

بررسی پراکنش نسبی قارچ *Polymyxa betae* Keskin با استفاده از روش‌های میکروسکوپی و مولکولی و امکان انتقال آن از طریق علف‌های هرز مهم مزارع چغندر قند استان‌های خراسان رضوی و شمالی

وحید جهانبخش^{۱*} - حمید روحانی^۲ - ماهرخ فلاحی رستگار^۳ - بهروز جعفرپور^۴ - محمدرضا صفرنژاد^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱/۲۶

چکیده

جنس *Polymyxa*، تاکسونی از شاخه Plasmodiophoromycota و سلسله Protozoa است. این قارچ یک پارازیت اجباری - داخل سلولی ریشه گیاهان آوندی می باشد. تاکنون دو گونه *P. betae* و *P. graminis* از این قارچ شناسایی شده است که ناقل بیماریهای مخربی در چغندر قند و تیره غلات هستند. به منظور بررسی پراکنش مزارع آلوده به *P. betae* در استان‌های خراسان رضوی و شمالی از خاک ۳۹ مزرعه چغندر قند نمونه برداری شد. سپس در خاک‌های جمع آوری شده بذر چغندر قند رقم IC کاشته شد و پس از ۵ الی ۷ هفته، گیاهان از خاک خارج گردیدند و با استفاده از روش میکروسکوپی و روش مولکولی Nested PCR میزان آلودگی گیاهان چغندر قند در مزارع مختلف به *P. betae* ارزیابی شد. نتایج نشان داد قارچ فوق در ۵۹ درصد از نمونه‌های ریشه، به روش میکروسکوپی و در ۷۵/۳ درصد نمونه‌های ریشه به روش مولکولی ردیابی شد. با کاشت ۱۷ گونه بذر علف‌های هرز غالب مزارع چغندر قند و گندم در خاک‌های آلوده به *P. betae*، امکان میزبانی این گونه‌ها به کمک دو روش میکروسکوپی و مولکولی در دو استان فوق بررسی شد. از بین این علف‌های هرز، گونه‌های سلمه تره (*Chenopodium album*)، تاج خروس ریشه قرمز (*Amaranthus retroflexus*)، تاج خروس سبز (*A. viridis*)، خرفه (*Portulaca oleraceae*) و پیچک صحرایی (*Convolvulus arvensis*) می‌توانند میزبان این قارچ باشند، و علف‌های هرز سلمه تره و پیچک صحرایی، به عنوان گیاهان آلترناتیو این قارچ در مزارع چغندر قند، معرفی شدند.

واژه‌های کلیدی: *Polymyxa betae*، Nested PCR، Re-transmission، علف‌های هرز غالب مزارع چغندر قند

مقدمه

رایزومانی توسط کانوا از شمال ایتالیا منتشر شد (۱۷). وی این علایم را به ویروس *Beet necrotic yellow vein virus* و قارچ ناقلش *P. betae* مربوط دانست. در حال حاضر بیماری رایزومانی از اکثر کشورهای آسیایی مانند ژاپن، ایران، لبنان، ترکیه و کشورهای اروپایی (یونان، فرانسه، آلمان، چک، سوئیس، هلند، رومانی، سوئد، انگلستان) و کشورهای آمریکایی گزارش شده است (۲۸، ۲۵، ۲۰، ۱۰).

بیماری رایزومانی اولین بار در ایران توسط ایزدپناه و همکاران در سال ۱۳۷۵ از استان فارس (۱) و سپس در سال ۱۳۷۹ توسط جعفرپور و همکاران از استان خراسان گزارش شد (۵). در سال‌های اخیر بیماری مزبور از بیش از ۲۰ استان کشور گزارش شده است و خسارت زیادی به چغندرکاران وارد می‌نماید به طوری که سطح زیر کشت این محصول در استان‌های خراسان از ۶۵۵۱۳ هکتار در سال زراعی ۷۷-۷۶ به ۲۲۴۶۸ هکتار در سال زراعی ۸۸-۸۷ کاهش یافته است، که یکی از دلایل آن را بیماری‌های ویروسی چغندر قند بخصوص بیماری

تعدادی از مهم‌ترین بیماریهای ویروسی چغندر قند مانند *Beet necrotic yellow vein virus* (عامل بیماری رایزومانی)، *Beet soil borne mosaic virus*، *Beet soil borne virus*، *black scorch virus* بیماریهای خاکزاد بوده و تنها ناقل طبیعی شان *P. betae* می‌باشد، که خود نیز یک قارچ خاکزاد است. مطالعه این قارچ اهمیت زیادی در شناخت جنبه‌های مختلف بیماری‌های ذکر شده دارد (۲۹، ۱۴، ۱۰، ۹). نخستین بار در سال ۱۹۶۶ گزارش‌هایی از رشد ضعیف چغندر قند با علائمی شبیه به بیماری

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی سابق دکتری و استادان گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

(*- نویسنده مسئول: Email: vahid_jahan2003@yahoo.com)

۵- استادیار پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی کرج

شناسایی نمایند (۲۴). همچنین ایشان نشان دادند که روش Nested PCR قادر است ۱ پیکو گرم از DNA گونه *P. betae* را در واکنش ۵۰ میکرولیتر تشخیص دهد (۲۶). همچنین تشخیص این قارچ در خاک با استفاده از کیت MagneSil™ توسط وارد و همکاران بررسی شد. این روش با استفاده از آغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس ITS (rDNA) قادر بود هر دو گونه *Polymyxa* را در خاک ردیابی نماید (۳۱). دیسوک نیز و همکاران فنوتیپ جدیدی را برای *P. betae* در گیاه *Arabidopsis thaliana* شناسایی نمودند که این فنوتیپ فاقد سیستم‌سورهای، مانند آنچه در چغندر قند تشکیل می‌گردد بوده و سیستم‌های آن محدود و به صورت زنجیره ای می‌باشند (۱۸).

ریشه علف‌های هرز همواره محل مناسبی برای استقرار میکرواورگانیزم‌های مختلف محسوب می‌شوند و عوامل مختلف قادرند ریشه آنها را کلونیزه نمایند. این موضوع نقش علف‌های هرز را در بقاء و انتقال عوامل مختلف به میزبان اصلی و همچنین در همه‌گیری شدن بیماری نشان می‌دهد (۲۳، ۲۲، ۱۳، ۱۱). *P. betae* برای بقاء خود و در نتیجه بقاء ویروس‌هایی مانند BNYVV در علف‌های هرز مستقر شده و در نتیجه در غیاب چغندر قند می‌تواند بیشتر از ۱۵ سال در خاک و آن هم بدون کم شدن توانایی آنها در انتقال ویروس‌ها، پایداری نماید (۲۳، ۲۲، ۲۱، ۱۳). آبه و ایی ۱۰۸ گونه گیاهی از ۲۳ خانواده را در خاک آلوده به *P. betae* کشت کرده و سیستم‌سورها قارچ را فقط در برخی از اعضاء خانواده‌های *Chenopodiaceae*، *Amaranthaceae* و *Portulacaceae* مشاهده کردند و عقیده داشتند که این قارچ فقط ریشه برخی از گونه‌های گیاهی را آلوده می‌نماید (۱۱). بار و اشرف میزبان‌های جدیدی را برای قارچ فوق از خانواده‌های مختلف گیاهی مانند *Papaveraceae* و *Silenaceae* شناسایی نمودند (۱۳) برخی از محققین نقش دیگر علف‌های هرز را در طبقه بندی گونه‌های این قارچ می‌دانند و معتقدند که این گونه دارای فرم‌های اختصاصی بوده و هر فرم قادر است که میزبان خاص خود را آلوده نماید. به عنوان مثال *P. betae* f. sp. *amaranthi* قادر است *Amaranthus retroflexus*، *P. betae* f. sp. *portulacaceae* گونه‌های *Portulacaceae* و *P. grandifolora* آلوده کند (۲۵، ۲۲، ۲۱، ۱۳، ۱۱).

