 ۲۱- PA8 ۲۲- FS ۲۳-PHD ۲۴- PU ۲۵- PD ۲۶- PO بـا اسـتفاده از آغـازگر OPA- 15 -C كنترل منفي (master mix بدون DNA) M- نشانگر تعيين اندازه DNA (Lambda DNA /EcoRI+HindIII Marker)

Fig 4. Banding patterns of *P. aphanidermatum* (PA), *P. ultimum* (PU), *P. deliense* (PD), *Pythium oligandrum* (PO), *Phytophthora drechsleri* (PHD) and *F. solani* (FS) using primers OPA-15 and OPB-08; lanes 1-13, isolates, PA1, PA2, PA3, PA4, PA5,PA6 , PA7, PA8, FS, PHD, PU, PD and PO using OPA-08; lanes 14-26, PA1, PA2, PA3, PA4, PA5,PA6, PA7, PA8, FS, PHD, PU, PD and PO using OPA-15; C: control reaction (Master mix without template DNA). Lanes M: ladder molecular size marker (Lambda DNA /EcoRI+HindIII Marker)

Zang and Yang (2000) نيز از روش درون شيشـه‌اي بـراي تعيين شدت بيماري جدايه‌هاي *P. ultimum* روي گياهچـه‌هـاي ذرت و سويا استفاده كردند. آن‌ها عنوان كردند كـه ايـن روش مي‌تواند تنوع موجود در بيماريزايي جدايـه‌هـاي *P. ultimum* را نشان دهد. Mahmoudi *et al*. (2004) از اين روش براي بررسـي تنوع موجود در جدايه‌هاي *R. solani* استفاده كردند.

در آزمايش‌هاي گلخانه‌اي در مراحل گياهچه و گيـاه بـالغ نيز به خوبي تفكيك بين جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* از نظر بيماريزائي نمايان بود. همچنين تنوع بيماريزائي درون گونـه‌اي *P. aphanidermatum* و ساير گونه‌هاي پـي‌تيـوم در آزمايشـات محققين ديگر نيز گزارش شـده اسـت (Al- sa'di *et al*., 2003; Herreo *et al*., 2003; Zang and Yang, 2000; Al- sa'di *et al*., 2007). استفاده از مايه آلوده كننده برگ چمن در آزمـايش‌هـاي گلخانه‌اي با توجه به حضـور اسـپورانجيوم و زئوسـپور در آن، بيماريزائي را تسهيل نموده و سبب شد كه برخي از جدايه‌هايي كـه در شـرايط آزمايشـگاهي بيمـاريزائي ضـعيف يـا متوسـط داشتند، در شرايط گلخانه بيمـاريزائي بيشـتري از خـود نشـان دهند. در تحقيق ديگري نيز مشخص شد كه آب اهميت بسـيار زيادي در پراكندگي عامل بيماري در گونـه‌هـاي *Pythium* دارد. زيرا با توجه بـه جمعيـت بيشـتر اسـپورانجيوم در سـطح آب، شرايط مناسب‌تـري بـراي پوسـيدگي ريشـه فـراهم مـي‌شـود (Zentmayer and Erwin, 1970). با اينحال جدايه 8P جمع آوري شده از استان آذربايجان غربـي كـه در شـرايط آزمايشـگاهي و درون شيشه‌اي بيشترين بيماريزائي را داشت. در آزمـايش‌هـاي گلخانه‌اي هم بالاترين قدرت بيماريزائي را به خود اختصـاص داد. همچنين كاربرد روش تنش آبـي قبـل از مايـه زنـي عامـل بيماري، كارائي بيماريزائي را افـزايش داد. زيـرا تـنش آبـي بـا صدمه‌اي كه به غشاي گياهي وارد مـي سـازد، باعـث افـزايش آزادسازي اسيدهاي آمينه و كـاهش قنـد از ريشـه مـي گـردد. افزايش ترشحات ريشه منجر به افزايش جـذب زئوسـپورهـاي متحرک به سمت ريشه مي گردد، از طرفي تنظيم فشار اسمزي در بافت ريشه و يا افزايش در جابجائي كـربن بـه ريشـه‌هـاي تحت تنش آب، ممكن است محركـي جهـت افـزايش رشـد و كلونيزه كردن ريشـه‌هـا باشـد (Ristaino and Duniway, 1989).

