

## شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی برخی عامل‌های شبه قارچی ایجادکننده بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه درختان بادام در استان‌های اصفهان و چهارمحال بختیاری

بهرام شریف‌نبی<sup>۱</sup>، فریبا قادری<sup>۲\*</sup> و ناهید جوادی<sup>۳</sup>

۱ و ۳. استاد و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۲. استادیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه یاسوج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۲۷ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۲۹)

### چکیده

بادام یکی از درختان میوه تیره Rosaceae است که در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری برای استفاده از دانه خوراکی آن نسبت به سایر درختان میوه هسته‌دار بیشتر کشت می‌شود. در این پژوهش، برخی از عامل‌های پوسیدگی ریشه و طوقه درختان بادام مورد بررسی قرار گرفتند. بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی ۵۳ جدایه *Phytophthora cactorum* (۱۹ جدایه) و *Phytophthora cryptogea* (۲۱ جدایه) و *Phytophthora litorale* (۱۳ جدایه) جداسازی و شناسایی شدند. به منظور تأیید مولکولی گونه‌های شناسایی شده، تعداد ۲۵ جدایه از بین ۵۳ جدایه کل به طور تصادفی جهت تعیین توالی، محصول حاصل از تکثیر ناحیه‌های ITS انتخاب شدند. همچنین از جفت آغازگرهای اختصاصی BPhycacR87RRG/ BPhycacL87FRG(F) و Cryp1(F)/Cryp2 (Cryp1(F) و Cryp2) برای شناسایی اختصاصی گونه‌ها استفاده شد. واکنش نهال‌های هشت‌ماهه رقم‌های بادام سنگی، ربیع، شاهرود ۱۲ و پایه GF<sub>677</sub> به سه جدایه *P. cactorum* (P1)، *P. cryptogea* (P32) و *P. litorale* (P41) در شرایط گلخانه نشان داد که گونه‌های *P. cactorum* و *P. cryptogea* و *P. litorale* به لحاظ بیماری‌زایی تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند. گونه‌های *P. litorale* و *P. cactorum* به ترتیب بیشترین و کمترین بیماری‌زایی را در مقابل همه رقم‌های بادام داشتند و رقم‌های سنگی و GF<sub>677</sub> به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را در برابر هر سه گونه از خود نشان دادند. برای پژوهش‌های فیلوژنتیکی، تعداد ۹ جدایه (سه جدایه از هر گونه *P. cactorum*، *P. cryptogea* و *P. litorale*) بر اساس توالی‌یابی ناحیه rDNA-ITS بررسی شدند. این پژوهش اولین گزارش از بیماری‌زایی *P. litorale* روی بادام در ایران است.

واژه‌های کلیدی: بیماری‌زایی، رده‌بندی، تبارزایی، *Phytophthora*، *Phytophthora*

## Morphological and molecular identification of some causal agents of root and crown rot diseases of almond in Isfahan and Chaharmahal and Bakhtiari provinces

Bahram Sharifnabi<sup>1</sup>, Fariba Ghaderi<sup>2\*</sup> and Nahid Javadi<sup>3</sup>

1, 3. Professor and Former M. Sc. Student, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Yasouj University, Iran

(Received: Jan. 17, 2018 - Accepted: Dec. 20, 2018)

### ABSTRACT

Almond (*Prunus amygdalus* L.) is a deciduous tree in the Rosaceae family and is grown mostly for its edible seed. It is one of the most popular nuts on a worldwide basis and widely grown in Iran in Isfahan and Chaharmahal and Bakhtiari provinces. Root and crown rot causal agents which are caused by several pathogens were studied. According to morphological characteristics, 53 isolates were identified as *Phytophthora litorale* (13 isolates), *Phytophthora cactorum* (19 isolates), and *P. cryptogea* (21 isolates). Out of 53 isolates, 25 isolates were selected for molecular studies. Specific primer pairs of BPhycacL87FRG (F)/BPhycacR87RRG and Cryp1(F)/Cryp2 were used to confirm morphological identification of species. The reaction of crown and root of 8-month-old almond cultivars Sangi, Rabee, Shahrood12 and GF<sub>677</sub> to virulent isolates of *P. cactorum*, *P. cryptogea*, and *P. litorale* was evaluated under greenhouse conditions. Comparison of pathogenicity means revealed that there are significant differences among *P. cactorum*, *P. cryptogea*, and *P. litorale* isolates. The results also showed that *P. litorale* was more aggressive than *P. cactorum*. On all tested almond cultivars, disease severity percentage showed that Sangi is the most susceptible cultivar and GF<sub>677</sub> showed the least susceptibility. In this study, phylogenetic relationships of some *Phytophthora* and *Phytophthora* species based on sequencing of the rDNA-ITS region is provided. This is the first report of isolation and pathogenicity of *Phytophthora litorale* from almond orchards in Iran.