هدف از این تحقیق بررسی میزان پراکنندگی نسبی مزارع آلوده چغندر قند استان‌های خراسان رضوی و شمالی به *P. betae* و تعیین گیاهان میزبانی است، که می‌توانند به این قارچ آلوده شوند و همچنین بررسی چگونگی انتقال *P. betae* از ریشه علف‌های هرز به چغندر قند (re-transmission) هدف دیگری بود که می‌تواند اثر مهمی در حفظ، بقاء ویروس و پراکنش آن در غیاب میزبان اصلی (چغندر قند) داشته باشد این نتایج می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد مدیریت و کاهش خسارت ناشی از بیماری رایزومانیا که پراکنندگی وسیعی در

رایزومانیا، دانست (۵، ۴، ۳).

Polymyxa تاکسونی از سلسله Protozoa، شاخه Plasmodiophoromycota و پارازیت اجباری- داخل سلولی ریشه گیاهان آوندی است. تاکنون دو گونه از این جنس *P. betae* (Keskin و *graminis* (Ledingham, 1939) (1964) شناسایی شده است *P. betae* بخودی خود خسارت چندانی بر روی چغندر قند ندارد ولی پتانسیل بالایی در انتقال ویروس‌هایی مانند BSBMV، BBSV، BSBV، BVQ، BNYVV دارد (۲۷، ۲۷، ۱۴).

در گذشته شناسایی دو گونه *P. betae* و *P. graminis* بر اساس دامنه میزبانی هر کدام صورت می‌گرفت (۲۳، ۳۰، ۲۲، ۲۱) ولی روش‌های طعمه گذاری در خاک و یا مشاهده میکروسکوپی اندام‌های قارچی از جمله سیستم‌سور به تنهایی نمی‌تواند راه قطعی در شناسایی و ردیابی این دو گونه به حساب آید، چرا که اندام‌های قارچی دو گونه فوق بسیار شبیه به هم بوده و به روش مقایسه مورفولوژیک به تنهایی از یکدیگر قابل تفکیک نیستند. با ابداع واکنش زنجیره ای پلیمرز (PCR) که دارای دقت و سرعت لازم در آشکار سازی پاتوژن‌های مختلف می‌باشد، این روش جایگاه ویژه ای را در علوم زیست شناسی پیدا نموده به ویژه این که، قارچ *Polymyxa* یک انگل اجباری-داخل سلولی است، این روش با توجه به مزایایی که دارد می‌تواند جایگزین مناسبی برای شناسایی این گونه‌های قارچی نسبت به سایر روش‌های فوق باشد. تا کنون در ایران مطالعات کمی بر مبنای روش‌های مولکولی جهت شناسایی مستقیم این قارچ انجام شده است و اغلب این بررسی‌ها بر اساس خصوصیات مورفولوژیک قارچ (شناسایی سیستم‌سور در بافت ریشه) بوده است. همچنین ردیابی ویروس‌هایی مانند BNYVV با توجه به حضور *P. betae* صورت می‌گرفته است (۲۰، ۷، ۵، ۱). برخی از محققین از بذر ارقام چغندر قند حساس به بیماری رایزومانیا، به عنوان گیاه تله در کسب و شناسایی این قارچ و یا ویروس عامل بیماری رایزومانیا در استان خراسان و یا سایر مناطق استفاده نموده اند (۱۵، ۱۴، ۱۱، ۵). همچنین در برخی از مناطق مهم چغندرکاری کشور از روش سرولوژیک و یا Nested PCR جهت ردیابی BNYVV استفاده و بدین صورت به وجود قارچ *P. betae* پی برده اند (۲۵، ۲۷، ۲۷). وارد و همکاران با مطالعه بر روی نواحی rDNA و آنالیز RFLP جدایه‌های جمع آوری شده از دو گونه *P. graminis* و *P. betae* که غالباً از کشور انگلستان بود، ضمن شناسایی آنها، به اختلافات دو گونه فوق پی برده و سه زیر گروه (Subgroups) برای گونه *P. graminis* پیشنهاد نمودند (۳۰، ۲۹). موتاسا و همکاران با استفاده از نشانگر حساس^۱ و واکنش PCR توانستند گونه *P. betae* را در ریشه‌های آلوده چغندر قند

1- A sensitive dna probe

سطح استان‌های خراسان رضوی و شمالی دارد و هر ساله خسارت زیادی ببار می‌آورد، بدست دهد.

مواد و روش‌ها

بررسی پراکنش نسبی مزارع آلوده چغندر قند به *P. betae*

نمونه برداری

برای این منظور از خاک ۳۹ مزرعه در شهرستان‌های: مشهد (رضویه، چلاقی، میامی و قازخان)، سرخس (۲ مزرعه)، نیشابور (نیشابور، ملخ دره و همت آباد)، سبزوار (سلطان آباد ۲ مزرعه، دشت جوین ۲ مزرعه)، تربت حیدریه (کدکن، عبد آباد، جلگه رخ، حشمت آباد، جوادیه، دربان رضوی و تربت حیدریه)، فریمان (تقی آباد، قلندر آباد، کنه شمشیر، مرغزار، سفید سنگ)، تربت جام (کارخانه قند تربت جام و تربت جام)، چناران (نهرآباد، شیرافکن، نصرآباد، شغل آباد و چناران)، شهرستان‌های قوچان، شیروان و بجنورد (قوچان، فتح آباد، خرم آباد، عسگرآباد، زیارت و شیروان و بجنورد)، نمونه برداری انجام شد. زمان نمونه برداری در خلال تیر و مرداد ماه سال ۱۳۸۹ بود. از هر مزرعه ۳ الی ۵ نمونه خاک (بسته به وسعت مزرعه) و حداقل به وزن یک کیلوگرم (ترجیحا از اطراف ریشه) و در قسمت‌های مختلف هر مزرعه تهیه و در کیسه‌های نایلونی به طور مجزا به گلخانه منتقل شدند.

بررسی‌های گلخانه ای

پس از انتقال نمونه‌های خاک به گلخانه، خاک‌های هر مزرعه به خوبی با هم مخلوط و در گلدان‌های پلاستیکی دو کیلویی ریخته شد و ۵ عدد بذر چغندر قند رقم IC (حساس به بیماری رایزمانیا) به عنوان گیاه تله کاشته شد. برای هر نمونه خاک ۳ گلدان در نظر گرفته شد. در مواردی که بافت خاک سنگین به نظر می‌رسید، کمی خاک استریل با بافت سبک (خاک مزرعه-ماسه-خاک برگ به نسبت مساوی) به سطح گلدان اضافه گردید تا جوانه زدن بذور بهتر انجام شود. تعدادی گلدان نیز به عنوان شاهد با خاک استریل (دوبار اتوکلاو به فاصله ۲۴ ساعت) و بذر ضد عفونی شده چغندر قند رقم IC تهیه و در گلدان کاشته شدند. گلدانها در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی مشهد و تحت شرایط دمای روزانه ۲۷ و شبانه ۲۰ درجه سانتیگراد و تناوب نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی و با آبیاری روزانه نگهداری شدند (۲۲، ۱۵، ۱۴، ۱۳). پس از گذشت ۵ الی ۷ هفته از کاشت بذور، ریشه گیاهان به کمک بیلچه استریل از خاک خارج و خاک‌های باقیمانده سطح ریشه به آرامی توسط آب جاری شسته شدند، سپس ریشه‌های موین جدا و به طور تصادفی به دو قسمت تقسیم شدند، بخشی از آنها جهت مشاهدات میکروسکوپی و بر روی بخش دیگر از ریشه‌ها بررسی‌های مولکولی انجام شد (۲۸).