Erwin and Robeiro (1996) نيـز گـزارش کردنـد کـه تـنش آب باعث کاهش توليد فيتوالکسين‌ها شده، مقاومت گياه را در برابر بيماري کاهش مي‌دهد. در نتيجه گياه را نسبت به بيمارگرهـاي مختلف مستعد مي‌کند.

يکي از آزمايش‌هايي که در مرحله گياهچه در دماي ۱۸ تا ۲۵ درجه سلسـيوس انجـام شـده بـود موفقيـت آميـز نبـود و بيماريزاي در هيچ يک از جدايـه‌هـا مشـاهده نگرديـد (داده‌هـا نشان داده نشده است). بنابراين سعي شد دماي گلخانه بين ۲۷ تـا ۳۵ درجـه سلسـيوس تنظـيم گـردد. Mc Carter and Littrell (1967) نيز نشان دادنـد کـه حـداکثر شـدت بيمـاريزائي گونـه *P. aphanidermatum* هنگامي است که دماي خاک بين ۲۹ تا ۳۵ درجه باشد و در دمـاي کمتـر از ۲۳ درجـه سلسـيوس ميـزان بيماري و شدت پوسيدگي ريشه کاهش مي‌يابد و در دمـاهـاي پايين تر از ۱۵ درجه سلسـيوس هـيچ گونـه آلـودگي در گيـاه ميزبان انجام نمي‌شود. در بررسي‌هاي مولکولي مشخص شد که الگوهاي بدست آمـده بـا اسـتفاده از آغـازگرهـاي OPA-15 و OPB-08 در جدايـه‌هـاي *P. aphanidermatum* بـا هـم شـباهت دارنـد و صـحت مطالعـات مورفولـوژيکي را تأئيـد کـرد. در جدايه‌هـاي *P. aphanidermatum* آغـازگر OPA-15 ايجـاد يـک قطعه تقريبي ۲۰۰۰ جفت بازي (bp) و آغازگر OPB-08 ايجـاد دو قطعه تقريبي ۱۰۰۰ و ۱۸۵۰ جفت بازي (bp) نمود. اين سه قطعه در تمام جدايه‌هـاي *P. aphanidermatum* مـورد بررسـي، تکثيـر شـد. گـاهي در تکثيـر برخـي از جدايـه‌هـا يکـي از قطعـات مشـاهده نمـي شـد ولـي بـا تکـرار واکـنش قطعـات مشاهده گرديد. اين نتايج مشابه نتايج بـه دسـت آمـده توسـط Herreo and Klemsdal (1998) مي‌باشد. آن‌هـا بـا اسـتفاده از دو آغـازگر OPA-15 و OPB-08، ۲۰ جدايـه *P. aphanidermatum* جداسازي شده از گياه خيار را که از مناطق جغرافيايي مختلـف (نـروژ، انگلسـتان، اسـپانيا، فرانسـه، بلغارسـتان، اسـرائيل، سوماترا،هاوائي و آمريکا) بودند را مورد بررسي قرار دادنـد. در تحقيقات انجام شده توسط آن‌ها نيز آغازگر OPA-15 ايجاد يک قطعـه ۲۱۰۰ جفـت بـازي (bp) و آغـازگر OPB-08 ايجـاد دو قطعه ۱۸۵۰ و ۱۰۵۰ جفت بازي (bp) را نمودند. آن‌ها اسـتفاده از PCR-RAPD را بـراي شنـاسـايـي *P. aphanidermatum* موثر دانستند و بيان داشتند که آغـازگرهـاي OPA-15 و OPB-08 بـا ايجاد ۳ قطعه اصلي پايدار مـي تواننـد در شناسـائي‌ايـن قـارچ مـورد اسـتفاده قـرار بگيرنـد (Herreo and Klemsdal, 1998). بر اساس نتايج تحقيق حاضر نيـزايـن دو آغـاز گـر OPA-15 و OPB-08 مي‌توانند در شناسايي گونه *P. aphanidermatum* جـدا شده از چغندرقند مورد استفاده قرار گيرند. با توجـه بـه اينکـه کليه جدايه‌هاي *P. aphanidermatum* جمـع آوري شـده درايـن پژوهش از ريشه‌هاي چغندرقند داراي علائم پوسـيدگي ريشـه مي باشند و در بين جدايه‌هاي مختلف‌اين گونه تنوع بيماريزائي معني داري وجود دارد، بهتر آن است که در پايه ريزي هر گونه تحقيقي، بويژه ارزيابي مقاومت ارقام به *P. aphanidermatum* از جدايه‌هاي با بيماريزائي بالا استفاده شود.

