نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی)
جلد ۲۶، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، ص. ۲۹۹-۲۸۸

Journal of Plant Protection
Vol. 26, No. 3, Fall 2012, P. 288-299

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

وحید جهانبخش [۱*] - حمید روحانی [۲]- ماهرخ فلاحتی 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.graminis* و *P.betae* ازاین قارچ شناسایی شده است که ناقل بیماریهای مخربی در چغندرقند و تیره غلات هستند. به منظور بررسی پراکنش مزارع آلوده به *P.betae* در استان‌های خراسان رضوی و شمالی از خاک ۳۹ مزرعه چغندرقند نمونه‌برداری 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 چغندرقند 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 چغندرقند 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 چغندرقند، معرفی شدند.

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

مقدمه

تعدادی از مهم‌ترین بیماریهای ویروسی جغندرقند مانند *Beet necrotic yellow vein virus* (عامل بیماری رایزمانیا)، *Beet soil borne virus*، *Beet soil borne mosaic virus* و *Beet 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 جنبه های مختلف بیماری‌های ذکر شده دارد (۲۹، ۱۴، ۱۰، ۹). نخستین بار در سال ۱۹۶۶ گزارش‌هایی از رشد ضعیف چغندرقند با علائمی شبیه به بیماری رایزومانیا 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 رایزومانیا 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 رایزومانیا اولین بار در ایران توسط ایزدپناه و همکاران در سال ۱۳۷۵ از استان فارس (۱) و سپس در سال۱۳۷۹ 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 طوریکه سطح زیر کشت این محصول در استان‌های خراسان از۶۵۵۱۳ 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 چغندرقند بخصوص 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

رایزمانیا، دانست (۳،۴،۵).

Polymyxa، تاکسونی از سلسله Protozoa ، شاخه Plasmodiophoromycota و پارازیت اجباری– داخل سلولی ریشه گیاهان آوندی است. تاکنون دو گونه ازاین جنس *P. graminis* (Ledingham , 1939 و *P. betae* (Keskin , 1964) شناسایی شده است*P. betae*. بخودی خود خسارت چندانی بر روی چغندر قند ندارد ولی پتانسیل بالایی در انتقال ویروس‌هایی مانند BNYVV، BVQ، BSBV BBSV و BSBMV دارد (۲۸، ۲۷، ۱۴).

در گذشته شناسایی دو گونه *P. graminis* و*P. betae* بر اساس دامنه میزبانی هر کدام صورت می‌گرفت (۳۰،۲۳، ۲۲، ۲۱) ولی روش‌های طعمه گذاری در خاک و یا مشاهده میکروسکوپی اندام‌های قارچی از جمله سیستوسور به تنهایی نمی‌تواند راه قطعی درشناسایی 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 پلیمراز (PCR) که دارای دقت و سرعت لازم درآشکار 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 سیستوسور 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 چغندرقند 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 (۵،۱۱،۱۴،۱۵). همچنین در برخی از مناطق مهم چغندرکاری کشور از روش سرولوژیک و یا Nested PCR جهت رد یابی BNYVV استفاده و بدین صورت به وجود قارچ *P.betae* پی برده اند (۲۷،۷،۲۵). 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 غالبا 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[1] و واکنش PCR توانستد گونه *P. betae* را در ریشه‌های آلوده چغندر قند شناسایی نمایند (۲۴). همچنین ایشان نشان دادند که روش Nested PCR قادر است ۱ پیکو گرم از DNAی 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 اساسITS (rDNA) قادر بود هر دو گونه *Polymyxa* را در خاک ردیابی نماید (۳۱). دیسوگ نیز و همکاران فنوتیپ جدیدی را برای *P.betae* در گیاه *Arabidopsis thaliana* شناسایی نمودند که این فنوتیپ فاقد سیستوسورهایی، مانند آنچه در چغندر قند تشکیل می‌گردد بوده و سیستهای 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 همه گیری شدن بیماری نشان می‌دهد (۲۳، ۱۳،۲۲، ۱۱). *P. betae* برای بقاء خود و در نتیجه بقاء ویروس‌هایی مانند BNYVV در علف‌های هرز مستقر شده و در نتیجه در غیاب چغندرقند می‌تواند بیشتر از ۱۵ سال درخاک و آن هم بدون کم شدن توانایی آنها در انتقال ویروس‌ها، پایداری نماید (۲۱،۲۲،۲۳، ۱۳). آبه و ایی ۱۰۸ گونه گیاهی از ۲۳ خانواده را در خاک آلوده به *P.betae* کشت کرده وسیستوسورها قارچ را فقط در برخی از اعضاء خانواده‌های Chenopodiaceae، Amaranthaceae,و Portulaceae مشاهده کردند و عقیده داشتند که این قارچ فقط ریشه برخی از گونه‌های گیاهی را آلوده می‌نماید (۱۱). بار و اشر 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 *P.betae* f. sp. *Amaranthus retroflexus*، *portulaceae* گونه های *oleraceae* و *Portulacea* *P.grandifolora* آلوده کند (۲۲،۲۵، ۲۱، ۱۳، ۱۱).