(۲۷، ۲۴).

رد یابی گونه *P. betae* در بافت ریشه‌های موین چغندر قند

الف- مشاهده سیستم‌سورهای قارچ *P. betae* در بافت ریشه‌های

موین چغندر قند

برای انجام این آزمایش از کشت‌های گلخانه ای استفاده شد. ابتدا گلدانهای مورد نظر ابتدا آبیاری شده تا ریشه‌های موین به راحتی از خاک خارج شوند. سپس ریشه‌های موین از خاک خارج و به آرامی توسط آب جاری کاملا شسته شدند. سپس ریشه‌های تمیز در محلول هیدروکسید پتاسیم (KOH) ۱۰ درصد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفتند تا بی رنگ شوند، سپس بار دیگر ریشه‌ها با آب جاری شستشو داده شدند و توسط اسکاپل تمیز برش‌های ظریفی از ریشه‌های موین تهیه و روی لام میکروسکوپی همراه با یک قطره گلیسرول یک برش قراره شد و جهت بررسی وجود و یا عدم وجود سیستم‌سورهای قارچ *P. betae* توسط میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی شیئی $40\times$ بررسی شدند (۱۶، ۹، ۵، ۱) (شکل ۲).

ب- ردیابی مولکولی *P. betae* با استفاده از روش Nested

PCR

استخراج DNA ریشه چغندر قند و تهیه DNA قارچ *P. betae*.

بدین منظور ابتدا DNA گیاه چغندر قند از ریشه‌های موین آن استخراج گردید. برای این کار از کیت استخراج DNA (Accuprep) (GMO-Bioneer®) و همچنین روش تغییر یافته گاول و جارت استفاده شد (۱۹). در این روش ابتدا ۰/۵ تا ۱ گرم از ریشه‌های موین چغندر قند (سالم و مشکوک به آلودگی *P. betae*) وزن شد و به همراه ازت مایع و با استفاده از هاون استریل، به خوبی خرد و پودر شد و درون لوله‌های ۲ میلی لیتری استریل ریخته و سپس ۷۰۰ میکرولیتر بافر CTAB و ۷ میکرولیتر مرکاپتواتانول به هر لوله اضافه شد. سپس لوله‌ها به مدت ۳۰ ثانیه ورتکس شده و بعد از آن به مدت نیم ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. لوله‌ها هر ۱۰ دقیقه یک بار به هم زده شدند. سپس ۷۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم-ایزوامیل الکل (به نسبت ۲۴ به ۱) به لوله اضافه شد. لوله‌ها چند بار و به آرامی به هم زده شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۴۰۰ دور سانتی‌فیوژ شدند. پس از این مرحله ۳۰۰ میکرولیتر از لایه رویی را به لوله استریل جدید ۲ میکرولیتری منتقل و ۳۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول سرد به آن اضافه شد. نمونه‌ها به آرامی مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۴۰۰ دور در دقیقه سانتی‌فیوژ شدند. بعد از حذف مایع بالایی، رسوب با ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد شستشو شد و مایع به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۴۰۰ دور در دقیقه دوباره سانتی‌فیوژ گردید. سپس اتانول را خالی و

واکنش Nested PCR (مرحله دوم)

محصول DNAی مرحله اول PCR با استفاده از آب مقطر استریل به میزان $1/25/1000 (v/v)$ (آب مقطر استریل - DNA)، رقیق شد و به همراه هر یک از آغارگرهای داخلی (۱ میکرولیتر) و آب مقطر استریل ۱۷ میکرولیتر بود، که به کیت آماده واکنش PCR (مانند مرحله قبل) اضافه شد. حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد (۲۶).

برنامه حرارتی در مرحله دوم شامل ۹۴ درجه سانتیگراد، به مدت ۳ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتیگراد ۴۵ ثانیه، ۵۶ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد ۱ دقیقه و ۷۲ درجه سانتیگراد، ۵ دقیقه بود. محصول نهایی PCR آشیانه ای بلافاصله در ژل آگارز ۱/۲ درصد مانند روش قبل الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه (با غلظت یک میکرو گرم در میلی لیتر) نتایج با دستگاه UV ترانس آلومیناتور مشاهده شد و وجود یا عدم وجود قطعه تکثیر شده به صورت باند در ناحیه ۸۷۰ bp مورد بررسی قرار گرفت. تمامی مراحل فوق (استخراج DNA Total، واکنش‌های مرحله اول و دوم Nested PCR) برای چغندر قند سالم (شاهد) طبق مراحل قبلی، انجام گردید (۲۶) (شکل ۴).

شناسایی علف‌های هرز میزبان *P. betae* در

چغندر کاری‌های استان‌های خراسان رضوی و شمالی

در این آزمایش از هر شهرستان ۵ نمونه خاک و حداقل به وزن ۵-۷ کیلوگرم به عنوان نماینده هر منطقه انتخاب شد (جدول ۲). خاک‌ها پس از مخلوط کردن داخل گلدان‌های پلاستیکی یک کیلویی ریخته شد و داخل هر گلدان ۱۰ عدد بذر علف‌های هرز غالب مزارع چغندر قند و برخی از علف‌های هرز غالب گندم (که در استانهای خراسان گندم در تناوب با چغندر قند قرار می‌گیرند) و در سه تکرار کاشته شد (۲، ۸، ۱۱، ۲۲). علف‌های هرز شامل: تاج خروس ریشه قرمز (*Amaranthus retroflexus*)، تاج خروس سبز (*A. viridis*)، سلمه تره (*Chenopodium album*)، جارو (*Kochia scoparia*)، تاجریزی وحشی (*Solanum nigrum*)، پنیرک (*Malva sylvestris*)، خرفه (*Portulaca oleraceae*)، تاتوره (*Datura stramonium*)، خردل وحشی (*Sinapis arvensis*)، آفتاب پرست *Heliotropium* sp.، پیچک صحرايي (*Convolvulus arvensis*)، بارهنگ کبیر (*Plantago major*)، یولاف وحشی (*Avena fatua*)، سوروف (*Echinochloa crus-galli*)، ارزنگ وحشی (*Setaria viridis*)، جو موشی (*Hordium* sp.)، چاودار (*Secale cereal*) بودند، و چغندر قند رقم IC (*Beta vulgaris*) نیز به

لوله‌ها به صورت وارونه روی دستمال تمیز و استریل قرار داده شد تا کاملاً خشک شوند. در نهایت ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به هر لوله اضافه شد. تعیین خلوص DNAی استخراج شده از طریق اسپکتروفوتومتری انجام گرفت. از میان نمونه‌های استخراج شده به طور متوسط تعداد ۳ نمونه برای هر مزرعه، انتخاب و سایر مراحل آزمایش بر روی آنها انجام گردید. درجه خلوص DNAی استخراج شده از ریشه‌های چغندر قند بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر تعیین شد. سپس از روش Nested PCR با آغازگرهای اختصاصی پیشنهاد شده توسط موتاسا و همکاران جهت شناسایی *P. betae* استفاده شد (۲۶). این آغازگرها شامل یک جفت آغازگر خارجی (Pb-5ab).