References

ABASI MOGHADAM, A., M. FALAHATI RASTGAR and B. GAFARPOUR, 1998. Etiology of sugar beet root and crown rot caused in Khorasan. 13th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran, 125 pp.

AFZALI, H. and D. ERSHAD, 2006. The causal agents of root rot and damping-off of sugar beet in Khorasan provience and relation of plant age and *Pythium* spp. Pathogenicity. 17th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran, 101 pp.

AFZALI, H. and Z. BANIHASHEMI, 2000. A new record of a species of *Pythium* as a causal agent of sugar beet root rot in Iran. 14th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan, Iran, 254 pp.

AHMADINEJAD, A. and M. OKHOVAT, 1976. Pathogenicity test of some soil-borne fungi on some important field crops. Iran. Journal of Plant Pathology. 12: 10-18.

AL- SA'DI A. M., A. DRENTH, M. L. DEADMAN, A. W. A. M. DE COCK and E. A. B. AITKEN, 2007. Molecular characterization and pathogenicity of

Pythium species associated with damping-off in greenhouse cucumber (*Cucumis sativus*) in Oman. Plant Pathology.56, 140 –149

AL- SA'DI A. M., A. DRENTJ and M. DEADMAN, 2008. Aggressiveness and metalaxyl sensitivity of *Pythium aphanidermatum* populations infecting cucumber in Oman. Plant Pathology. 57: 45-56.

AL- SA'DI A. M., M. L. DEADMAN, I. KHAN and J. R. THAKER, 2003. Aggressiveness of cucumber isolates of *Pythium aphanidermatum* on tomato and pepper in the Sultanate of Oman, and the relationship between aggressiveness and resistance to the fungicide metalaxyl. In: BCPC International Congress: Crop Science and Technology, 2003, Glasgow, Scotland, UK, 913–8.

ARZANLOU, M., M. OKHOVAT and G. H. HEDJAROUDE, 2000. Identification and pathogenicity of *Fusarium* spp. associated with sugar beet root rot in Karaj. 14th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan, Iran, 258 pp.

BABAI-AHARY, A., A. ABRINNIA and I. MAJIDI HERAVAN, 2004. Identification and pathogenicity of *pythium* species causing damoing- off in sugarbeet in northwest Iran. Australian Plant Pathology. 33: 343-347.

BEHDAD, A. 1996. Iranian Plant Protection Encyclopedia. Yadboud Press. Esfahan. 337 pp. (In Persian)

BÜTTNER, G., B. PFÄHLER and B. MÄRLÄNDER, 2004. Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to *Rhizoctonia* root and crown root. Plant breeding. 123: 158-166.

CARLING, D. E., S. KUMINAGA and A. BRAINARD, 2002. Hyphal anastomosis reactions, rDNA- internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subset of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG- BI. Phytopathology, 92: 43- 50.

CORMARC, M. W. and J. E. MOFFATT, 1961. Factors influencing storage decay of sugar beet by *phoma betae* and other fungi. Phytopathology. 51: 3-5.

DAVOODEE, A. and H. AFZALI, 2006. Identification of fungal agents of sugarbeet root rots in Qazvin region. Iranian Journal of Plant Pathology, Vol. 42.

DELLAPORTA S. L., J. WOOD and J. B. HICKS, 1983. A plant DNA minipreparation version II . Plant Molecular Biology Reporter. 1: 19-21.

DICK, M. W. 1990. Key to Pythium. UK: Reading University Press. 64 p.

ERWIN, D. C. and O. K. RIBEIRO, 1996. Phytophthora : Diseases worldwide. APS Press. St. Paul, Minn. 562p.

FASIHIANI A. 1991. Sugar beet root rot in Fars province. 10th Iranian Plant Protection Congress, Kerman, Iran, 140 pp.