**Keywords:** Pathogenicity, Phylogeny, *Phytophthora*, *Phytophthora*, Taxonomy.

\* Corresponding author E-mail: f.ghaderi@yu.ac.ir

### مقدمه

بادام *Prunus amygdalus* L. گیاهی از تیره Rosaceae است که در اکثر کشورهای آسیایی و ناحیه مدیترانه کشت می‌گردد و از قدیمی‌ترین درختان میوه است که امروزه بیشترین سهم از تولید خشکبار جهان را به خود اختصاص داده است (Grasselly & Duval, 1997). بر اساس آمار منتشرشده از سوی سازمان خواروبار جهانی، در سال ۲۰۱۲ ایران با تولید ۱۰۰۰۰۰ تن بادام و سطح زیر کشت ۷۰۰۰۰ هکتار دارای مقام چهارم در سطح جهان است. در سال ۱۳۹۰، عملکرد بادام آبی و دیم در استان اصفهان به ترتیب ۷۹۹ و ۱۹۸ کیلوگرم در هکتار و در استان چهارمحال و بختیاری عملکرد بادام آبی و دیم ۲۰۰۵ و ۴۴۲ کیلوگرم در هکتار بوده است (FAO, 2012).

تاکنون گونه‌های مختلفی از عامل‌های قارچی و شبه قارچی بیماری‌زای خاک زاد از درختان بادام جداسازی و شناسایی شده است. مهم‌ترین آن‌ها گونه‌هایی از *Phytophthora* است که یکی از مهم‌ترین عامل‌های بیماری‌های پوسیدگی طوقه و ریشه بادام به شمار می‌روند. بیش از یازده گونه فیتوفتورا از درختان میوه هسته‌دار در جهان گزارش شده است که از بین آن‌ها گونه *P. cactorum* اهمیت بیشتری دارد (Erwin & Ribeiro, 1996). پژوهش‌ها نشان می‌دهند که دو گونه *P. citricola* و *P. cactorum* عامل بیماری شانکر و پوسیدگی طوقه درختان بادام در کالیفرنیا هستند. همچنین مشخص شده که گونه *P. megasperma* معمولاً از درختان مبتلا به خشکیدگی که هنوز به مرحله باردهی نرسیده‌اند، جداسازی می‌شود (Brown & Viveros, 1998).

عارضه مرگ‌ومیر درختان بادام از برخی منطقه‌های ایران نیز گزارش شده است. Fatemi (1977) گونه‌هایی از فیتوفتورا در استان فارس و Banihashemi & Sartipi (2004) برخی گونه‌های فیتوفتورا از جمله *P. cactorum* را به‌عنوان عامل اصلی بیماری زوال هسته‌داران در استان فارس تعیین نمودند. در ایران تاکنون شش گونه فیتوفتورا شامل *P. cryptogea* از روی بادام و گلایی، *P. cactorum* از روی زردآلو، گیلاس، گردو و سیب، *P. citrophthora*

از روی بادام، زردآلو، گیلاس، گردو و سیب، *P. citricola* از روی بادام، گیلاس و گردو، *P. drechsleri* از روی هلو، *P. capsici* از روی گیلاس و هلو و *P. iranica* از روی هلو و بادام گزارش شده‌اند (Afzali & Khabbaz Jolfaii, 2004; Banihashemi, 1995; Ghaderi & Banihashemi, 2006; Zakii & Ershad, 1994). عکس‌العمل رقم‌های مختلف هسته‌دار به گونه *P. cactorum* توسط Banihashemi & Sartipi (2004) نشان داد که رقم بادام مامایی حساس‌ترین و ژنوتیپ زردآلوی هلندر مقاوم‌ترین پایه به بیمارگر مذکورند.

با توجه به این‌که شناسایی گونه‌های فیتوفتورا بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی مشکل و گاهی توأم با مشکلات فراوان است، در دهه‌های اخیر استفاده از ویژگی‌های مولکولی و آنالیز DNA در تشخیص گونه‌ها 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 رده‌بندی استفاده شوند (De Cock & Levesque, 2004; Ersek et al., 1994). در سال ۲۰۰۷ از آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی گونه *P. cryptogea* (Minerdi et al., 2007)، در سال ۲۰۰۸ از آغازگرهای عمومی برای تفکیک جنس *Phytophthora* از جنس *Pythium* (Schena et al., 2008) و در سال ۲۰۱۱ از آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی گونه *P. cactorum* استفاده شد (Li et al., 2011). همچنین برای شناسایی گونه‌های *Phytophthora* از زیر واحد بزرگ و کوچک ریبوزومی (LSU و SSU)، ناحیه‌های ITS-DNA و زیر واحد شماره یک سیتوکروم اکسیداز DNA میتوکندریایی استفاده شده است (Robideau et al., 2011).