Pb5a=5' CAGGGGCAGACGGATCGCAG 3'
Pb5b =5' CGTCGAGCGCAGTTCTTGGC 3'

و یک جفت آغازگر داخلی (Pb6a4b)

Pb6a=5' AGATGAGGATGTACAGTCAGG 3'
Pb4b=5' CTATGTGGCAAACCCAAG 3'

بودند. بررسی وجود باندهای حاصله برای آغازگر داخلی در ژل آگارز انجام گردید (۲۶).

واکنش Nested PCR (مرحله اول)

در این آزمایش از کیت آماده PCR (ساخت شرکت Bioneer، کره جنوبی) استفاده شد. مواد اضافه شده پس از بهینه سازی شامل DNAی استخراج شده از گیاه (۵۰ نانو گرم بر میکرولیتر)، هر یک از آغازگرها (۲ میکرو لیتر) و آب مقطر استریل (تا حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر) بود.

برنامه حرارتی مورد استفاده شامل، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه (واشرشته سازی) و سپس ۴۰ چرخه شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۶۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و یک چرخه ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۶ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Germany) Biometra انجام گردید. دمای ذوب آغازگرها بر اساس مشخصات آنها محاسبه و همچنین سایر مواد بکار رفته در آزمایش با استفاده از دستگاه (Masyercycler gradient (Eppendorf AG -Germany بهینه سازی شد (۲۶).

محصول نهایی PCR آشیانه ای بلافاصله در ژل آگارز ۱/۲ درصد تحت ولتاژ ثابت ۸۰ به مدت ۱/۵ ساعت در حضور نشانگر (100bp DNA) و به میزان ۲ میکرولیتر در هر چاهک الکتروفورز گردید و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید به مدت ۱۰ دقیقه (با غلظت یک میکرو گرم در میلی لیتر) نتایج با دستگاه UV ترانس آلومیناتور مشاهده شد و وجود یا عدم وجود قطعه تکثیر شده به صورت باند در ناحیه ۱۱۴۰ bp مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی امکان انتقال آلودگی *P. betae* از بقایای علف‌های هرز آلوده به چغندر قند

برای انجام این آزمایش از ریشه علف‌های هرزی که آلودگی آنها به قارچ *P. betae* توسط بررسی‌های میکروسکوپی و مولکولی ثابت شده بود استفاده شد. ریشه‌های پوسیده را از آن جدا کرده و باقیمانده ریشه‌ها توسط الک جداسازی و با استفاده از آب جاری به خوبی شستشو داده شدند. در این مرحله ذرات خاک و بقایای گیاهی از سطح خارجی ریشه کاملاً جدا شدند. پس از اطمینان از حضور سیستم‌سورهای قارچ فوق در ریشه هر یک از علف‌های هرز با کمک روش میکروسکوپی با استفاده از هاون چینی استریل ریشه‌ها کاملاً خرد و به طور جداگانه به خاک استریل (خاک مزرعه - ماسه - خاک برگ، به نسبت مساوی) اضافه گردید. نسبت وزنی ریشه‌های آلوده به خاک استریل ۱/۱۰۰۰ در نظر گرفته شد. سپس ۵ عدد بذر چغندر قند رقم IC داخل خاک هر گلدان کاشته شد. ریشه‌های چغندر قند بعد از گذشت ۷ الی ۱۰ هفته به کمک میکروسکوپ نوری، طبق روش لگ رو و همکاران و موهانا و همکاران، جهت مشاهده سیستم‌سورهای قارچ مورد بررسی قرار گرفتند. سه تکرار (گیاه) برای هر مزرعه در نظر گرفته شد و بخش دیگر ریشه‌های مویین چغندر قند جهت شناسایی مولکولی قارچ استفاده گردید (۲۳، ۲۲).

نتایج

تعیین پراکنش نسبی *P. betae* در استان‌های خراسان رضوی و شمالی

نتایج بدست آمده وجود قارچ *P. betae* در تمامی خاک‌های جمع آوری شده از مناطق مختلف را نشان داد ولی میزان آلودگی ریشه چغندر قند کاشته شده در خاک مناطق مختلف، متفاوت بود و روش میکروسکوپی توانست در ۵۹ درصد از ریشه‌های چغندر قند سیستم‌سورهای قارچ را تشخیص دهد و وجود قارچ فوق در ۷۵/۳ درصد از همان ریشه‌ها به توسط روش Nested PCR مشخص شد، که این امر برتری روش مولکولی را، نسبت به روش میکروسکوپی نشان داد. به عبارت دیگر روش مولکولی Nested PCR توانست علاوه بر شناسایی دقیق *P. betae*، این قارچ را در تعداد بیشتری ریشه چغندر قند آلوده ردیابی کند و چنانچه این اندام قارچی در نمونه‌ای به روش میکروسکوپی قابل تشخیص نباشد به احتمال زیاد توسط روش‌های مولکولی مانند روش Nested PCR که از دقت بالاتری برخوردار است شناسایی می‌گردد. برخی از نمونه‌ها که در آنها سیستم‌سورها مشاهده نشد ممکن است به علت عدم آلودگی نمونه ریشه به قارچ فوق باشد، چرا که زمان لازم برای آلودگی چغندر قند بر اساس تحقیقات انجام شده مختلف، ۵ الی ۷ هفته می‌باشد و پس از

عنوان شاهد کاشته شد. بذور فوق از دانشکده کشاورزی مشهد و مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مشهد تهیه شدند (۸، ۲). برای شکستن خواب و بالا بردن درصد جوانه زنی بذور برخی از علف‌های هرز مورد آزمایش، از روش‌های، استفاده از اسید سولفوریک ۹۸ درصد (بذر سوروف)، سرمادهی (بذور خردل وحشی، جارو و پیچک صحرایی) و خراش دهی با سمباده نرم (بذر تاتوره) اعمال شد (۶). گیاهان با محلول غذایی هوگلدن^۱ به صورت روزانه آبیاری شدند. گلدانها در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی مشهد و تحت شرایط ۲۰ درجه سانتیگراد و ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند پس از گذشت حداقل ۵ الی ۷ هفته از کاشت بذور، ریشه علف‌های هرز به کمک بیلچه استریل از خاک خارج و جهت مشاهده سیستم‌سور در ریشه آنها مانند روش قبل عمل شد. بخشی از هر یک از ریشه‌های علف هرز در روش مولکولی (PCR) استفاده گردید. همچنین بذر ضد عفونی شده علف هرز سلمه و یولاف وحشی به عنوان دو گیاه شاهد (به ترتیب گیاهان میزبان و غیر میزبان) در گلدان حاوی خاک استریل و در سه تکرار کاشته شدند.

