مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹
DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

Phytopythium babaiaharii، عامل پوسیدگی ریشه خیار گلخانه‌ای

فریبا قادری*

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج، یاسوج، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۷/۱۵

چکیده:

پوسیدگی ریشه و طوقه خیار یکی از بیماری‌های خسارت‌زا در گلخانه‌ها می‌باشد. به منظور بررسی این بیماری نمونه-برداری از گلخانه‌های مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد انجام شد. سپس بافت‌های آلوده به قطعات پنج تا شش میلی‌متری تقسیم و بدون ضدعفونی سطحی روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP کشت شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک زئوسپور انجام شد. همه جدایه‌ها بر اساس خصوصیات ریخت شناختی و مولکولی (ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ و ناحیه ITS-rDNA) شناسایی شدند. مطابق واکاوی‌های فیلوژنتیکی و ریخت شناختی، گونه *Phytopythium babaiahari* تشخیص داده شد. آزمون بیماریزایی نشان داد که گونه *P. babaiahari* قادر به آلوده کردن گیاهچه‌های خیار، رقم سامان در شرایط گلخانه می‌باشند. به منظور اثبات اصول کخ از گیاهان آلوده مجدداً قارچ *P. babaiahari* جداسازی شد. این نخستین گزارش از گونه *P. babaiahari* است که باعث پوسیدگی ریشه و طوقه خیار گلخانه‌ای در ایران و دنیا می‌باشد.

واژگان کلیدی: خیار گلخانه‌ای، کهگیلویه و بویراحمد، فیلوژنی، *cox1*، ITS-rDNA

*نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: f.ghaderi@yu.ac.ir

مقدمه

خیار با نام علمی *Cucumis sativus* L. گیاهی متعلق به خانواده کدوئیان(*Cucurbitaceae*) است. خیار یکی از سبزی‌های قدیمی جهان است که منشأ آن به هند یا جنوب آسیا نسبت داده می‌شود. خیار بعد از گوجه‌فرنگی، کلم و پیاز از سبزی‌های مهم در دنیاست. اگر چه از لحاظ کالری و مواد غذایی در سطح بالایی قرار ندارد ولیکن یکی از منابع تأمین ویتامین و مواد معدنی در رژیم غذایی انسان است (۳۴). امروزه این گیاه به طور گسترده در جهان کشت می‌شود و مشخص شده است که عملکرد خیار در گلخانه‌ها حدود ۱۲۰ تا ۲۹۰ تن در هکتار است (۶).

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹
DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

بنابراین با گسترش روزافزون کشت خیار، توسط تعداد زیادی قارچ‌های خاک‌زاد و هوازاد مورد حمله قرا می-گیرند. در میان، بیماری‌های خاکزاد، می توان به بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه خیار اشاره نمود که توسط گونه‌هایی از شبه جنس‌های *Pythium* و *Phytophthora* ایجاد می‌شود که هر ساله خسارات جبران‌ناپذیری به این محصـول در مزارع و گلخانه‌ها وارد می‌نماید (۲ و ۳).

بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه خیار در دنیا اهمیت فراوانی دارد. اولین گزارش از این بیماری در سال ۱۹۳۷ بود که عامل بیماری گونه *Phytophthora capsici* در چند منطقه از ایالات متحده آمریکا تشخیص داده شد و میزان خسارت به این محصول، حدود ۵۰ تا ۹۰ درصد برآورد شد (۲۵). همچنین گونه *Ph. capsici* در سال‌های ۲۰۰۴ و ۲۰۰۸ نیز به عنوان یک فاکتور محدودکننده خیار گلخانه ای در اروپا معرفی شد (۱۶ و ۱۷). کاتسورا (۱۹۶۸) برای اولین بار گونه *Ph. melonis* از گیاه خیار در ژاپن جداسازی و شناسایی گردید که علاوه بر خیار روی هندوانه و کدوتنبل بیماریزا بود (۲۲). در چین، هو و همکاران (۱۹۸۶) عامل بوته‌میری خیار را گونه *Ph. drechsleri* تشخیص دادند (۱۸). هووارد و همکاران (۱۹۹۴) سه گونه‌ی *Pythium aphanidermatium*، *P. ultimum* و *P. regulare* از عوامل مهم مرگ گیاهچه و بوته‌میری خیار در کانادا گزارش نمودند (۱۹). مورمن و همکاران (2002) شش گونه، شامل *P. aphanidermatium*، *P. irregulare*، *P. dissotocum*، *P. heterothallicum* ، *P. ultimum* و *P. myriotylm* را عامل پوسیدگی طوقه و ریشه خیار در پنسیل وانیا معرفی نمودند (۲۷). در ایران، گونه‌های *P. aphanidermatium* و *Ph. melonis* ، *Ph. capsici* و *Ph. drechsleri* به عنوان عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه خیار گزارش شدند (۲،۱ و ۳). شبه قارچ *Phytopythium* بینابین دو شبه جنس *Pythium* و *Phytophthora* می‌باشد و بیشتر اعضا این جنس زندگی ساپروفیتی دارند اما برخی از گونه-های این جنس بیمارگر گیاهی می‌باشند و باعث پوسیدگی بذر، ریشه و حتی آسیب به تنه و شاخه درختان می‌شوند ولی تاکنون این شبه قارچ از خیار جداسازی و شناسایی نشده است (۱۲، ۳۲ و ۳۳).