در استان‌های چهارمحال بختیاری و اصفهان بادام از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و سطح زیر کشت نسبتاً وسیعی را به خود اختصاص می‌دهد. از طرفی مهم‌ترین عامل زوال و مرگ درختان بادام در این استان عامل‌های بیماری‌های خاکزاد هستند که در بین آن‌ها پوسیدگی‌های طوقه و ریشه اهمیت ویژه‌ای دارند. این در حالی است پژوهش‌های یکپارچه

### شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌ها

شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌ها پس از خالص‌سازی، با استفاده از کلیدهای موجود بر اساس برخی ویژگی‌ها نظیر ریخت‌شناسی اسپورانژیوم، تولید یا عدم تولید آسپور، شکل پرگنه، تورم ریشه، تولید یا عدم تولید کلامیدوسپور و دماهای رشد مورد بررسی قرار گرفت. جهت تشکیل مرحله‌های مختلف جنسی و غیرجنسی گونه‌های فیتوفتورا در آزمایشگاه از محیط‌های کشت‌های ویژه‌ای مانند محیط نیمه‌انتخابی آرد- ذرت- آگار (CMA-PARP)، محیط شاهدانه- آگار (HSA) و محیط عصاره ۸ سبزی- آگار (V8-Agar) استفاده شد (Erwin & Ribeiro, 1996; Ershad, 1992).

### ارزیابی مقاومت رقم‌های مختلف بادام در برابر

#### پوسیدگی طوقه و ریشه در شرایط گلخانه

از نهال‌های ۸ ماهه رقم‌های بادام سنگی، ربیع، شاهرود ۱۲ و پایه GF<sub>677</sub> که رایج در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری بودند برای مایه‌زنی استفاده شد. خاک اطراف هر نهال تا عمق سه سانتی‌متری کنار زده شد و ۱۰ گرم از زادمایه جدایه‌های *P. cryptogea* (P32)، *P. cactorum* (P1) و *P. litorale* (P41) در اطراف طوقه و ریشه اصلی هر نهال قرار داده شد. برای تهیه زادمایه قارچ، از محیط کشت عصاره شاهدانه ورمی‌کولیت استفاده شد (Ghaderi & Banihashemi, 2006). بر اساس این روش، ابتدا در کیسه‌های پلاستیکی مقاوم به دمای اتوکلاو، ۲۰۰ گرم ورمی‌کولیت ریخته شد و به آن ۱۲۰ میلی‌لیتر عصاره دانه شاهدانه (عصاره ۶۰ گرم دانه شاهدانه در لیتر) اضافه شد و به مدت یک ساعت در اتوکلاو استریل شد. دو تا سه روز بعد از آن، از پرگنه‌های قارچی که قبلاً روی محیط CMA رشد کرده بودند، هشت بلوک میسلومی به قطر شش میلی‌متر به کیسه‌های پلاستیکی اضافه شد. سپس کیسه‌های پلاستیکی به مدت چهار هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی قرار داده شدند. برای تعیین حضور فعال قارچ در خاک، از روش طعمه‌گذاری با برگ مرکبات استفاده شد (Banihashemi, 2004). گیاهان شاهد نیز با همین

رده‌بندی در خصوص شناسایی گونه یا گونه‌های عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه بادام در این استان‌ها انجام نشده است؛ بنابراین هدف از این پژوهش، شناسایی و تعیین پراکندگی برخی گونه‌های شبه‌قارچی عامل پوسیدگی طوقه و ریشه بادام در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری، ارزیابی عکس‌العمل برخی از رقم‌های بادام به عامل پوسیدگی طوقه و ریشه در شرایط گلخانه، شناسایی مولکولی و بررسی روابط فیلوژنتیکی تعدادی از گونه‌های فیتوفتورا بر اساس توالی یابی ناحیه rDNA-ITS است.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری

نمونه‌برداری در بهار و تابستان سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ از برخی باغ‌های مشکوک به آلودگی به پوسیدگی طوقه و ریشه در منطقه‌های مختلف استان‌های اصفهان (نجف‌آباد، همت‌آباد، حاجی‌آباد) و چهارمحال و بختیاری (شهرکرد- سامان- لردگان) انجام شد. نمونه‌ها شامل طوقه‌ها و ریشه‌های دارای علائم آلودگی پوسیدگی و خاک همراه آن‌ها بودند. اندام‌ها و خاک آلوده درون کیسه‌های نایلونی در صندوق حاوی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

#### جداسازی، خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها

بافت‌های آلوده روی محیط کشت نیمه‌انتخابی CMA-PARP (عصاره ۴۰ گرم دانه ذرت خردشده، ۲۰ میلی‌گرم آنتی‌بیوتیک‌های دلواسید حاوی ۵۰ درصد پیمارسین، ۲۵۰ میلی‌گرم آمپی‌سیلین، ۱۰ میلی‌گرم ریغامپیسین، ۱۰۰ میلی‌گرم پنتا کلرو نیترو بنزن، ۱۵ گرم آگار و یک لیتر آب مقطر) کشت داده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Kannwischer & Mitchell, 1981). همچنین برای جداسازی عامل‌های احتمالی بیماری از خاک‌های آلوده اطراف طوقه و ریشه دارای علائم پوسیدگی، از روش طعمه‌گذاری با برگ مرکبات استفاده شد (Banihashemi, 2004). خالص‌سازی پرگنه‌ها به روش نوک ریشه انجام شد.