ردیابی *P. betae* در ریشه علف‌های هرز با استفاده از واکنش PCR

بدین منظور پس از گذشت ۷-۵ هفته از کاشت بذور علف‌های هرز و ریشه آنها از خاک خارج و سپس توسط آب جاری کاملاً شستشو داده شد سپس به مدت ۳۰ ثانیه الی ۱ دقیقه با هیپوکلریت درصد ضد عفونی سطحی شدند و طبق روش ذکر شده در قبل، DNA هر یک از علف‌های هرز از ریشه آنها استخراج و از آغازگرهای زیر در واکنش PCR استفاده شد (۳۰):
 Pxfwd1=5'TGCGGAAGGATACATTAGCGTT3'
 Pxrev7=5'GAGGCATGCTTCCGAGGGCTCT3'
 مواد اضافه شده به کیت آماده PCR پس از بهینه سازی شامل:
 DNA کل استخراج شده از ریشه علف هرز (۷۵ نانو گرم بر میکرولیتر)، هر یک از آغازگرهای Pxfwd1 و Pxrev7 (۲ میکرولیتر) و تا حجم نهایی واکنش (۲۰ میکرولیتر)، آب مقطر استفاده شد. بهینه سازی مواد با استفاده از دستگاه Masyercycler (gradient (Eppendorf AG -Germany) صورت گرفت.
 برنامه حرارتی: دمای آغازین ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه به عنوان واسرشته سازی و سپس ۳۵ چرخه شامل ۹۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۷ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه و یک چرخه ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر (Biometra Tpersonal) انجام گردید. باند حاصله در ۲۸۰ bp تشکیل شد (شکل ۵).

betae در برخی نمونه‌های میکروسکوپی تشکیل و توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $40\times$ شناسایی شدند. سیستم‌های موئین در دستجات ۷ تا ۷۰ سیستی و در بافت اپیدرم ریشه‌های موئین چغندر قند مشاهده شدند. اندازه هر سیست منفرد به طور متوسط ۷ میکرومتر بود. دیواره این اسپورها بسیار ضخیم بوده و در نتیجه قادرند بدون حضور میزبان اصلی تا ۱۵ سال در بافت میزبان اصلی، یا علف‌های هرز و یا در غیاب آنها باقی بمانند (۲۸،۲۶). با توجه به دشوار بودن تشخیص سایر اندام‌های این قارچ، از سیستم‌سور برای تشخیص قارچ مزبور استفاده شد (شکل‌های ۲ و ۳)

گذشت این مدت و با ایجاد شرایط محیطی مناسب جهت رشد و نمو قارچ مزبور، آلودگی به احتمال بسیار زیاد رخ خواهد داد. جدول ۱ درصد آلودگی ریشه‌های گیاهچه‌های چغندر قند به قارچ فوق و شکل ۱ نقشه پراکندگی و محل نمونه برداری از مزارع چغندر قند را به تفکیک هر شهرستان نشان می‌دهد.

مشاهده میکروسکوپیک قارچ *P. betae* در سلول‌های ریشه

پس از گذشت ۷ هفته از آغاز آزمایش، اسلاید میکروسکوپی به روش یاد شده در قبل تهیه، که در نتیجه سیستم‌سورهای قارچ *P.*

جدول ۱- درصد آلودگی ریشه‌های چغندر قند به *P. betae* در دو روش، میکروسکوپی و مولکولی Nested PCR به تفکیک شهرستان‌های استان خراسان رضوی و شمالی (۳ تکرار در هر مزرعه)

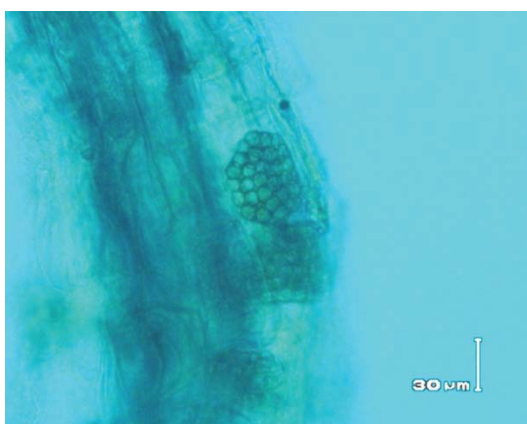
محل جمع آوری خاک (شهرستان و حومه آن)	آلودگی ریشه گیاهچه‌های چغندر قند (%)	
	روش مولکولی (Nested PCR)	روش میکروسکوپی (مشاهده سیستم‌سور)
مشهد	۵۸	۵۸
سرخس	۱۰۰	۶۶
چناران	۸۰	۶۰
قوچان-فاروج-شبروان	۶۶	۵۳
فریمان	۸۰	۶۷
ترت حیدریه	۶۶	۵۷
ترت جام	۸۴	۶۷
سبزوار	۶۶	۵۰
نیشابور	۷۷	۵۶
میانگین	۷۵/۳	۵۹



شکل ۱- نقشه پراکندگی مزارع چغندر قند نمونه برداری شده در استان خراسان رضوی و شمالی. اعداد نشانگر تعداد مزارع نمونه برداری شده در هر منطقه می‌باشد.



شکل ۲- سیستم‌سورهای *P. betae* در ریشه‌های فرعی چغندر قند
شکل از نگارنده



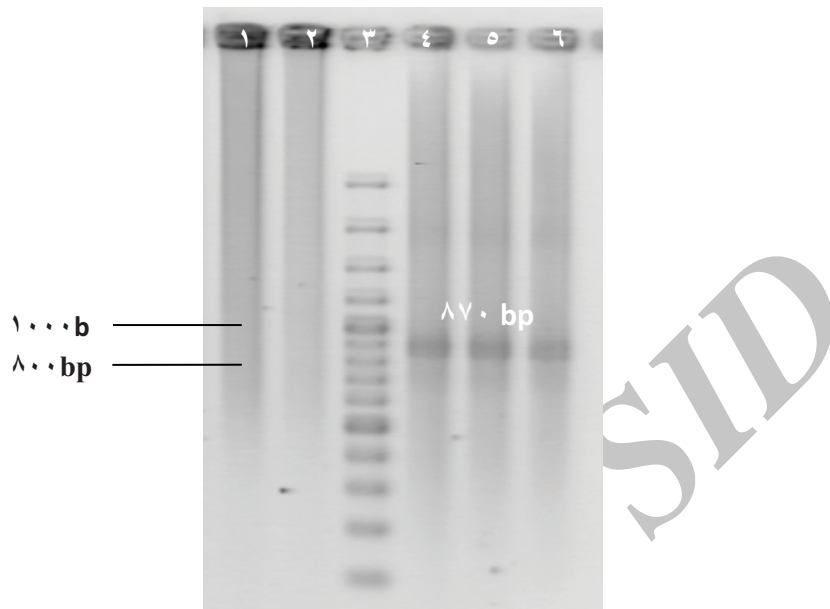
شکل ۳- سیستم‌سورهای *P. betae* در ریشه‌های موین تاج خروس ریشه قرمز
شکل از نگارنده

شناسایی *P. betae* به روش مولکولی در ریشه چغندر قند
برای این منظور از دو جفت آغازگر استفاده می‌شود. در این روش ابتدا از یک جفت آغازگر خارجی استفاده نموده، سپس محصول بدست آمده از واکنش اول به عنوان الگو به لوله دیگر منتقل شده و با استفاده از یک جفت آغازگر آشیانه‌ای (داخلی) مرحله دوم PCR و تکثیر ترادف هدف انجام می‌شود. طبق نظر موتاسا، این روش قادر است وجود ۱ پیکو گرم از DNAی *P. betae* را در واکنش ۵۰ میکرولیتر تشخیص دهد. روش مولکولی Nested PCR این قارچ را در مناطق مختلف ردیابی نمود. همانطور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، DNAی تکثیر شده *P. betae* در مرحله دوم واکنش Nested PCR در محدوده ۸۷۰ bp در ژل آگاروز قابل مشاهده است. همچنین عدم تشکیل باند ذکر شده در نمونه آب مقطر استریل و DNAی چغندر قند سالم تایید کننده صحت انجام مراحل مختلف آزمایش بوده است. در آزمایش انجام شده میزان اولیه DNA در مرحله اول واکنش Nested PCR ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر تعیین شد و در مرحله دوم واکنش، محصول مرحله اول به میزان (V/V)

دامنه میزبانی *P. betae* در علف‌های هرز غالب چغندر قند
پس از گذشت ۵ الی ۷ هفته از کاشت بذور علف‌های هرز و بررسی میکروسکوپی ریشه‌های آنها، گونه‌های سلمه تره (*Amaranthus retroflexus*)، تاج خروس سبز (خزنده) (*A. viridis*)، خرفه (*Portulaca oleraceae*) و پیچک صحرایی (*arvensis*) به قارچ *P. betae* آلوده شده بودند و در سایر علف‌های هرز این اندام مشاهده نشد. اسلایدهای میکروسکوپی تهیه شده از ریشه گیاه تاج خروس ریشه قرمز و تاج خروس سبز و مقایسه آنها با دیگر علف‌های هرز از آلودگی نسبتاً کمتری نسبت به گیاهان دیگر برخوردار بودند و تعداد سیست‌ها در هر سیستم‌سور در هر دو گونه تاج خروس کمتر و سیستم‌سورها به صورت پراکنده در طول ریشه‌های

و جو استان‌های خراسان رضوی و شمالی بوده و در نتیجه اهمیت مبارزه با این گیاهان را به ویژه در مناطقی که سابقه آلودگی به ویروس‌های مختلفی مانند BNYVV دارد را آشکار می‌نماید (جدول ۲).