هدف از این تحقیق بررسی میزان پراکندگی نسبی مزارع آلوده چغندرقند 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 (چغندرقند) داشته باشد این نتایج می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد مدیریت و کاهش خسارت ناشی از بیماری رایزومانیا که پراکندگی وسیعی در

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 چغندرقند به *P. betae*

نمونه برداری

برای این منظور از خاک ۳۹ مزرعه در شهرستان های: 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، قلندرآباد، کته 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 چغندرقند رقمIC (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 ضدعفونی شده چغندرقند رقم IC تهیه ودر 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 مویین 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 مویین چغندرقند

الف- مشاهده سیستوسورهای قارچ *P. betae* در بافت ریشه‌های مویین چغندرقند

برای انجام این آزمایش از کشت‌های گلخانه ای استفاده شد. ابتدا گلدانهای مورد نظر ابتدا آبیاری شده تا ریشه‌های مویین به راحتی از خاک خارج شوند. سپس ریشه‌های مویین 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 مویین تهیه و روی لام میکروسکوپی همراه با یک قطره گلیسرول یک برش قرارده شد و جهت بررسی وجود و یا عدم وجود سیستوسورهای قارچ *P. betae* توسط میکروسکوپ نوری و با بزرگنمایی شیئی ۴۰X 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 DNAی قارچ *P. betae*.

بدین منظور ابتدا DNAی گیاه چغندر قند از ریشه‌های مویین آن استخراج گردید. برای این کار از کیت استخراج DNA (Accuprep GMO-Bioneer ®) و همچنین روش تغییر یافته گاول و جارت استفاده شد (۱۹). دراین روش ابتدا ۰/۵ تا ۱ گرم از ریشه‌های مویین چغندرقند (سالم و مشکوک به آلودگی *P. betae*) وزن شد و به همراه ازت مایع و با استفاده ازهاون 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 به۱) به لوله اضافه شد. لوله‌ها چند بار و به آرامی به هم زده شد و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۴۰۰ دور سانتریفیوژ 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 سانتریفیوژ 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 سانتریفیوژ گردید. سپس اتانول را خالی و

لوله‌ها به صورت وارونه روی دستمال تمیز و استریل قرار داده شد تا کاملا خشک شوند. در نهایت ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل به هر لوله اضافه شد. تعیین خلوص DNAی استخراج شده از طریق اسپکتروفتومتری انجام گرفت. از میان نمونه‌های استخراج شده به طور متوسط تعداد ۳ نمونه برای هر مزرعه، انتخاب و سایر مراحل آزمایش برروی آنها انجام گردید. درجه خلوص DNAی استخراج شده از ریشه‌های چغندرقند برحسب 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 آگاروز انجام گردید (۲۶).

واکنش Nested PCR (مرحله اول)

دراین آزمایش از کیت آماده PCR (ساخت شرکتBioneer، کره جنوبی) استفاده شد. مواد اضافه شده پس از بهینه سازی شامل DNA:ی استخراج شده از گیاه (۵۰ نانو گرم بر میکرولیتر)، هر یک از آغازگرها (۲ میکرو لیتر) وآب مقطر استریل (تا حجم نهایی واکنش ۲۰ میکرولیتر) بود.

برنامه حرارتی مورد استفاده شامل، ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه (واسرشته 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 (Biometra(Germany 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 اگارز۱/۲ درصد تحت ولتاژ ثابت ۸۰ به مدت ۱/۵ ساعت در حضور نشانگر (100bp DNA) و به میزان ۲ مایکرولیتر 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 ناحیهbp ۱۱۴۰ مورد بررسی قرار گرفت.