برای اطمینان از صحت توالی‌های به‌دست‌آمده از هر نمونه، هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی Blast (Altschul *et al.*, 1997) با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) مقایسه شد و از نرم‌افزار Bioedit نیز به‌منظور اصلاح نوکلئوتیدی توالی‌های استفاده شد (Hall, 1999). برای پژوهش‌های فیلوژنتیکی، تعداد نه جدایه از ۲۵ جدایه که تنوع را نشان می‌دادند، به‌عنوان نماینده انتخاب شدند. همچنین تعدادی توالی از گونه‌های مختلف جنس *Phytophthora* از بانک ژن انتخاب شدند و گونه *Albugo candida* نیز به‌عنوان آرایه خارج از گروه (جدول ۲) انتخاب شد. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MAFFT v.7.043b هم‌ردیف‌سازی شدند (Kato & Standley, 2013). تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیکی با استفاده از روش فاصله (Distance method) انجام شد. ماتریس فاصله توالی‌های مرتب‌شده با روش پارامتر دو کیمورا (Kimura 2-parameter) محاسبه (Kimura, 1980) و درخت فیلوژنتیکی با استفاده از دو روش (Neighbor-joining) (NJ) (Saitou & Nei, 1987) و Maximum Parsimony (MP) با الگوریتم Neighbor-joining (Nei, 1973) Interchange algorithm و با استفاده از الگوی از پیش تعیین‌شده با نرم‌افزار MEGA 6.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ver. 4.0) رسم شد (Tamura *et al.*, 2007) برای اطمینان از ثبات شاخه‌های موجود در درخت فیلوژنتیکی مقدار اعتبارسنجی (Bootstarp) با ۱۰۰۰ تکرار با استفاده از این برنامه محاسبه شد. توالی‌های مربوط به جدایه‌های مختلف گونه‌های *Phytophthora* در بانک ژن (NCBI) ثبت شدند (جدول ۳).

## نتایج

### شناسایی گونه

بر اساس نمونه‌برداری‌هایی که در اواخر بهار تا اواسط پاییز سال‌های ۱۳۹۳-۱۳۹۴ در استان‌های اصفهان و چهارمحال بختیاری انجام گرفت. ۵۳ جدایه از شبه قارچ‌ها از باغ‌های بادام استان اصفهان و چهارمحال و بختیاری از خاک، طوقه و ریشه جداسازی شدند. بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیک جدایه‌های به‌دست‌آمده

روش، ولی ورمی‌کولیت حاوی عصاره شاهدانه مایه‌زنی شدند. در این آزمایش برای هر تیمار ۳ گلدان (هر گلدان حاوی ۴ نهال) در نظر گرفته شد. بعد از سه ماه، نهال‌ها به‌دقت از خاک خارج شده و بعد از شستشو در زیر شیر آب، درصد پیشروی قارچ روی طوقه در هر رقم تعیین شد. داده‌های این آزمایش در قالب یک طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی با نرم‌افزار SAS 9.1 و رویه ANOVA و مقایسه میانگین با استفاده از روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) تجزیه و تحلیل شدند.

### شناسایی مولکولی

#### استخراج DNA

به‌منظور تأیید مولکولی گونه‌های شناسایی‌شده، تعداد ۲۵ جدایه از بین ۵۳ جدایه به‌طور تصادفی انتخاب شدند و سپس استخراج DNA به روش موری و تامپسون انجام شد (Murray & Thompson, 1980). سپس از جفت آغازگرهای عمومی و اختصاصی برای شناسایی گونه‌های مختلف *Phytophthora* استفاده شد (جدول ۱). مخلوط واکنش PCR شامل هشت میکرولیتر آب دیونیزه استریل، سه میکرولیتر 10X PCR Buffer، پنج میلی‌مولار  $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر نوکلئوتید، ۲۰ پیکومول از هر آغازگر، یک واحد *Taq* DNA پلیمرز و سه میکرولیتر DNA با غلظت ۱۰ نانوگرم تهیه شد. برنامه حرارتی در PCR شامل یک چرخه واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۶ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۶ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگرها (جدول ۱) به ناحیه هدف به مدت ۴۵ ثانیه 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 هشت دقیقه انجام شد (Cooke *et al.*, 2000).

#### تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

در پژوهش حاضر جهت بررسی‌های فیلوژنتیکی، تعداد ۲۵ جدایه از بین ۵۳ جدایه کل انتخاب شدند و جهت تعیین توالی، محصول حاصل از تکثیر ناحیه‌های ITS به شرکت Macrogen Inc. کره جنوبی فرستاده شدند.