با توجه به اینکه شناسایی شبه قارچها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی مشکل و گاهی توأم با مشکلات فراوان است، در دهه‌های اخیر استفاده از ویژگی‌های مولکولی و آنالیز DNA در تشخیص گونه-ها رو به افزایش است و پیشرفت‌هایی که در این زمینه انجام شده و باعث شده است که این روش‌ها به‌عنوان روش‌های اختصاصی، سریع و مناسبی در تشخیص و

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹
DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

رده‌بندی استفاده شوند (۲۹ و ۳۵). بخش‌های مختلف ژنوم مانند منطقه ITS-rDNA، زیر واحد شماره یک و دو سیتوکروم اکسیداز (*cox1* و *cox2*)، بتاتوبولین (*tub2*)، زیر واحد بزرگ و کوچک ریبوزومی (LSU, SSUو ژن *NADH* در فیلوژنی مولکولی استفاده شده است (۳، ۲۶، ۳۵ و ۲۹)

در استان کهگیلویه و بویراحمد، گیاه خیار از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و سطح زیر کشت نسبتاً وسیعی را به خود اختصاص می‌دهد (۲و ۳). از طرفی، مهم‌ترین عامل زوال و مرگ گیاه خیار در این استان بیمارگرهای خاکزاد هستند که در بین آنها قارچهای عامل پوسیدگی‌های طوقه و ریشه اهمیت ویژه‌ای دارند. هدف از این پژوهش، شناسایی برخی گونه‌های شبه قارچی عامل پوسیدگی طوقه و ریشه خیار در استان کهگیلویه و بویراحمد، آزمون بیماریزایی در شرایط گلخانه و شناسایی مولکولی گونه‌ها بر اساس توالی‌یابی ناحیه ITS-rDNA و ژن سیتوکروم اکسیداز۱ (*cox1*) می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی بیمارگرها:

از طوقه و ریشه گیاهچه‌های مرده و یا در حال زوال خیار در گلخانه‌های مناطق مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد نمونه‌برداری به عمل آمد در آزمایشگاه بافت‌های آلوده با آب لوله‌کشی شسته شدند، تا اسپور قارچهای سطحی پوده‌زی و مواد اضافی در سطح بافت شسته شوند. سپس از فواصل بین بافت سالم و آلوده، بافت‌هایی به قطعات ۵-۴ میلی‌متر مربع تهیه گردید و بعد از شستشوی مجدد با آب مقطر سترون و خشک نمودن با حوله کاغذی بدون ضدعفونی سطحی، روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP (عصاره ۴۰ گرم آرد ذرت آگار که حاوی ۲۰ میلی‌گرم دلواسید (حاوی ۵۰ درصد پی‌مارسین)، ۲۵۰ میلی‌گرم آمپی‌سیلین، ۱۰میلی‌گرم ریفامپیسین ،۱۰۰میلی‌گرم پنتا کلرو نیترو بنزن و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب) کشت و در دمای ۲۵ $^{\circ}C$ نگهداری شدند. برای مشاهده مقدماتی قارچهایی که روی محیط کشت CMA-PARP رشد کرده بودند از تعدادی دانه شاهدانه که قبلا به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده و بعد کاملاً خشک شده بودند، روی پرگنه‌های جوان مورد نظر قرار داده و بعد از ۲۴ ساعت، به تشتک‌های پتری حاوی آب مقطر سترون و عصاره خاک ۱٪ منتقل و در زیر نور دائم مهتابی (دو لامپ مهتابی ۴۰ واتی به فاصله ۳۰ سانتی-متری) و در ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بذور کلونیزه شده بعد از ۲۴ ساعت تا مدت ۵-۴ روز جهت تشکیل اسپورانژیوم و رهاسازی زئوسپور جهت شناسایی مقدماتی قارچهای جدا شده از گیاهان نمونه-برداری شده مورد بررسی قرار گرفتند (۱۵ و ۲۰).

شناسایی بیمارگرها

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹ DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

خالص‌سازی جدایه‌های با روش تک زئوسپور روی محیط کشت آب-آگار (WA: Water-Agar) دو درصد انجام گرفت (۱۵). سپس برای شناسایی جدایه‌ها بعد از خالص‌سازی، با استفاده از کلیدهای موجود بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی اسپورانژیوم، تولید یا عدم تولید اُاُسپور، شکل پرگنه، تورم ریسه، تولید یا عدم تولید کلامیدوسپور و اندازه‌گیری رشد در دماهای مختلف مورد بررسی قرار گرفتند (۵، ۸ و ۲۹).

برای تشکیل اندام جنسی، از دو روش استفاده گردید: در روش اول با این احتمال که جدایه‌ها هموتالیک می‌باشند، به تنهایی بر روی محیط کشت عصاره دانه شاهدانه کشت داده شدند. سپس حاشیه تشتک پتری با یک لایه پارافیلم مسدود گردید. در روش دوم با این فرض که جدایه‌ها هتروتالیک می‌باشند، جدایه‌های مورد مطالعه به صورت جداگانه با تیپ‌های آمیزشی A1 و A2 (تهیه شده از کلکسیون گروه گیاهپزشکی دانشگاه شیراز) به روش ساندویچ بر روی محیط کشت عصاره دانه شاهدانه کشت داده شدند. سپس در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی به مدت یک ماه نگهداری شدند (۱۵).

شناسایی مولکولی

به منظور تأیید مولکولی جدایه‌های شناسایی شده بر اساس ویژگی‌های ریخت شناختی، استخراج DNA به روش موری و تامپسون برای همه جدایه‌ها انجام شد (۲۸). سپس از ترکیب جفت آغازگرهای OomCoxI-Levup/FM85mod جهت تکثیر ناحیه سیتوکروم اکسیداز ۱ (*cox1*) (۳۱) و از جفت آغازگرهای ITS1/ITS4 برای تکثیر ناحیه ITS-rDNA (۳۶) استفاده شد. مخلوط واکنش PCR شامل هشت میکرولیتر آب دیونیزهٔ استریل، سه میکرولیتر 10X PCR Buffer، پنج میلی‌مولار MgCl2، ۲۰۰میلی‌مولار از هر نوکلئوتید، ۲۰ پیکومول از هر آغازگر، یک واحد Taq DNA پلیمراز و سه میکرولیترDNA با غلظت ۱۰ نانوگرم تهیه شد. برنامه حرارتی در PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، ۳۵ سیکل چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، اتصال آغازگرها به ناحیه هدف به مدت ۱ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سلسیوس برای ITS-rDNA و دمای ۵۵ درجه سلسیوس برای ژن *cox1* و گسترش رشته در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه و یک چرخه گسترش نهایی رشته در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد (۲۹). توالی‌یابی و خالص‌سازی محصولات PCR توسط شرکت ماکروژن کره جنوبی انجام گرفت.