واکنش Nested PCR (مرحله دوم)

محصول DNAی مرحله اول PCR با استفاده از آب مقطر استریل به میزان. (v/v)۱/۲۵/۱۰۰۰ (آب مقطر استریل –DNA)، رقیق شد و به همراه هر یک از آغازگرهای 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 اگارز۱/۲ 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 ناحیهbp ۸۷۰ مورد بررسی قرار گرفت. تمامی مراحل فوق (استخراج DNA Total، واکنش‌های مرحله اول و دوم Nested PCR) برای چغندرقند سالم (شاهد) طبق مراحل قبلی، انجام گردید (۲۶) (شکل ۴).

شناسایی علف‌های هرز میزبان *P. betae* در چغندرکاری‌های استان‌های خراسان رضوی و شمالی

در این آزمایش از هر شهرستان ۵ نمونه خاک و حداقل به وزن ۷-۵ 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 چغندرقند قرار می گیرند) و در سه تکرار کاشته شد (۲،۸،۱۱،۲۲). علف‌های هرزشامل: 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 صحرایی (*Convolvulus arvensis*)، بارهنگ کبیر (*Plantago major*)، یولاف وحشی (*Avena fatua*)، سوروف (*Echinocholoa crus-galli*)، ارزنک وحشی (*Setaria viridis*)، جو موشی (*Hordium* sp.) ، چاودار (*Secale cereal*) بودند، و چغندرقند رقم IC (*Beta vulgaris*) نیز به

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 هوگلند[1] 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 سیستوسور در ریشه آنها مانند روش قبل عمل شد. بخشی از هر یک از ریشه‌های علف هرز در روش مولکولی (PCR) استفاده گردید. همچنین بذر ضدعفونی 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 کاملا شستشو داده شد سپس به مدت ۳۰ ثانیه الی ۱ دقیقه با هیپوکلریت ۱ درصد ضد عفونی سطحی شدند و طبق روش ذکر شده در قبل، DNAی 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: DNAی کل استخراج شده از ریشه علف هرز (۷۵نانو 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 (Eppendrof 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 bp ۲۸۰ تشکیل شد (۳۰) (شکل۵).

1 - Hoagland

بررسی امکان انتقال آلودگی *P. betae* از بقایای علف‌های‌هرز آلوده به چغندرقند

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 کاملا جدا شدند. پس از اطمینان از حضور سیستوسورهای قارچ فوق در ریشه هر یک از علف‌های هرز با کمک روش میکروسکوپی با استفاده از هاون چینی استریل ریشه‌ها کاملا 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 چغندرقند بعد از گذشت ۷ الی ۱۰ هفته به کمک میکروسکوپ نوری، طبق روش لگ رو و همکاران و موهانا و همکاران، جهت مشاهده سیستوسورهای قارچ مورد بررسی قرار گرفتند. سه تکرار (گیاه) برای هر مزرعه در نظر گرفته شد و بخش دیگر ریشه‌های مویین چغندرقند 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 چغندرقند کاشته شده در خاک مناطق مختلف، متفاوت بود و روش میکروسکوپی توانست در ۵۹ درصد از ریشه‌های چغندرقند سیستوسورهای 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 چغندرقند 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 سیستوسورها مشاهده نشد ممکن است به علت عدم آلودگی نمونه ریشه به قارچ فوق باشد، چرا که زمان لازم برای آلودگی چغندرقند بر اساس تحقیقات انجام شده مختلف، ۵ الی ۷ هفته می‌باشد و پس از

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 چغندرقند به قارچ فوق و شکل ۱ نقشه پراکندگی و محل نمونه برداری از مزارع چغندرقند را به تفکیک هر شهرستان نشان می‌دهد.