به سه گونه *P. cactorum* و *P. cryptogea* و *P. cryptogea* در استان چهارمحال و بختیاری و ۱۰ جدایه از گونه *Phytophythium litorale* تعلق داشتند. به طور کلی ۱۹ جدایه از گونه *P. cactorum*، ۱۱ جدایه از گونه *P. litorale* در استان اصفهان به دست آمد (جدول ۳).

جدول ۱. فهرست آغازگرهایی که در این پژوهش برای توالی یابی گونه‌های فیتوفتورا استفاده شده است

Table 1. List of primers used for the sequencing of *Phytophthora* spp.

Primer pair	Sequence (5' - 3')	Annealing Temp (°C)	Reference
Ph2 (F)	ATACTGTGGGGACGAAAGTC	51	Schena <i>et al.</i> , 2008
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC		
BPhycacL87FRG(F)	CTTCGGCCTGAGCTAGTAGCT	56	Schena <i>et al.</i> , 2008
BPhycacR87RRG	CAGTCGGTCCGAAAACCAG		
Cryp1(F)	CCTGGTGGCCGACAAGGTCC	51	Minerdi <i>et al.</i> , 2008
Cryp2 (R)	GTTGAGTTCGCGCCGTACC		

جدول ۲. مشخصات جدایه‌های مورد استفاده *Phytophthora* و *Phytophythium* در تجزیه و تحلیل‌های تبارزایی در این پژوهش

Table 2. Characteristics of *Phytophthora* and *Phytophythium* isolates used in phylogenetic analyses in this study

Infected organ	Location	No. of isolates	Species name	Isolates code
Crown	Chaharmahal and Bakhtiari	6	<i>Phytophthora cactorum</i>	1, 2, 3, 4, 5, 6
Root	Chaharmahal and Bakhtiari	4	<i>P. cactorum</i>	7, 8, 9, 10
Soil	Chaharmahal and Bakhtiari	9	<i>P. cactorum</i> ,	11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19
Crown	Chaharmahal and Bakhtiari	4	<i>P. cryptogea</i>	20, 21, 22, 23
Root	Chaharmahal and Bakhtiari	5	<i>P. cryptogea</i>	24, 25, 26, 27, 28
Soil	Chaharmahal and Bakhtiari	3	<i>P. cryptogea</i>	29, 30
Crown	Isfahan	4	<i>P. cryptogea</i>	31, 32, 33, 34, 35
Root	Isfahan	1	<i>P. cryptogea</i>	36
Soil	Isfahan	5	<i>P. cryptogea</i>	37, 38, 39, 40
Crown	Isfahan	5	<i>Phytophythium litorale</i>	41, 42, 43, 44, 45
Root	Isfahan	4	<i>Pp. litorale</i>	46, 47, 48, 49
Soil	Isfahan	4	<i>Pp. litorale</i>	50, 51, 52, 53

جدول ۳. منابعها و منطقه‌های جداسازی گونه‌های *Phytophthora* و *Phytophythium* از باغ‌های بادام

Table 3. Sources and locations of *Phytophthora* and *Phytophythium* spp. isolation from almond orchards