برای اطمینان از صحت توالی‌های به‌دست آمده از هر نمونه، هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST (۷) توالی‌های موجود در بانک

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹ DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

ژن مقایسه شد (۲۹). جهت آنالیز تبارزایی گونه *Phytophthora capsici* به عنوان تاکسون خارج از گروه انتخاب گردید (جدول ۱). توالی‌های ژن *cox1* و ناحیه ITS-rDNA با هم ادغام شدند و با استفاده از نرم‌افزار MAFFT v.7.043b هم‌ردیف گردیدند (۲۱). سپس آنالیزهای فیلوژنتیکی از روش Maximum Parsimony (MP) و با استفاده از الگوی از پیش تعیین شده با نرم افزار MEGA X نیز ترسیم گردید (۲۴). برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در درخت فیلوژنتیکی مقدار اعتبار سنجی با ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از این نرم افزار محاسبه شد.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های *Phytopythium* استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی در این مطالعه

نام گونه	نام ایزوله	شماره دسترسی در بانک ژن	
		ITS-rDNA	*cox1*
Phytopythium boreale	CBS 55188	HQ643372	HQ708419
Phytopythium boreale	P28	MT740886	MT720660
Phytopythium carbonicum	CBS 112544	HQ643373	HQ708420
Phytopythium carbonicum	P24	MT740889	MT720663
Phytopythium chamaehyphon	CBS 25930	HQ643374	HQ708421
Phytopythium citrinum	CBS 119171	AY197328	HQ708424
Phytopythium cucurbitacearum	CBS 74896	HQ643381	HQ708428
Phytopythium delawarense	CBS 123040	AB725875	KF853240
Phytopythium fagopyri	CBS 29335	AB690617	AB690641
Phytopythium helicoides	CBS 28631	HQ643383	HQ708430
Phytopythium iriomotense	GUCC7020	AB690629	AB690659
Phytopythium litorale	CBS 118360	HQ643386	HQ708433
Phytopythium litorale	GUCC 1072	AB920537	AB920495
Phytopythium longitubum	IRAN 4017C	MT740882	MT720656
Phytopythium longitubum	IRAN 4018C	MT740883	MT720657
Phytopythium megacarpum	CBS 112351	HQ643388	HQ708435

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹ DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

Phytopythium mercuriale	CBS 122443	AB690614	AB690636
Phytopythium montanum	CBS 111349	HQ643389	HQ708436
Phytopythium montanum	ADC 9762	HQ643391	HQ708438
Phytopythium nanjigense	Chen 218	MF459636	MF459633
Phytopythium ostracodes	CBS 76873	HQ643395	HQ708442
Phytopythium ostracodes	P45	MT740892	MT720666
Phytopythium vexans	CBS 11980	HQ643400	HQ708447
Phytopythium vexans	2D111	AB725880	AB704201
Phytopythium babaiaharii	IRAN 4015C	MT740880	MT720654
Phytopythium babaiaharii	IRAN 4016C	MT740881	MT720655
Phytophthora capsii	CBS 12823	PP594919	MH136863
Phytopythium babaiaharii	**Iran-Ppy1**	**PP892678**	**PP898053**
Phytopythium babaiaharii	**Iran-Pp2**	**PP892679**	**PP898054**
Phytopythium babaiaharii	**Iran-Ppy3**	**PP892680**	**PP898055**
Phytopythium babaiaharii	**Iran-Ppy4**	**PP892681**	**PP898056**
Phytopythium babaiaharii	**Iran-Ppy5**	**PP892682**	**PP898057**

اثبات بیماریزایی

برای تهیه مایه تلقیح، از محیط عصاره شاهدانه و ورمی‌کولیت استفاده شد. بر اساس این روش، ابتدا در کیسه‌های پلاستیکی مقاوم به دمای اتوکلاو، ۲۰۰ گرم ورمی‌کولیت ریخته شد و به آن ۱۲۰ میلی‌لیتر عصاره شاهدانه (عصاره ۶۰ گرم دانه شاهدانه در یک لیتر آب مقطر) اضافه شد و سترون گردید. سپس، از پرگنه‌های پنج روزه جدایه‌های مورد مطالعه که قبلا روی محیط CMA رشد کرده بودند، چهار تا شش بلوک میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر به کیسه‌های پلاستیکی اضافه گردید. سپس کیسه‌های پلاستیکی به مدت چهار هفته در دمای ۲۰ $^{\circ}C$ و در تاریکی قرار داده شدند (۱۴).