مویین مشاهده می‌شدند، لذا جهت مشاهده سیستم‌های قارچ مزبور و اطمینان از حضور آن نمونه‌های میکروسکوپی بیشتری نسبت به سایر میزبانان تهیه شد. علف‌های هرزی که در این تحقیق به عنوان میزبان شناخته شدند جزء علف‌های هرز غالب مزارع چغندر قند و گندم



شکل ۴- الکتروفورز محصول مرحله دوم واکنش Nested PCR با استفاده از یک جفت آغازگر آشیانه‌ای در ژل افقی آگارز ۱/۲ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ستون ۱: کنترل منفی (آب مقطر استریل)، ستون ۲: عدم تشکیل باند اختصاصی *P. betae* در DNA چغندر قند سالم، ستون ۳: نشانگر DNA (DNA Ladder ۱۰۰ bp)، ستون‌های ۴ الی ۶: باند اختصاصی ۸۷۰ bp تکثیر شده در ۳ جدایه *P. betae* از چغندر قند.

جدول ۲- وجود و یا عدم وجود سیستم‌سور *P. betae* در ریشه علف‌های هرز کاشته شده در خاک آلوده به *P. betae*

سیستوسور	نام فارسی	نام علمی علف هرز	تیره
+	تاج خروس سبز	<i>Amaranthus viridis</i>	Amaranthaceae
+	تاج خروس ریشه قرمز	<i>A. retroflexus</i>	Amaranthaceae
+	سلمه تره	<i>Chenopodium album</i>	Chenopodiaceae
-	چارو	<i>Kochia scoparia</i>	Chenopodiaceae
-	تاجریزی وحشی	<i>Solanum nigrum</i>	Solanaceae
-	تاتوره	<i>Datura stramonium</i>	Solanaceae
-	پنیرک	<i>Malva sylvestris</i>	Malvaceae
+	خرفه	<i>Portulaca oleraceae</i>	Portulacaceae
-	خردل وحشی	<i>Sinapis arvensis</i>	Cruciferae
-	آفتاب پرست	<i>Heliotropium sp</i>	Borabinaceae
+	پیچک صحرایی	<i>Convolvulus arvensis</i>	Convolvulaceae
-	بارهنگ کبیر	<i>Plantago major</i>	Plantaginaceae
-	یولاف وحشی	<i>Avena fatua</i>	Gramineae
-	سوروف	<i>Echinocholoa crus-galli</i>	Gramineae
-	ارزنک وحشی	<i>Setaria viridis</i>	Gramineae
-	جو موشی	<i>Hordium sp</i>	Gramineae
-	چاودار	<i>Secale cereal</i>	Gramineae

+ : وجود سیستم‌سور.

- : عدم وجود سیستم‌سور.

بیماری‌های گیاهی مشخص می‌نماید. *viridis*) خرفه (*Portulaca oleraceae*) و پیچک صحرایی (*Convolvulus arvensis*) و در این میان، گیاهان سلمه تره و پیچک صحرایی در چغندرکاری‌های استان خراسان رضوی و شمالی نقش گیاهان آلترناتیو را ایفا نمودند و قارچ *P. betae* توانست از علف‌های هرز یاد شده به چغندر قند منتقل شود (-re transmission)، که این امر نقش آنها را در اپیدمیولوژی بیماری‌های گیاهی مشخص می‌نماید.

بحث

جنس *Polymyxa* تا قبل از دهه ۱۹۹۰ به عنوان یک قارچ متعلق به رده *Plasmodiophoromycetes* شناخته می‌شد ولی بعد از بررسی‌های مولکولی مشخص شد که فیلوژنی و منشاء این رده کاملاً با قارچها متفاوت است، به طوری که امروزه جنس *Polymyxa* در شاخه *Plasmodiophoromycota* و سلسله *Protozoa* (تک سلولی‌های جانوری) قرار می‌گیرد و ارتباطی با سلسله قارچ‌ها ندارد، با این حال چون هنوز در منابع از آن به عنوان یک قارچ نامبرده می‌شود در این مقاله نیز از کلمه قارچ برای *P. betae* استفاده شد. قارچ *Polymyxa* با دو گونه *P. betae* و *P. graminis* پتانسیل بالایی در انتقال بیماریهای ویروسی مخرب در چغندر قند و اعضاء تیره گرامینه دارند.

شناسایی قارچ *P. betae* به روش مولکولی PCR در ریشه

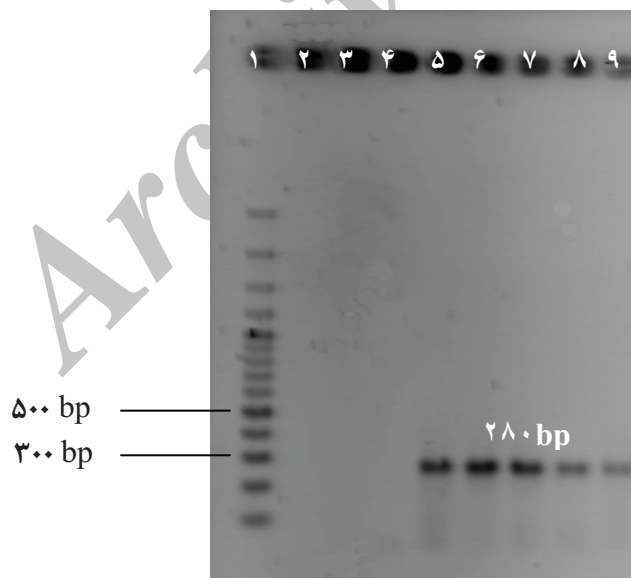
علف‌های هرز

نتایج حاصله از روش مولکولی آلودگی ریشه‌های علف‌های هرز تاج خروس سبز، تاج خروس ریشه قرمز، سلمه تره، خرفه و پیچک صحرایی را به قارچ فوق ردیابی نمود، ولی در سایر علف‌های هرز مورد آزمایش این قارچ ردیابی نشد در این روش از دو گیاه شاهد (*P. betae* سلمه تره و یولاف وحشی) به ترتیب به عنوان شاهد میزبان *P. betae* و شاهد غیر میزبان *P. betae* استفاده گردید. نتایج حاصله با نتایج بدست آمده از روش میکروسکوپی مطابقت داشت (شکل ۵).