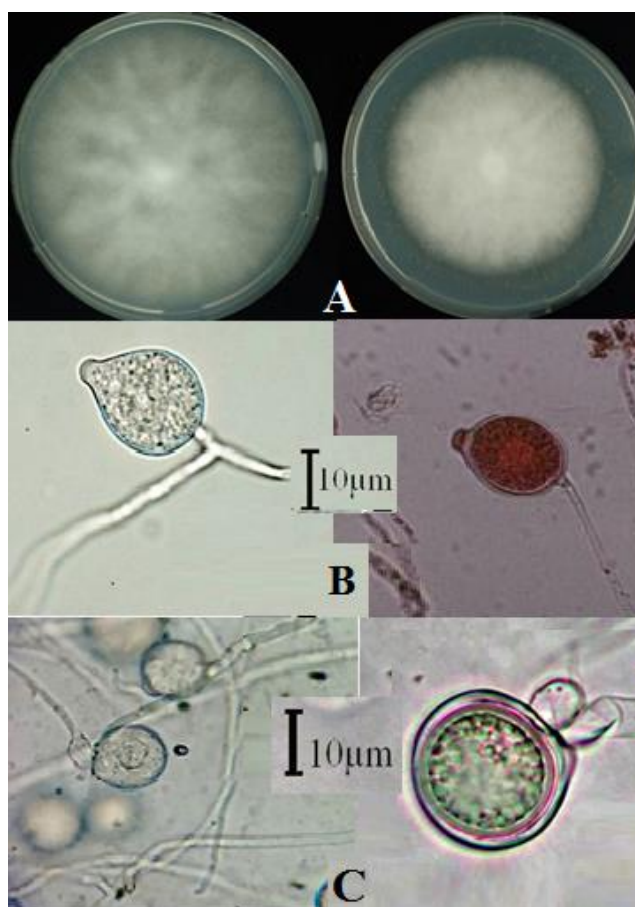
Species	Isolate	Source	GenBank accession No.
<i>Phytophythium litorale</i>	P1	In this study	MG712912
<i>Pp. litorale</i>	P2	In this study	MG71213
<i>Pp. litorale</i>	P3	In this study	MG71214
<i>Phytophthora cactorum</i>	P4	In this study	MG71215
<i>P. cactorum</i>	P5	In this study	MG71216
<i>P. cactorum</i>	P6	In this study	MG71217
<i>P. cryptogea</i>	P7	In this study	MG71220
<i>P. cryptogea</i>	P8	In this study	MG71219
<i>P. cryptogea</i>	P9	In this study	MG71218
<i>P. cactorum</i>	IBL	Nowakowska <i>et al.</i> , 2012	JX276091
<i>P. cactorum</i>	MP2	Orlikowski <i>et al.</i> , 2016	KY100041
<i>P. cactorum</i>	BR194	Robideau <i>et al.</i> , 2010	HQ643169
<i>P. cactorum</i>	KH2	Takeuchi, 2007	AB305066
<i>P. cryptogea</i>	ABD192	Puertolas <i>et al.</i> , 2017	MF115387
<i>P. cryptogea</i>	279	Scarlett <i>et al.</i> , 2014	KP070716
<i>P. cryptogea</i>	PAC 8	Gonzalez <i>et al.</i> , 2017	KX611693
<i>P. cryptogea</i>	ABD165	Puertolas <i>et al.</i> , 2017	MF115348
<i>P. cinnamomi</i>	1859	Guajardo <i>et al.</i> , 2016	KU961898
<i>P. cinnamomi</i>	TSFH4	Croeser <i>et al.</i> , 2016	FX120102
<i>P. cinnamomi</i>	QLD19	Burgess, 2016	KY212015
<i>P. cinnamomi</i>	P2159	Garbelotto <i>et al.</i> , 2003	AY302164
<i>P. cinnamomi</i>	NEO13	Scarlett <i>et al.</i> , 2014	KP183223
<i>P. cinnamomi</i>	CB5	Scarlett <i>et al.</i> , 2014	KP070683
<i>P. citricola</i>	P1815	Bezuidenhout <i>et al.</i> , 2010	GU191218
<i>P. citricola</i>	PLN	Hobden, 2004	AY833531
<i>P. citricola</i>	PLN	Vedenyapina <i>et al.</i> , 2014	KF963050
<i>P. citricola</i>	TARI 25	Ann <i>et al.</i> , 2009	GU111597
<i>P. citrophthora</i>	RH-04	Nowak <i>et al.</i> , 2013	KF682433
<i>P. citrophthora</i>	E4P4	Zouaoui <i>et al.</i> , 2016	KX269830
<i>P. citrophthora</i>	QP21	Milenkovic <i>et al.</i> , 2016	KX180144
<i>P. citrophthora</i>	WPC1085	Coffey <i>et al.</i> , 2009	GU258652
<i>P. citrophthora</i>	P0479	Zhang & Coffey, 2011	JN618686
<i>P. megasperma</i>	P88	Catal <i>et al.</i> , 2005	AY995402
<i>P. megasperma</i>	92-206M	Lefort <i>et al.</i> , 2007	EU000134
<i>P. megasperma</i>	250495	Pettersson, 2015	KT383054
<i>P. megasperma</i>	NIBIO	Pettersson, 2015	KT350499
<i>Phytophythium litorale</i>	DAOM229148	Robideau <i>et al.</i> , 2011	HQ643712
<i>Pp. litorale</i>	1857	Bouket <i>et al.</i> , 2016	KT290515
<i>Pp. litorale</i>	BR896	Robideau <i>et al.</i> , 2011	HQ643387
<i>Pp. litorale</i>	CNRPyLit16RA	Bouket <i>et al.</i> , 2016	KT290513
<i>Albugo candida</i>	SMK13747		Ay929835

## گونه اول

*Phytophthora cactorum* (Lebert and Cohn) J. Schrot. 1886. In Cohn, *krypt. -Fl. Schlesien(Breslau) 3-1(2):236(1886)*

پرگنه رشد نسبتاً سریع روی محیط کشت‌های آگاردار (PDA و CMA) دارد، صاف و یا کمی پرزدار، گرد با پیرامونی صاف، تقریباً بدون ساختار مشخص، شعله‌ای، شعاعی و یا گل‌سرخ نامنظم است. ریشه‌ها در محیط کشت یکنواخت و تقریباً ظریف و اغلب محتوی آن‌ها دانه‌دانه‌ای بود. انشعابات اکثراً با زاویه قائمه و شاخه‌های فرعی در محل انشعاب باریک شده و سپس بلافاصله کمی آماس مشاهده شد. عرض ریشه‌ها متغیر بود و به ۵/۵ میکرومتر می‌رسید. اسپورانژیوم‌ها روی محیط کشت‌های جامد و مایع به تعداد فراوان تشکیل شده و دارای شکل‌های منظم بیضوی، تخم‌مرغی، گلابی وارونه یا تقریباً کروی بودند. متوسط ابعاد آن‌ها