برای پرورش گیاهچه، بذر خیار رقم سامان بعد از ۱۲ ساعت خیساندن، در گلدان‌های پلاستیکی (۱۵سانتی‌متری) در شرایط گلخانه کشت داده شدند. گلدان‌ها تا عمق ده سانتی‌متری با خاک لومی رسی سترون پُر شدند. بعد از آبیاری در هر گلدان دو بذر سامان کاشته و روی آن به ارتفاع نیم سانتی‌متر خاک ریخته شد. از گیاهچه‌های دو هفته‌ای خیار برای

DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹

مایه‌زنی استفاده گردید. خاک اطراف هر گیاهچه تا عمق سه سانتی‌متری کنار زده شد و ۵ گرم از مایه تهیه شده در اطراف طوقه و ریشه گیاهچه خیار قرار داده شد. سپس برای تعیین حضور فعال قارچ در خاک بلافاصله سوراخ زه آب گلدان‌ها با پارافین جامد بسته شده، خاک گلدان‌ها با روش طعمه‌گذاری با برگ مرکبات بررسی شد تا حضور فعال قارچ در خاک مشخص گردد (۹ و ۱۴). گیاهان شاهد نیز با همین روش، ولی ورمی‌کولیت حاوی عصاره شاهدانه مایه‌زنی شدند.

نتایج

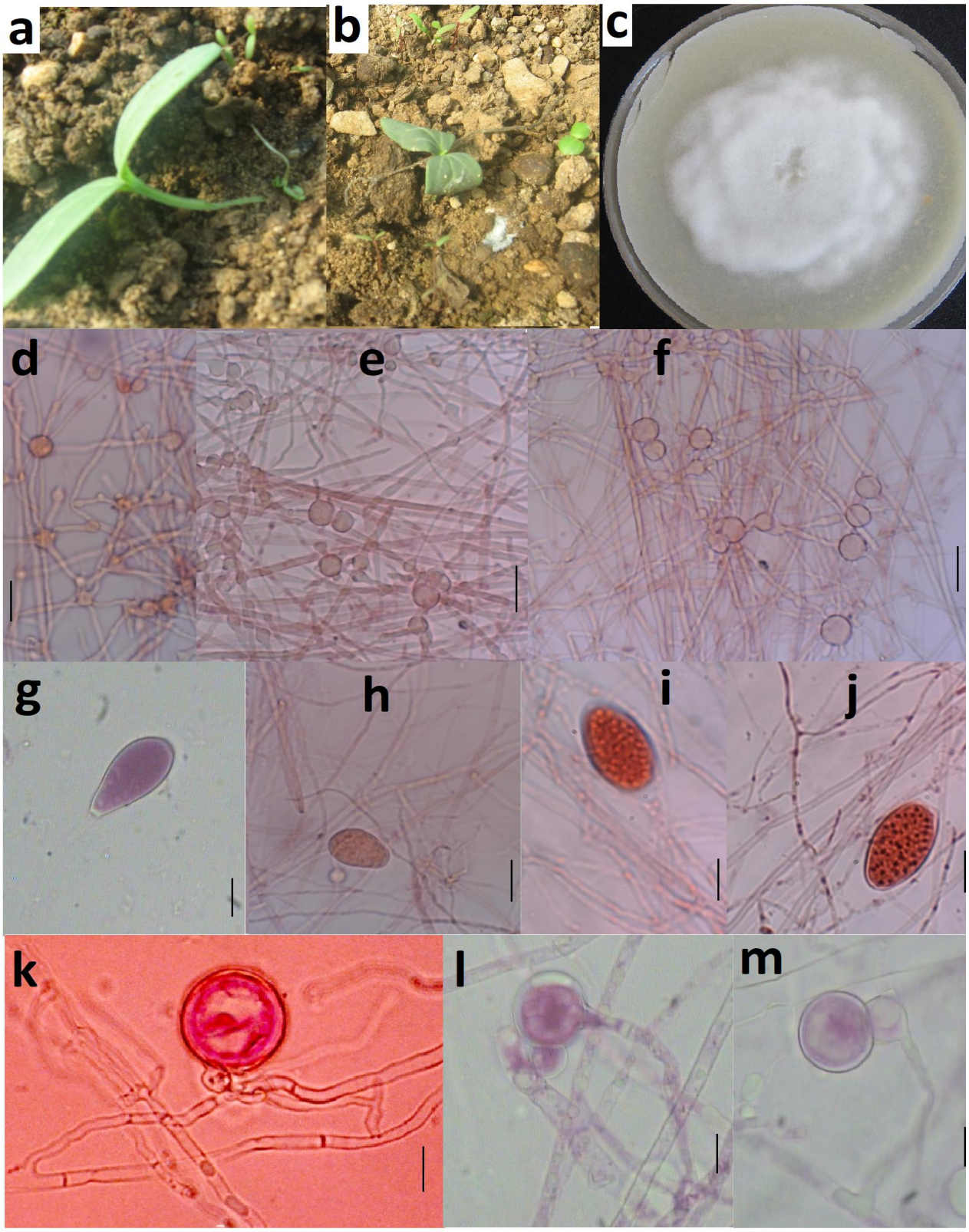
معرفی بیمارگرها

بر اساس نمونه برداری‌هایی که از گلخانه‌های مختلف استان کهگیلویه و بویراحمد انجام گرفت،پنج جدایه از بافت‌های طوقه و ریشه‌ی خیار در یکی از گلخانه‌های یاسوج (شکل ۱، a) جداسازی گردید. بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی، جدایه‌های بدست آمده به گونه *Phytopythium babaiaharii* تعلق داشتند.