GALLIAN, J. J., 2001. Management of sugar beet root rots. A Pacific Northwest Extension publication.

HECKER, R. J. and E. G. RUPPEL, 1977. Rhizoctonia root rot resistance in sugar beet: breeding and related research. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists. 19: 246-256.

HERREO M. L., A. HERMANSEN and O. N. ELEN, 2003. Occurrence of *Pythium* spp. and *Phytophthora* spp. in Norwegian greenhouses and their pathogenicity on cucumber seedlings. Journal of Phytopathology 151, 36–41.

HERREO, M. L. and S. S. KLEMSDAL, 1998. Identification of *Pythium aphanidermatum* using the RAPD technique. Mycological Research. 102: 136- 140.

IRANI, H. and D. ERSHAD. 1995. Identification of fungi associated with sugar beet root rot in West Azarbaijan provience. 12th Iranian Plant Protection Congress, Karaj, Iran, 126 pp.

KASHI, L., M. J. SOLEIMANI and A. KARGAR-BEIDEH, 2000. Pythium root rot of sugar beet crop in Hamadan province. 14th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan, Iran, 253 pp.

MAHMOUDI, B., M. TODEH FALLAH, M. N. ARJMAND and M. NIHLGAARD, 2000. Ethiological studies of fungal agents of sugar beet root rot in Karadj and their role on post harvest decay of roots. 14th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan, Iran, 256 pp.

MAHMOUDI, S. B. and J. SOLTANI, 2005. Sugar beet root rot in Iran. Newsletter of Training Center for Studying Sugar Industry in Iran. 178:14-18. (in Persian, abstract in English).

MAHMOUDI, S. B., M. MESBAH and A. ALIZADEH,

2004. Pathogenic variability of sugar beet isolates of *Rhizoctonia solani*. Iranian Journal of Plant Pathology. 40(3, 4): 253- 280. (in Persian, abstract in English)

MC CARTER, S. M. and R. H. LITTRELL, 1967. Influences of temperature on the libration, motility and germination of zoospores of *pythium aphanidermatum* and *pythium myriotylum*. Phytpathology 57: 821.

OLIVE, D. M. and P. BEAN, 1999. Principles and applications of methods for DNA- based typing of microbial organisms. Journal of Clinical Microbiology. 37:1661-9.

PEEVER, T. L., R. S. ZEIGLER, A. E. DORRANCE, F. J. CORREA-VICTORIA and S. S. Martin, 2000. Pathogen population genetics and breeding for resistance. APSnet feature. www.apsnet.org.

RISTAINO, J. B. and J. M. DUNIWAY, 1989. Effect of pre-inoculation and post-inoculation water stress on the severity of phytophthora root rot in processing tomato. Plant Dis. 73: 349-352.

SCHOLTEN, O. E., L. W. PANELLA, T. S. M. DE BOCK. and W. LANG, 2001. A greenhouse test for screening sugar beet (*Beta vulgaris*) for resistance to *Rhizoctonia solani*. European Journal of Plant Pathology. 107: 161-166.

SHEIKHOLESLAMI, M., H. YOUNESI and D. SAFAEE, 2005. Characterization of involved in sugar beet root rot and their distribution in Kermanshah province. Journal of Sugar Beet, vol 21, No. 1.

VAN DER PLAATS- NITERINK, A. J.,1981. Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology. 21: 1 – 242.

WANG, P. H. and J. G. WHITE, 1997. Molecular characterization of *Pythium* species based on RFLP analysis of the internal transcribed spacer region of ribosomal DNA. Physiological and molecular plant pathology. 51: 129-143.

ZAMANI NOOR, N., Z. BANIHASHEMI, V. MINASIAN, and R. MOSTOWFIZADEH-GHALAMFARSA, 2004. Identification and pathogenicity of *Pythium* species on sugar beet root rot in Khuzestan province. Iran. Journal of Plant Pathology, 40: 179-200.

ZANG, B. Q. and X. B. YANG, 2000. Pathogenicity of *Pythium* populations from corn-soybean rotation fields. Plant Disease. 84: 94-99.

ZENTMAYER, G. A. and D. C. ERWIN, 1970. Development and reproduction of *Phytophthora* spp. Phytophthology. 60: 1120-1127.