۲۷/۴۳×۲۳/۶۶ میکرومتر و دارای یک پاپیل بزرگ نیمه کروی بودند. اسپورانژیوم‌ها ریزان و طول دنباله آن‌ها به چهار میکرومتر می‌رسید. اسپورانژیوفورها ساده و یا به‌طور سمپودیال منشعب بوده و گاهی اوقات از اسپورانژیوم منشعب می‌شدند و در بیشتر مواقع، از ریشه‌های معمولی باریک‌تر بوده و گاهی به طرف اسپورانژیوم عریض‌تر می‌شدند. جدایه‌های این قارچ هموتال هستند. آنتریدیوم‌ها اغلب پاراجینوس و تقریباً کروی، بیضوی، گریزی شکل یا نامنظم و اکثراً در نزدیکی پایه آگونیوم با آن تماس حاصل می‌کردند و آگونیوم‌ها کروی یا به طرف پایه کمی کشیده بودند. آسپور کروی بود و تمام محفظه آگونیوم را پر نمی‌کرد و متوسط ابعاد آن ۳۳/۳۸ میکرومتر بود. دماهای کمینه، بهینه و بیشینه به ترتیب ۵، ۲۵ و ۳۲ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شدند (شکل ۱).



شکل ۱. A. *Phytophthora cactorum*: پرگنه روی محیط کشت CMA، B. اسپورانژیوم یک پاپیلی (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، C. آگونیوم و آنتریدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)

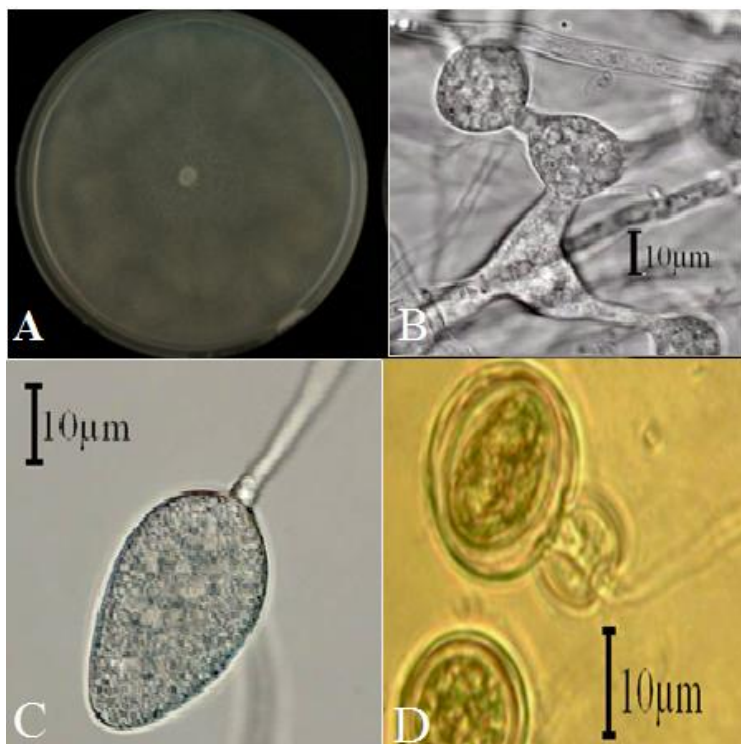
Figure 1. *Phytophthora cactorum*: A. Colony on CMA, B. Sporangium with an apical papilla (Bar = 10 µm), C. Oogonium and antheridium (Bar = 10 µm).

## گونه دوم

*Phytophthora cryptogea* Pethybr. & Laff.,  
Scientific Proc. R. Dublin Soc., N.S. 15: 498  
(1919)

پرگنه دارای رشد سریع روی محیط کشت‌های آگاردار (PDA و CMA)، یکنواخت و کمی کرک‌دار بوده و از پشت دایره‌ای با حاشیه صاف، شعاعی، گل‌سرخ و یا بدون ساختار مشخص دارد (شکل ۲). ریشه‌های جوان تقریباً یکنواخت بوده و بعدها نامنظم و عرضی غیریکنواخت پیدا کردند. شاخه‌های فرعی با زاویه حاده و گاهی قائمه منشعب می‌شوند. ریشه‌های هوایی یکنواخت‌تر بوده و انشعابات کم‌تری داشتند. عرض آن‌ها به‌طور متوسط ۵/۴ میکرومتر مشاهده شد. آماس ریشه فقط در محیط مایع مانند آب مقطر و به تعداد زیاد مشاهده شد. شکل آن‌ها کروی، بیضوی یا زاویه‌دار بود. اکثراً به‌صورت شبکه‌ای و گاهی زنجیروار به هم متصل بودند که بیشتر میانی و تعداد کمی هم انتهایی مشاهده شدند. اندازه آن‌ها به‌طور متوسط ۱۷/۸ میکرومتر اندازه‌گیری شد.