***Phytopythium babaiaharii* S. Rezaei, M. Abrinbana & Y. Ghosta, sp. nov.**

پرگنه‌ها روی محیط کشت ذرت-آگار به صورت الگوی گل مانند رشد نموده و بندرت دارای میسیلیوم هوایی بودند (شکل۱، c). قطر ریسه‌ها حدود ۵ تا ۷ میکرومتر می‌باشند. تورم‌های ریسه‌ای کروی شکل، غالبا بین ریسه‌ای با قطر ۳۰-۲۶× ۱۹-۱۴ بودند (شکل۱ ، d-f). همه اسپورانژیوم‌ها بدون پاپیل مشاهده شدند (شکل ۱، g-j). این شبه قارچ هموتال می‌باشد و تولید اُاُگونیوم-های کروی شکل، انتهایی با دیواره صاف با قطر ۳۰-۲۷× ۲۲-۱۹ می‌نماید. آنتریدیوم‌ها به صورت پاراجینوس، به صورت یکی یا چند تایی،یک پایه یا دو پایه به اُاُگونیوم متصل می‌شوند (شکل ۱،k-m). اُاُسپورها کروی، دارای دیواره صاف و بدون تزیینات می‌باشد و مشاهده شد که هم حجم اُاُگونیوم را پُر می-کنند و هم پُر نمی‌کنند. دماهای ویژه شامل کمینه، بیشینه و بهینه روی محیط کشت CMA، به ترتیب ۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سلیس می‌باشد.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹
DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362



شکل ۱- *Phytopythium babaiaharii* : (a-b) علائم پوسیدگی ریشه و طوقه خیار در گلخانه، (c) الگوی رشدی پرگنه‌ها روی محیط کشت CMA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، (d-f) تورم‌های ریسه‌ای، (g-j) اسپورانژیوم‌های بدون پاپیل، (k-m) اُاگونیوم با آنتریدیوم پاراجینوس (خط مقیاس=۱۰ میکرومتر)

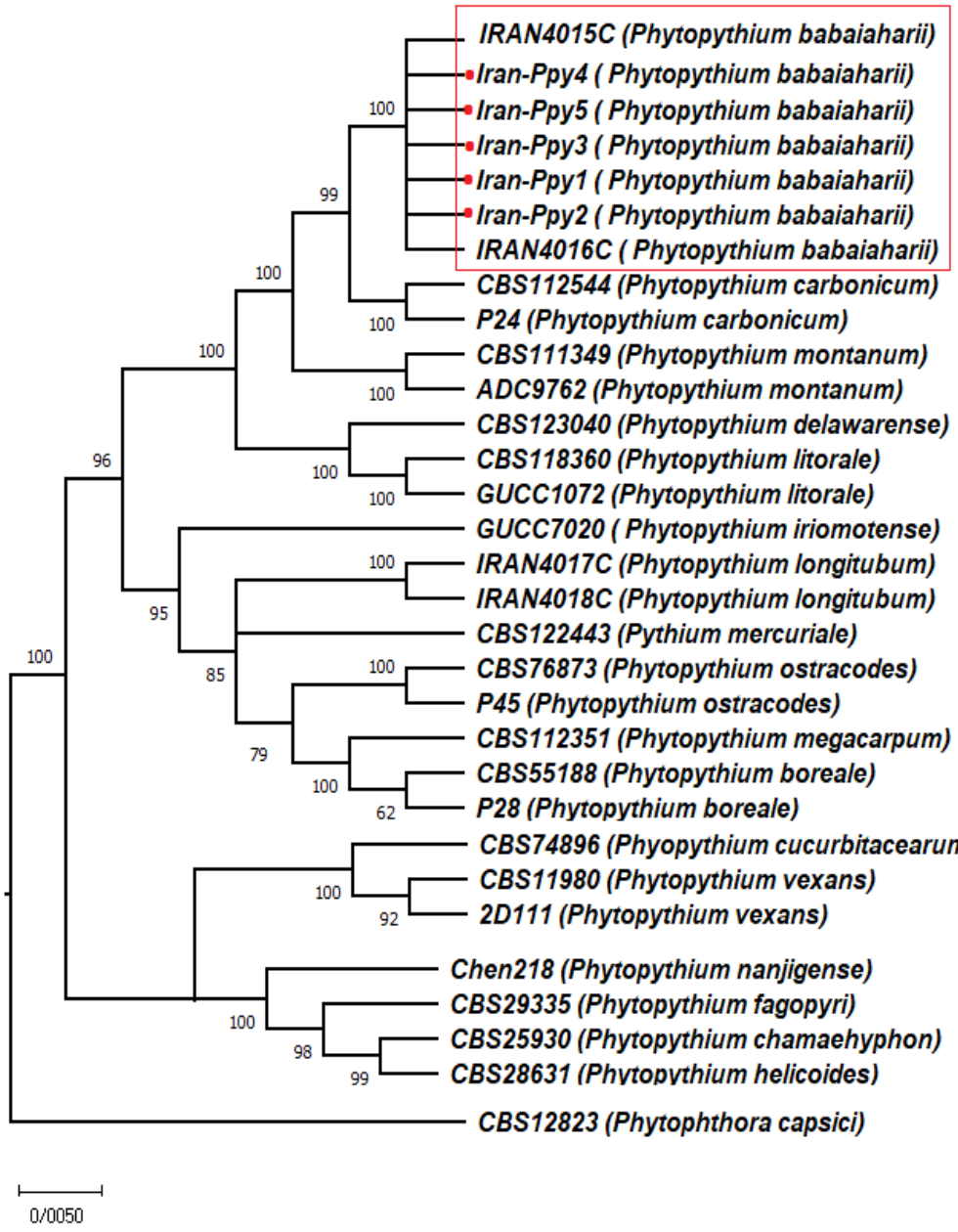
DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹

شناسایی مولکولی

پس از شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها، از جفت آغازگرهای OomCoxI-Levup/FM85mod جهت تکثیر ناحیه سیتوکروم اکسیداز ۱ و از جفت آغازگرهای ITS1/ITS4 برای تکثیر ناحیه ITS-rDNA استفاده شد. نتایج نشان داد که جفت آغازگرهای OomCoxI-Levup/FM85mod و جفت آغازگرهای ITS1/ITS4 به ترتیب قطعه‌ای به طول ۷۰۰ و ۹۰۰ جفت باز را تکثیر نمودند.