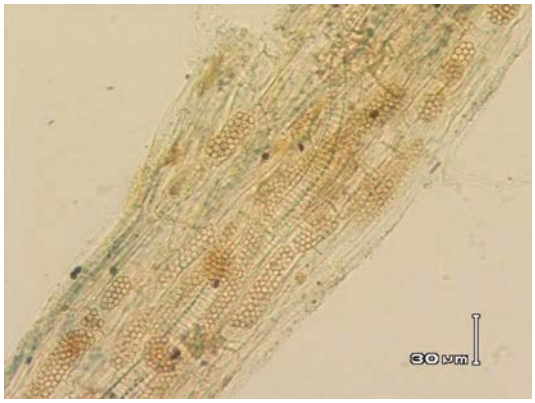
مشاهده میکروسکپیک قارچ *P. betae* در سلول‌های ریشه

پس ازگذشت ۷ هفته از آغاز آزمایش، اسلاید میکروسکوپی به روش یاد شده در قبل تهیه، که در نتیجه سیستوسورهای قارچ *P. betae* در برخی نمونه‌های میکروسکوپی تشکیل و توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰X شناسایی شدند. سیستوسورها در دستجات ۷ تا ۷۰ سیستی و در بافت اپیدرم ریشه‌های مویین چغندرقند 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 دربافت 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 سیستوسور برای تشخیص قارچ مزبور استفاده شد (شکل‌های ۲ و ۳)

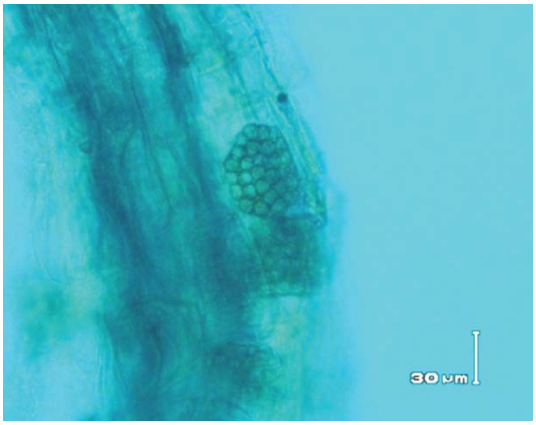
جدول ۱- درصد آلودگی ریشه‌های چغندر قند به *P. betae* در دو روش، میکروسکوپی و مولکولی Nested PCR به تفکیک شهرستان‌های استان خراسان رضوی و شمالی (۳ تکرار در هر مزرعه)

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

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



شکل۲– سیستوسورهای *P. betae* در ریشه‌های فرعی چغندرقند
شکل از نگارنده



شکل۳– سیستوسورهای *P. betae* در ریشه‌های مویین تاج خروس ریشه قرمز
شکل از نگارنده

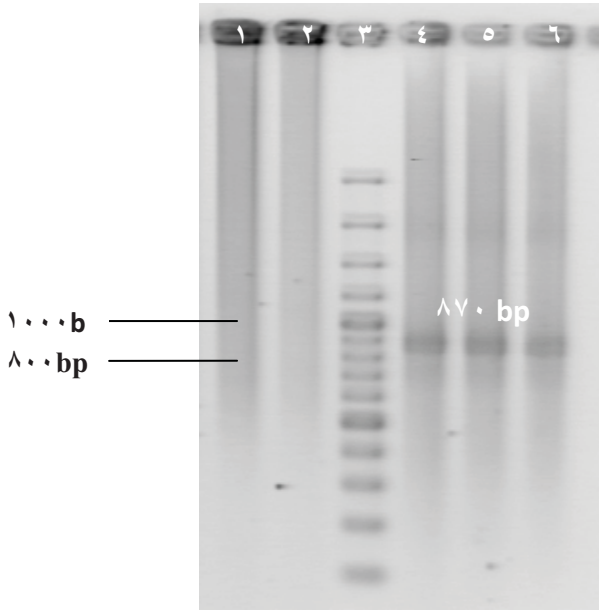
شناسایی *P. betae* به روش مولکولی در ریشه چغندرقند

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 آغازگرآشیانه‌ای (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 واکنشNested PCR ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر تعیین شد و در مرحله دوم واکنش، محصول مرحله اول به میزان (V/V) ۱/۲۵ /۱۰۰۰ با آب مقطر استریل رقیق و استفاده شد. نتایج بدست آمده از این تحقیق با نتایج بدست آمده توسط موتاسا و همکاران مطابقت داشت (شکل۴).