انتقال آلودگی از بقایای علف‌های هرز آلوده به *P. betae*

چغندر قند

نتایج این آزمایش نشان داد، پس از گذشت ۷ الی ۱۰ هفته، قارچ *P. betae* فقط از گونه‌های گیاهی سلمه تره (*Chenopodium album*)، پیچک صحرایی (*Convolvulus arvensis*) به چغندر قند منتقل شده و این گیاه را آلوده سازد. در این تحقیق سعی شد علاوه بر تعیین میزبان‌های این قارچ در مزارع چغندر قند نقش آنها به عنوان گیاهان آلترناتیو بررسی گردد. از بین علف‌های هرز میزبان *P. betae* در چغندرکاری‌های استان خراسان رضوی و شمالی شامل سلمه تره (*Chenopodium album*)، تاج خروس ریشه قرمز (*Amaranthus retroflexus*)، تاج خروس سبز (*A.*



شکل ۵- الکتروفورز محصول واکنش PCR در ژل افقی آگارز ۱/۲ درصد، رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ستون ۱: نشانگر DNA (bp DNA Ladder) ۱۰۰ (ستون ۲: کنترل منفی (آب مقطر استریل)، ستون‌های ۳ و ۴: عدم تشکیل باند اختصاصی *P. betae* در DNAی استخراج شده از به ترتیب علف‌های هرز سلمه تره- شاهد (۳) و یولاف وحشی - شاهد (۴)، ستون‌های ۵ الی ۹: باند اختصاصی ۲۸۰ bp تکثیر شده در ۵ جدایه *P. betae* به ترتیب از: سلمه تره (۵)، خرفه (۶)، پیچک صحرایی (۷)، تاج خروس ریشه قرمز (۸) و تاج خروس سبز (۹).

دهد، و از آنجایی که این اسپورها می‌توانند برخی از ویروس‌های بیماریزا در چغندر قند را مانند BNYVV را بدون کاهش قدرت بیماریزایی ویروس در خودشان نگهدارند، لذا اهمیت این گونه گیاهان را در همه گیری شناسی این بیماری‌های ویروسی مشخص می‌نماید. همچنین به منظور تایید نتایج حاصله از روش میکروسکوپی روش مولکولی، PCR انجام گردید که نتایج بدست آمده از روش میکروسکوپی را تایید نمود.

همانطور که ذکر شد از ویروس‌های بیماریزای مهم در مزارع چغندر قند استان‌های خراسان رضوی و شمالی ویروس‌های BNYVV (عامل بیماری ریزمانیا) می‌باشد که توسط *P. betae* منتقل می‌گردد و با توجه به خسارت بالای این بیماری، یکی از موضوعاتی که باید در این ارتباط مشخص گردد این است که آیا این ویروس‌ها قادر به آلودگی مجدد چغندر قند در شرایط استان‌های خراسان هستند یا خیر. لگ رو و همکاران در بررسی خود نشان دادند که هر چند انتقال BNYVV از طریق چند گیاه آترناتیو به چغندر قند امکان پذیر است ولی ویروس‌هایی مانند BNYVV قادر نیستند از سایر علف‌های هرز به چغندر قند منتقل گردند. محققین اعتقاد دارند، میزان سیستم‌سورهای موجود در ریشه علف‌های هرز هم عاملی است که امکان دارد در آلودگی مجدد گیاهان نقش داشته باشد و طبق نظر لگ رو ممکن است پس از غنی سازی مایه تلقیح گیاهان غیر میزبان در آزمایش آلوده شوند (۲۲). در مورد علف‌های هرز تاج خروس ریشه قرمز، تاج خروس سبز و خرفه به نظر می‌رسد که، هرچند این گیاهان جزء میزبانان *P. betae* مشخص شدند ولی در این تحقیق به عنوان گیاه آترناتیو شناخته نشدند و قارچ تکثیر شده در آنها نتوانست چغندر قند را آلوده نماید که این نتیجه با مطالعات انجام شده توسط آبه و ایی مطابقت دارد (۱۱). به عقیده ایشان فرم تخصص یافته *P. betae f. sp. amaranthi* می‌تواند تاج خروس ریشه قرمز را آلوده نماید ولی قادر نیست گیاهانی مانند چغندر قند، اسفناج و سلمک را آلوده نماید. همچنین جدایه‌های *P. betae* که گیاهان تیره Chenopodiaceae را آلوده می‌کنند به دو دسته تقسیم می‌شوند، گروه اول آنهایی که چغندر قند را آلوده می‌نمایند و گروه دوم آنهایی که *C. album* را مبتلا می‌سازد. علف‌های هرزی که به عنوان گیاهان آترناتیو برای قارچ *P. betae* در این تحقیق معرفی شده است با لیست گیاهان گزارش شده توسط لگ رو و همکاران (۲۲) و موهانا و همکاران (۲۳) مطابقت دارد.

در گذشته شناسایی این دو گونه بر اساس دامنه میزبانی صورت می‌گرفته است، در حالیکه اخیرا اعتقاد بر این است که امکان آلودگی چغندر قند توسط برخی از جدایه‌های *P. graminis* وجود دارد و همچنین ممکن است گیاهانی مانند گندم و جو نیز توسط *P. betae* آلوده شوند، لذا در این تحقیق جهت شناسایی دقیق گونه *P. betae* در ریشه چغندر قند از دو روش میکروسکوپی (مشاهده سیستم‌سور در سلول‌های اپیدرم ریشه) و روش مولکولی Nested PCR به طور توأم در مزارع چغندر قند استان‌های رضوی و شمالی استفاده شد.

در بین روش‌های نوین در شناسایی پاتوژن‌های مختلف واکنش Nested PCR یک روش دقیق و با کارایی مناسب محسوب می‌گردد و قادر است میزان بسیار کم قارچ را در گیاه ردیابی نماید (۲۶). این روش شامل دو واکنش PCR بوده که در آن از محصول واکنش اول در واکنش دوم PCR استفاده می‌گردد، که این عمل باعث دقت بیشتر این روش مولکولی شده و این روش قادر است مقادیر بسیار کم DNA قارچ را در ریشه چغندر قند مشخص نماید (۲۴). از روش Nested PCR در ایران برای اولین بار جهت تشخیص گونه *P. betae* در چغندر قند استفاده شد.

نتایج حاصله از این تحقیق نشان داد که این قارچ در تمامی مناطق چغندر قند کاری استان‌های خراسان رضوی و شمالی نمونه‌برداری شده وجود دارد (جدول ۱) و این موضوع می‌تواند وجود برخی از بیماری‌های ویروسی مهم و مخرب در چغندر قند مانند ریزمانیا را در این مناطق توجیه نماید. در حال حاضر بیماری ریزمانیا کشاورزان را مجبور به استفاده از بذور متحمل به این بیماری نموده است، که این امر باعث افزایش قیمت تمام شده این محصول مهم برای کشاورزان می‌گردد.

وجود علف‌های هرز در مزارع باعث پایداری بسیاری از بیماری‌های مختلف، از جمله بیماری‌های ویروسی می‌گردد، لذا شناسایی آنها به عنوان میزبان و یا میزبان آترناتیو عوامل مختلف بیماریزا، اهمیت بسزایی دارد و نقش آنها را در کنترل بیماری‌های گیاهی آشکار می‌نماید. به منظور ردیابی قارچ *P. betae* در ۱۷ گونه از علف‌های هرز مهم مزارع چغندر قند و گندم از دو روش میکروسکوپی (مشاهده سیستم‌سورهای قارچ) و روش PCR به صورت توأم استفاده گردید.