آنالیز تبارزایی از توالی‌های سیتوکروم اکسیداز ۱ و ناحیه ITS-rDNA نشان داد که گونه *Phytopythium babaiaharii* یکی از عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه خیار در گلخانه‌های خیار در استان کهگیلویه و بویراحمد می‌باشد. در این مطالعه، پنج جدایه Iran-Ppy1 تا Iran-Ppy5 با گونه *Phytopythium babaiaharii* (نام جدایه‌ها: IRAN4015C و IRAN4016C) یک گروه مونوفیلیتیک با مقیاس اعتبار سنجی ۱۰۰ درصد را تشکیل دادند (شکل ۲).

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹
DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362



شکل ۲- . درخت فیلوژنیکی با روش ماکزیمم پارسیمونی از گونه‌های .*Phytopythium* spp بر اساس ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ و ناحیه ITS-rDNA ترسیم شده است. مقدار اعتبارسنجی در زیر شاخه‌های درخت نمایش داده شده است. گونه *Phytophthora capsici* به عنوان خارج گروه استفاده شد. پنج جدایه Iran-Ppy1 تا Iran-Ppy5 در این مطالعه استفاده شدند.

آزمون بیماریزایی

نشانه‌های بیماری ده روز بعد از مایه‌زنی مشاهده شد، گیاهچه‌های خیار در اثر مایه‌زنی با قارچ *Phytopythium babaiaharii*، علائم پوسیدگی طوقه و ریشه را نشان دادند. به اینصورت که علاوه بر پوسیدگی ریشه، طوقه گیاه سیاه و باریک شده و قادر به تحمل وزن اندام هوایی نمی‌باشد که نهایتا باعث مرگ گیاه می‌شود (شکل ۳-a, b).

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹ DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362



شکل۳-(a) پوسیدگی ریشه و طوقه گیاهچه خیار بعد از مایه‌زنی با *Phytopythium babaiaharii* (b) گیاه شاهد

بحث و نتیجه‌گیری

در این تحقیق، بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی، شبه قارچ *Phytopythium babaiaharii* به عنوان یکی از عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه خیار گلخانه‌ای تشخیص داده شد. در حالی که تاکنون عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه خیار گونه‌های *Pythium aphanidermatium*، *Phytophthora melonis*، *Phytophthora capsici* و *Phytophthora drechsleri* گزارش شده است (۱، ۲، و ۳). در حال حاضر گونه

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹ DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

Phytopythium babaiaharii از خاک مزارع چغندرقند جداسازی شده است و در شرایط گلخانه روی چغندرقند نیز غیربیماریزا می‌باشد، بنابراین این گونه به عنوان یک ساپروفیت معرفی شده است (۲۹). در حالی که در این تحقیق، گونه *P. babaiahari* از خیار گلخانه‌ای دارای علائم جداسازی گردید و آزمون بیماریزایی نشان داد که این شبه قارچ قادر به آلوده کردن گیاهچه‌های خیار در شرایط گلخانه می‌باشد و به منظور اثبات اصول کخ از گیاهان آلوده مجدداً این شبه قارچ جداسازی گردید. این نخستین گزارش از گونه *P. babaiahari* است که باعث پوسیدگی ریشه و طوقه خیار در ایران و احتمالاً دنیا می‌باشد.

با توجه به نتایج این تحقیق، شبه قارچ *Phytopythium babaiaharii* را می‌توان به عنوان یکی از بیمارگرهای دخیل در پوسیدگی ریشه و طوقه خیار گلخانه‌ای معرفی نمود. عدم جداسازی بیمارگر در برخی از گلخانه‌ها با وجود مشاهده علائم بیماری بوته‌میری احتمالا در ارتباط با عوامل مختلفی از جمله ارقام خیار، آب آبیاری و غلظت املاح محلول در آن، خصوصیات فیزیکی شیمیایی خاک و فعالیت میکروارگانیزم‌های خاکی می‌باشد و یا اینکه عدم موفقیت در جداسازی عامل بیماری می‌تواند به علت کاهش زادمایه‌ی قارچ در رابطه با تغییر عوامل ناشناخته محیطی خاک باشد (۱).

جدایه‌های قارچی بدست آمده در این تحقیق از هر دو بافت طوقه و ریشه خیار گلخانه‌ای جداسازی شدند. با توجه به محدوده فعالیت قارچ تا عمق ۳۰ سانتی-متری و همچنین رشد و نمو گیاهان در این محدوده، امکان آلودگی ریشه و طوقه گیاه افزایش می‌یابد. تحقیقات نشان می‌دهد که در ابتدای پیدایش بیماری، طوقه حساس‌ترین بخش گیاه می‌باشد اما اگر سیستم آبیاری به نحوی باشد که آب در تماس مستقیم با طوقه گیاه نباشد، پوسیدگی ریشه و نهایتا سبز خشکی گیاه اتفاق خواهد افتاد. آب نقش بسیار مهمی در پراکندگی اسپورهای غیر جنسی (زئوسپورها) شبه‌قارچها دارد، زیرا جمعیت اسپورانژیوم حاوی زئوسپور در قسمت‌های سطحی آب بیشتر بوده و شرایط بهینه‌تری برای پوسیدگی‌های طوقه و ریشه فراهم می‌نماید (Khosrowfar & Banihashemi 2004).

در این مطالعه، دمای گلخانه در زمان مایه‌زنی گیاهچه‌های خیار در محدوده ۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد بود. زیرا در دماهای پایین میزان فعالیت شبه‌قارچها بسیار کم می‌باشد و این نتایج با نتایج هرو (۲۰۰۸) تا حدود زیادی مطابقت دارد. ایشان فاکتور دما را در ایجاد و شدت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از شبه قارچها بسیار مهم معرفی نموده و مشخص کرد که ظهور علائم بعد از مایه‌زنی در دمای ۱۹ تا ۲۴ درجه سانتی‌گراد، بعد از ۱۸ روز و در دمای ۲۵ تا ۲۹

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹
DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

درجه سانتی‌گراد بعد از یک هفته مشاهده می‌گردد (۱۷).