دامنه میزبانی *P. betae* در علف‌های هرز غالب چغندر قند

پس ازگذشت ۵ الی ۷ هفته از کاشت بذور علف‌های هرز و بررسی میکروسکوپی ریشه‌های آنها، گونه‌های سلمه تره (*Chenopodium album*)، تاج خروس ریشه قرمز *Amaranthus retroflexus*) (، تاج خروس سبز (خزنده) (*A. viridis*)، خرفه (*Portulaca oleraceae*) و پیچک صحرایی (*Convolvulus arvensis*) به قارچ *P. betae* آلوده شده بودند و در سایر علف‌هایهرز 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 برخودار بودند و تعداد سیست‌ها در هر سیستوسور در هر دو گونه تاج خروس کمتر و سیستوسورها به صورت پراکنده در طول ریشه‌های

مویین مشاهده می‌شدند، لذا جهت مشاهده سیستوسورهای 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 چغندرقند و گندم و جو استان‌های خراسان رضوی و شمالی بوده و درنتیجه اهمیت مبارزه با این گیاهان را به ویژه در مناطقی که سابقه آلودگی به ویروس‌های مختلفی مانند BNYVV دارد را آشکار می‌نماید (جدول۲).



شکل٤- الکترفورز محصول مرحله دوم واکنشNested PCR با استفاده از یک جفت آغازگر آشیانه‌ای در ژل افقی آگارز ۱/۲ درصد رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ستون۱ :کنترل منفی (آب مقطر استریل) ، ستون ۲: عدم تشکیل باند اختصاصی *P. betae* در DNA چغندرقند سالم، ستون ۳: نشانگر DNA (۱۰۰bp DNA Ladder) ، ستون‌های ٤ الی ٦ :باند اختصاصی bp ۸۷۰ تکثیر شده در ۳ جدایه *P. betae* از چغندرقند.

جدول۲- وجود و یا عدم وجود سیستوسور *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	*Amaranthus viridis*	Amaranthaceae
+	تاج خروس ریشه قرمز	*A. retroflexus*	Amaranthaceae
+	سلمه تره	*Chenopodium album*	Chenopodiaceae
_	جارو	*Kochia scoparia*	Chenopodiaceae
_	تاجریزی وحشی	*Solanum nigrum*	Solanaceae
_	تاتوره	*Datura stramonium*	Solanaceae
_	پنیرک	*Malva sylvestris*	Malvaceae
+	خرفه	*Portulaca oleraceae*	Portulacaceae
_	خردل وحشی	*Sinapis arvensis*	Cruciferae
_	آفتاب پرست	*Heliotropium* sp	Borabinaceae
+	پیچک صحرایی	*Convolvulus arvensis*	Convolvulaceae
_	بارهنگ کبیر	*Plantago major*	Plantaginaceae
_	یولاف وحشی	*Avena fatua*	Gramineae
_	سوروف	*Ehinocholoa crus-galli*	Gramineae
_	ارزنک وحشی	*Setaria viridis*	Gramineae
_	جو موشی	*Hordium* sp	Gramineae
_	چاودار	*Secale cereal*	Gramineae

+ : وجود سیستوسور.

– : عدم وجود سیستوسور.

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

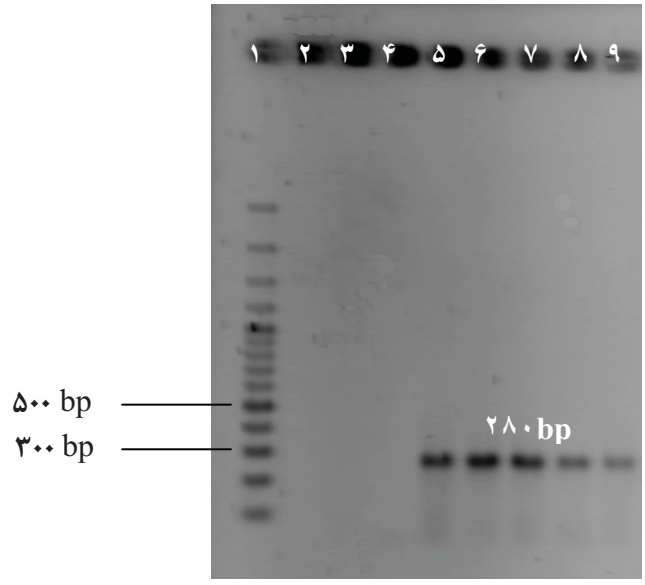
نتایج حاصله از روش مولکولی آلودگی ریشه‌های علف‌های هرز تاج خروس سبز، تاج خروس ریشه قرمز، سلمه تره، خرفه و پیچک صحرایی را به قارچ فوق ردیابی نمود، ولی در سایر علف‌های هرز مورد آزمایش این قارچ رد یابی نشد در این روش از دو گیاه شاهد (سلمه تره و یولاف وحشی) به ترتیب به عنوان شاهد میزبان *P. betae* و شاهد 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* به 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 چغندرقند 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. 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 چغندرقند 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 کاملا با قارچها متفاوت است، به‌طوری‌که 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.