در میان علف‌های هرز مورد آزمایش، روش میکروسکوپی توانست در ۵ گونه علف هرز (تاج خروس ریشه قرمز، تاج خروس سبز، سلمه تره، خرفه و پیچک صحرايي، سیستم‌سورهای *P. betae* را تشخیص

منابع

۱- ایزدپناه ک، هاشمی پ، کامران ر، پاک نیت م، سهند پور آ، و معصومی م. ۱۳۷۵. وجود گستره بیماری ریشه ریشی (شبه ریزمانیا) در

- فارس. مجله بیماری شناسی گیاهی ۳۲: صفحات ۲۰۶-۲۰۰.
- ۲- بازوبندی م.، باغستانی میبدی م. ع.، و زند ا. ۱۳۸۵. علف‌های هرز مزارع چغندر قند و مدیریت آنها. انتشارات سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی. بخش تحقیقات علف‌های هرز. ۸۰ صفحه.
- ۳- بی نام. سالنامه آماری استان خراسان ۱۳۷۷. سازمان برنامه و بودجه خراسان. معاونت هماهنگی و برنامه ریزی.
- ۴- بی نام. سالنامه آماری کشوری. ۱۳۸۸. سازمان برنامه و بودجه. مرکز آمار ایران.
- ۵- جعفرپور ب. ۱۳۷۹. بررسی و تعیین پراکنش ویروس، موزاییک چغندر قند و ویروس زردی نکروتیک رگبرگ چغندر قند در شمال خراسان و شناسایی ویروس خاکزاد چغندر در ایران. پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی. دانشگاه فردوسی. ۱۳۲ صفحه.
- ۶- خواجه حسینی م.، اروچی ک.، و اورسنجی ز. ۱۳۸۸. بررسی برخی از روش‌های شکستن خواب در بذر بیست گونه علف هرز. سومین همایش علوم علف‌های هرز ایران، جلد اول، صفحات ۱۶۷-۱۶۹.
- ۷- طالبی ع. ۱۳۸۳. استفاده از روش مولکولی Nested-PCR جهت تشخیص BNYVV در گیاهان آلوده چغندر قند. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی بروجرد. ۱۰۰ صفحه.
- ۸- شیمی پ.، و فریدونی ت. ۱۳۸۲. علف‌های هرز ایران. بخش تحقیقات علف‌های هرز موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی. سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی. ۲۴۲ صفحه.
- ۹- کامران ر.، ایزدپناه ک.، و شیروانی ع. ۱۳۷۹. بررسی پراکنش *Polymyxa betae* ناقل ویروس ریشه گنایی چغندر قند در فارس. خلاصه مقالات چهارمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. جلد دوم، صفحه ۷۴.
- 10- Abe H., and Tamada T. 1986. Association of *Beet necrotic yellow vein virus* with isolates of *Polymyxa betae* Keskin Annual. Review of Phytopathology Japan, 52:232-247.
- 11- Abe H., and Ui T. 1986. Host range of *Polymyxa betae* strains in Rhizomania-infected soils of sugar beet fields in Japan. Annual Review of Phytopathology. Japan 52 :394-403.
- 12- Adams M J., and Ward E. 1997. Molecular studies of the plasmodiophorids. Plant Pathology and Microbiology Department, Rothamsted Research. Available at <http://www.rothamsted.bbsrc.ac.uk/ppi/links/pplinks/plasmod/index.html>. Last updated on 16 April 2003.
- 13- Barr K. J., and Asher M. J. C. 1992. The host range of *Polymyxa betae* in British. Plant Pathology, 41 : 64-68.
- 14- Barr K. J., and Asher M. J. C. 1996. Studies on the life-cycle of *Polymyxa betae* in sugar beet root. Mycological Research. 100 (2):203-208.
- 15- Beemster A. B. R., and De Heji, A. 1987. A method for detection of *Polymyxa betae* and *Beet necrotic yellow vein virus* in soil using sugar-beet as a bait plant. Netherland Journal of Plant Pathology, 93:91-93.
- 16- Braselton J. P. 1988. Karyology and systematics of Plasmodiophoromycetes. pp. 139-1520. In Development in Applied Biology 2, Viruses with fungi vector. (J. I. Cooper and M. J. C. Asher, eds.) University of Andrews, UK.
- 17- Canova A. 1966. Si studia la rizomania della bietola. Inf. Fitopatologia. 10: 235-239.
- 18- Desoignies N., Stocco C., Bragard C., and Legreve A. 2011. A new phenotype of *Polymyxa betae* in *Arabidopsis thaliana*. European Journal of Plant Pathology. DOI 10. 1007/s 10658-011: 9783-9785.
- 19- Gawel N. J., and R. L. Jarret. 1991. A simple dna extraction procedure for Musa and Ipomea. Plant Molecular Biology Reporter 9 (3) : 250-254.
- 20- Legreve A., Delfosse P., Van hese., Bragard C., and Maraite H. 2002. Broad-spectrum detection of *Polymyxa* species and from species by polymerase chain reaction. P 40-43. In C. M. Rush and U. Merz (ed.) Proceedings of the fifth Symposium of international working group plant viruses with fungal vectors. Institute of Plant Sciences, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zurich, Switzerland.
- 21- Legreve A., Delfosse P., Ribonnet L., Paridaens A. M., Lurkin R., and Maraite H. 2005. Diversity of *Polymyxa graminis* associated with cereals in West Africa. Parasitica, 61, (1) : 5-10.
- 22- Legreve A., Smith J. F., Bragard C., and Maraite H. 2005. The role of climate and alternative hosts in the epidemiology of Rhizomania. P. 129-133. In C. M. Rush. (ed.) Proceedings of the sixth symposium of The international workshop group on plant viruses with fungal vectors. September 5-7, 2005. Alma Mater Studiorum Università Di Bologna Bolognà, Italy.
- 23- Mouhanna A. M., Langen G., and Schlosser E. 2008. Weeds as alternative hosts for BSBV, BNYVV, and the vector *Polymyxa betae* (German isolate). Journal of Plant Diseases and Protection 115 (5) :193-

- 198.
- 24- Mutasa E., Ward E., Adams M., Collier C. , Chwarszynska D. M., Asher M. J. C. 1993. A sensitive dna prob for the detection of *polymyxa betae* in sugar beet. *Physiol. Mol. Plant Pathology.* , 43:379-390.
- 25- Mutasa E. S., Chwarszynska D. M., Adams M. J. , Ward E. , and Asher M. J. C. 1995. Development of PCR for the detection of *Polymyxa betae* in Sugar beet roots and its application in field Studies. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* :303-313.
- 26- Mutasa E. S., Chwarszynska D. M., and Asher M. J. C. 1996. Single tube Nested PCR for the diagnosis of *Polymyxa betae* infection in sugar beet roots and colorimetric analysis of amplified products. *American Phytopatology Society*,89 (5):493-497.
- 27- Mutasa E. S., Chwarszynska D. M., Halsey K., and Asher M. J. C. 2000. Specific polyclonal antiboddies for the obligate plant parasite *polymyxa*. A targeted recombinant dna approach. *Plant Pathology.* 49:276-287.
- 28- Rush C. M. 2003. Ecology and epidemiology of benyvirus and plasmodiophorid vectors. *Annual Review of Phytopathology* 41 :567-592.
- 29- Ward E., Adams M. J., Mutasa E. S., Collier C. R and Asher M. J. C. 1994. Characterization of *Polymyxa* species by restriction analysis of PCR-amplified ribosomal dna. *Plant Pathology* ,43:872-877.
- 30- Ward E., and Adams M. j. 1998. Analysis of ribosomal dna sequences of *Polymyxa* species and related fungi and the development of genus-and species-specific PCR primers. *Mycological Research*,102 (8): 965-974.
- 31- Ward L I., Fenn M G E., and Henry M. 2004. A rapid method for direct detection of *Polymyxa* dna in soil. *Plant Pathology*, 53: 485-490.

Archive of SID