با توجه به اینکه تشخیص دقیق گونه‌های *Phytopythium* بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی تاحدودی مشکل می‌باشد (۲۹)، از ناحیه ITS-rDNA و ژن سیتوکروم اکسیداز ۱ برای شناسایی دقیق حدایه‌ها در این تحقیق استفاده گردید. گونه *P. babaiaharii* از لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناختی مشابه با دو گونه *P. iriomotense* (۱۰) و *P. leanoi* (۱۱) در تولید چند آنتریدیوم متصل به یک اُاگونیوم و همچنین اُاسپورهایی که هم حجم اُاگونیوم را پُر می‌کنند و هم پُر نمی‌کنند، می‌باشد. اما از لحاظ شکل اسپورانژیوم می‌توان این سه گونه را از هم تفکیک نمود. گونه‌های *P. iriomotense* و *P. leanoi* به ترتیب اسپورانژیوم‌های نیمه پاپیل و پاپیل‌دار تولید می‌نمایند، در حالی که گونه *P. babaiaharii* اسپورانژیوم‌های بدون پاپیل تولید می‌کند.

به طور کلی ضدعفونی آب آبیاری کاری مشکل، پر هزینه و غیر قابل اجرا است، بنابراین برای مدیریت بیماری انجام صحیح روش‌های زراعی مانند انجام خاک‌ورزی و برقراری زهکشی مناسب خاک، شیوه کشت ردیفی، کوددهی بهینه، شیوه صحیح آبیاری و استفاده از قارچ‌کش‌های پیشگیری‌کننده و درمان کننده مانند متالاکسیل (ریدومیل) در هنگام کاشت جهت به حداقل رساندن پتانسیل استقرار بیماری در گیاهچه‌های حساس پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از حمایت مالی دانشگاه یاسوج برای انجام این کار پژوهشی تشکر می‌شود.

فهرست منابع

۱. اسمعیلی شیرزادی فرد، ا.، بنی‌هاشمی، ض.، ۱۳۸۷، نقش *Phytophthora melonis* و *P. drechsleri* در بوته‌میری کدوئیان در ایران، بیماری‌های گیاهی، ۴۴، صفحات ۵۴-۷۲.

۲. قادری، ف.، ۱۳۹۰، نقش گونه‌های *Pythium aphanidermatium* و *Phytophthora melonis* در پوسیدگی ریشه و طوقه خیار گلخانه‌ای در یاسوج، بیماری‌های گیاهی، ۴۷، صفحات ۲۹۳-۲۹۹.

۳. قادری، ف.، عسکری، ش.، عبدالهی، م.،۱۳۹۰، جداسازی و شناسایی گونه‌های فیتوفتورا از خیار گلخانهای در جنوب استان کهگیلویه و بویر احمد و تعیین واکنش ارقام مختلف خیار به عامل بیماری، پژوهش‌های تولید گیاهی، ۱۸، صفحات ۳۱-۴۶.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹ DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

۴. نصرالله زاده، س.، ۲۰۰۴، مطالعه گونه‌های *Phytophthora* spp. عامل پوسیدگی ریشه کدوئیان در استان گلستان، پنجمین کنگره گیاهپزشکی ایران، صفحه ۲۷۶.

5. Abrinbana, M., Badali, F., and Abdollahzadeh, J., 2016. Molecular and morphological characterization of three new species of *Pythium* from Iran: *P. ershadii, P. pyrioosporum*, and *P. urmianum*. Mycologia, 108, PP: 1175–1188.
6. Afazaty, M., Irandost, M., and Rezaei Estakhroeih, A. 2015. Effect of application of super absorbent on the growth and yield of cucumber under deficit irrigation. Journal of Water and Irrigation Management, 5(2), PP: 203-214.
7. Altschul, S. F., Madden, T. l., Schaffer, A. A. et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-LAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25, PP: 3389–3402.
8. Bahramisharif, A., Lamprecht, S. C., Spies, C. F., Botha, W. J., and McLeod, A., 2013. *Pythium cederbergense* sp. nov. and related taxa from *Pythium* clade G associated with the South African indigenous plant Aspalathus linearis (rooibos). Mycologia, 105, PP: 1174–1189.
9. Banihashemi, Z., and Ghaderi, F., 2006. *Phytophthora* species associated with crown and root rot of walnut in Southern Iran. Acta Horticulturae, 705, PP: 425–428.
10. Baten, M. A., Mingzhu, L., Motohashi, K., Ishiguro, Y., ZiaurRahman, M., Suga, H., and Kageyama, K., 2015. Two new species, *Phytopythium iriomotense* sp. nov. and *P. aichiense* sp. nov., 626 REZAEI ET AL.: PHYTOPYTHIUM FROM IRAN isolated from river water and water purification sludge in Japan. Mycological Progress, 14, PP: 2.
11. Bennett, R. M., Nam, B., Dedeles, G. R., and Thines, M., 2018. *Phytopythium leanoi* sp. nov. and *Phytopythium dogmae* sp. nov., *Phytopythium* species associated with mangrove leaf litter from the Philippines. Acta Mycologica, 52, PP: 1103
12. Benfradj, N., Migliorini, D., Luchi, N., Santini, A., and Boughalleb M'Hamdi, N. 2017. Occurrence of *Pythium* and *Phytopythium* species

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹ DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

isolated from citrus trees infected with gummosis disease in Tunisia. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 50, PP: 286–302.