شکل ۵- الکترفورز محصول واکنشPCR در ژل افقی آگارز ۱/۲ درصد، رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید. ستون ۱: نشانگر DNA (bp DNA Ladder۱۰۰ (ستون۲ : کنترل منفی (آب مقطر استریل) ، ستون‌های ۳ و٤ : عدم تشکیل باند اختصاصی *P. betae* در DNAی استخراج شده از به ترتیب علف‌های هرز سلمه تره- شاهد (۳) و یولاف وحشی - شاهد (٤)، ستون‌های ۵ الی ۹ : باند اختصاصی bp ۲۸۰ تکثیر شده در ۵ جدایه *P. betae*به ترتیب از: سلمه تره (۵)، خرفه (٦)، پیچک صحرایی (۷)، تاج خروس ریشه قرمز (۸)و تاج خروس سبز (۹).

در گذشته شناسایی‌این دو گونه بر اساس دامنه میزبانی صورت می‌گرفته است، در حالیکه اخیرا اعتقاد بر این است که امکان آلودگی چغندرقند 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 چغندرقند از دو روش میکروسکوپی (مشاهده سیستوسور در سلول‌های اپیدرم ریشه) و روش مولکولی Nested PCR به طور توام در مزارع چغندرقند 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 چغندرقند مشخص نماید (۲۴). از روش Nested PCR در ایران برای اولین بار جهت تشخیص گونه *P. betae* در چغندرقند استفاده شد.

نتایج حاصله از این تحقیق نشان داد که این قارچ در تمامی مناطق چغندرقند کاری استان‌های خراسان رضوی و شمالی نمونه‌برداری شده وجود دارد (جدول۱) و این موضوع می‌تواند وجود برخی از بیماریهای ویروسی مهم و مخرب در چغندرقند مانند رایزمانیا را در این مناطق توجیه نماید. در حال حاضر بیماری رایزمانیا 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 به‌عنوان میزبان و یا میزبان آلترناتیو 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 علف‌هرز مهم مزارع چغندرقند و گندم از دو روش میکروسکوپی (مشاهده سیستوسورهای قارچ) و روش PCR به صورت توام 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 صحرایی، سیستوسورهای *P. betae* را تشخیص دهد، و از آنجایی که این اسپورها می‌توانند برخی از ویروسهای بیماریزا در چغندرقند 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 رایزمانیا) 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 چغندرقند در شرایط استان‌های خراسان هستند یا خیر. لگ رو و همکاران در بررسی خود نشان دادند که هر چند انتقال BNYVV ازطریق چند گیاه آلترناتیو به چغندرقند امکان پذیر است ولی ویروس‌هایی مانند BNYVV قادر نیستند از سایر علف‌های هرز به چغندرقند منتقل گردند. محققین اعتقاد دارند، میزان سیستوسورهای 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 آلترناتیو 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 چغندرقند، 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 چغندرقند را آلوده می‌نمایند و گروه دوم آنهایی که *C. album* را مبتلا می‌سازد. علف‌های هرزی که به عنوان گیاهان آلترناتیو 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.

منابع

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

فارس. مجله بیماری شناسی گیاهی ۳۲: صفحات ۲۰۶-۲۰۰.

۲- بازوبندی م.، باغستانی میبدی م. ع.، و زند ا. ۱۳۸۵. علف‌های هرز مزارع چغندرقند و مدیریت آنها. انتشارات سازمان حقیقات 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.، اروجی 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 چغندرقند. 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 چغندرقند 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. Fitopatology. 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 Bologna, 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. , Chwarszsynska 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., Chwarszsynska 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., Chwarszsynska 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., Chwarszsynska D. M., Halsey K., and Asher M. J. C. 2000. Specific polycolonal 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 Phytopathologyl 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.