13. Blair, J. E., Coffey, M. D., Park, S. Y., Geiser, D. M., and Kang, S., 2008. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences. Fungal Genetics and Biology, 45, PP: 266–277.
14. Ghaderi, F., and Banihashemi, Z., 2006. Distribution and relative importance of *Phytophthora* species isolated from declining walnut tree in Fars, Kerman, and Kohgilueh and BoyerAhmad provinces and reaction of walnut genotype to them. Iranian Journal of Plant Pathology, 43, PP: 163– 183.
15. Ghaderi, F., and Habibi, A., 2021. Morphological and molecular characterization of *Phytophthora* species associated with root and crown rot of pomegranate in Iran. Plant Pathology, 70, PP: 615–629.
16. Hausbeck, M. K., and Lamour, K. H., 2004. *Phytophthora capsici* on vegetable crops: Research progress and management challenges. Plant Disease, 88, PP: 1292-1303
17. Herrero, M. L., Brurberg, M. B., and Hermansen, A., 2008. First report of crown and root rot caused by *Phytophthora capsici* on hydrponically grown. Cucumbers in Norway. Plant Disease, 92, PP: 1138.
18. Ho, H. H., 1986. *Phytophthora melonis* and *P. sinensis* synonymous with *P. drechsleri*. Mycologia, 78, PP: 907-912.
19. Howard, R. J., Garland, J. A., and Seaman, W. L., 1994. Diseases and Pests of Vegetable Crops in Canada. The Canadian Phytopathological Society and Entomological Society of Canada, Ottawa, ON, Canada.
20. Kannwischer, M. E., and Mitchell, D. J., 1981. Relationships of numbers of spores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* to infection and mortality of tobacco. Phytophthology, 71, PP: 69-73.
21. Katoh, K., and Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. Molecular Biology and Evolution, 30, PP: 772–780.
22. Katsura, K., 1968. *Phytophthora melonis* n. sp. of cucumber. Annals

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹ DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

of the Phytopathological Society of Japan, 34, PP: 167.

23. Khosrowfar, F., and Banihashemi, Z., 2004. Role of weeds on the survival of *Phytophthora drechsleri* the causal agent of cucurbit damping-off in Fars province. Iranian Journal of Plant Pathology, 40, PP: 105-126.
24. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35, PP: 1547–1549.
25. Kreutzer, W. A., 1937. A *Phytophthora* rot of cucumber fruit. Phytopathology, 27, PP: 955.
26. Martin, F. N., Blair, J. E., and Coffey, M. D. 2014. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*. Fungal Genetics and Biology, 66, PP: 19–32.
27. Moorman, G. W., Kang, S., Geiser, D. M., and Kim, S. H., 2002. Identification and Characterization of *Pythium* species associated with greenhouse floral crops in Pennsylvania. Plant Disese, 86, PP: 1127-1231.
28. Murray, M. G., and Thompson, W. F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8, PP: 4321-4325.
29. Rezaei, S., Abrinbana, M., and Ghosta, Y., 2021. Taxonomic and pathogenic characterization of *Phytopythium* species from West Azarbaijan, Iran, and description of two new species. Mycologia, 113(3), PP: 612–628.
30. Ristaino, J. B., and Duniway, J. M., 1989. Effect of pre-inoculation and post-inoculation water stress on the severity of *Phytophthora* root rot in processing tomato. Plant Disese, 73, PP:349-352.
31. Robideau, G. P., de Cock, A.W., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, H., Bala, K., Chitty, D. W. et al. 2011. DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. Molecular Ecology Resources, 11, PP: 1002–1011.
32. Rojas, J.A., Jacobs, J.L., Napieralski, S., Karaj, B., Bradley, C. A., Chase, T., et al., 2017. Oomycete species associated with

DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362 مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹

soybean seedlings in North America—part I: identification and pathogenicity char acterization. Phytopathology, 107, PP: 280–292.

33. Spies, C. F. J., Mazzola, M., and McLeod, A. 2011. Characterisation and detection of *Pythium* and *Phytophthora* species associated with grapevines in South Africa, European Journal of Plant Pathology, 131, PP: 103–119.
34. Trong-phu, N., 1996. Nitrogen and potassium effect on cucumber yield. ARC Training Report, Vietnam.
35. Yang, X., Tyler, B. M., and Hong, C. 2017. An expanded phylogeny for the genus *Phytophthora*. IMA Fungus, 8, PP: 355–384.
36. White, T. J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR protocols: a guide to the methods and applications. New York: Academic Press. p. 315–322.

مقاله پژوهشی، صفحات ۲۱۲-۲۲۹ DOI:10.22034/jpr.2024.8467.3362

Phytopythium babaiaharii causing root rot on greenhouse cucumber

.

Fariba Ghaderi*

Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Yasouj, Iran

*Corresponding Author Email: f.ghaderi@yu.ac.ir

Abstract

Root and crown rot is one of the most damaging diseases of cucumber in greenhouses. Cucumbers with root and crown rot and decline symptoms were collected from different greenhouses in Kohgiluyeh & Boyer-Ahmad province. Infected tissues of the root were cut into approximately 5-6 mm pieces, and cultured on a semi-selective medium, CMA-PARPH without extra treatments. Purification of isolates was performed using the single-zoospore technique on WA. Fungal isolates were identified based on morphological characteristics and molecular data of *cox1 gene* and ITS- rDNA region. According to the morphological and phylogenetic analysis, all isolates were recognized as *Phytopythium babaiaharii.* Pathogenicity tests were conducted using five isolates *P. babaiaharii* on Saman cultivar of cucumber under greenhouse conditions. Koch's postulates were completed and confirmed that *P. babaiahari* isolates were caused for were responsible for cucumber root and crown rots. To our knowledge, this is the first report that *P. babaiahari* associated with root rot of cucumber in Iran and in the world.

Keywords: Greenhouse cucumber, Kohgiluyeh & Boyer-Ahmad, coxI, ITS-rDNA.