اسپورانژیوفورها ظریف و نازک‌تر از ریشه‌های با عرض یکنواختی بوده و گاهی به طرف اسپورانژیوم عرضی‌تر می‌شدند. اسپورانژیوم‌ها فقط در محیط کشت مایع به تعداد فراوان تشکیل شده و دارای شکل‌های بیضوی، تخم‌مرغی، گلابی وارونه، تقریباً استوانه‌ای یا غیرمنظم بودند. اسپورانژیوم‌ها در پایه گرد و به طرف اسپورانژیوفور باریک می‌شدند. اسپورانژیوم‌های بدون پاپیل و به‌ندرت رأس آن‌ها کمی ضخیم بوده و حالت پاپیل بسیار کوچک و مسطح را به خود گرفت. متوسط ابعاد اسپورانژیوم‌ها ۲۷×۴۲ میکرومتر بود. جدایه‌های این قارچ هتروتال هستند، آنتریدیوم‌ها همیشه آمفیژن و به شکل‌های بیضوی، تخم‌مرغی، کروی، استوانه‌ای بوده و ابعاد آن‌ها ۱۶×۱۸ میکرومتر اندازه‌گیری شد. آگونیوم‌ها کروی و قطر آن‌ها ۲۹ میکرومتر اندازه‌گیری شد. آسپورها کروی و بی‌رنگ و تقریباً تمام محفظه آگونیوم را پر می‌کنند. دماهای کمینه، بهینه و بیشینه به ترتیب ۲، ۲۵ و ۳۲/۵ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شدند (شکل ۲).



شکل ۲. *Phytophthora cryptogea*: A. پرگنه روی محیط کشت CMA. B. آماس میان ریشه‌ای (مقیاس = ۱۰ میکرومتر). C.

اسپورانژیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر). D. آگونیوم و آنتریدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Figure 2. *Phytophthora cryptogea*: A. Colony on CMA, B. Intercalary hyphal swelling (Bar = 10 µm), C. Sporangium (Bar = 10 µm), D. Oogonium and antheridium (Bar = 10 µm).

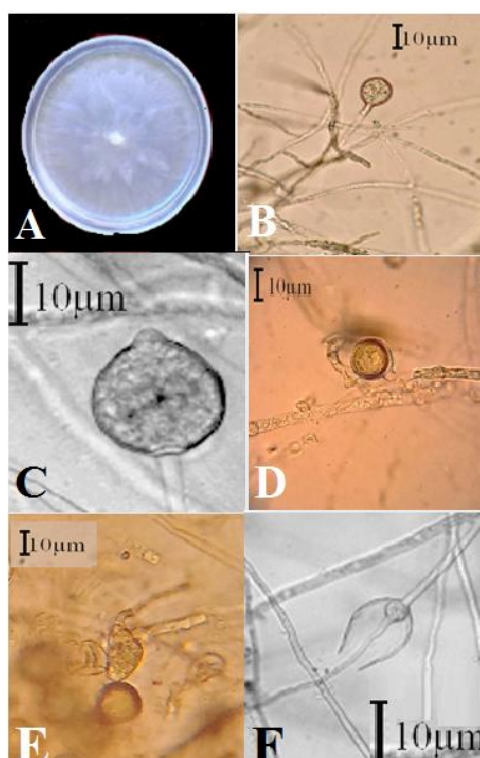


## گونه سوم

*Phytophthium litorale* (Nechw.) Abad, de Cock, Bala, Robideau, Lodhi & Lévesque, *Persoonia* 34: 37 (2014)

پرگنه تولید میسلیوم‌های هوایی پراکنده روی محیط کشت CMA نموده و میسلیوم‌هایی با الگوی پراکنده و به شکل گل روی محیط کشت PCA ایجاد می‌نماید. آماس ریشه‌ای به صورت گرد و انتهایی روی محیط کشت MEA تشکیل می‌شود و قطر آن‌ها به طور متوسط ۲۸/۸ میکرومتر اندازه‌گیری شد. اسپورانژیوم‌ها در محیط کشت HSA در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به تعداد زیاد تشکیل و تخم‌مرغی شکل بوده که در قاعده گرد و معمولاً با یک پاییل انتهایی مشخص هستند. اسپورانژیوم‌ها در ابتدا بدون پاییل بوده اما پس از بالغ شدن پاییل توسعه پیدا کرد و طول آن ۶ میکرومتر اندازه‌گیری شد. ابعاد اسپورانژیوم‌های ۲۸/۵×۲۶/۷ میکرومتر اندازه‌گیری شد. این قارچ هموتال است و تولید آگونیوم‌های کروی

با دیواره صاف انتهایی با میانگین اندازه ۱۸/۷ میکرومتر می‌کند. آنتریدیوم‌ها در این قارچ بلند و استوانه‌ای شکل بوده که یک ویژگی منحصر به فرد در جنس *Phytophthium* است. اسپورانژیوم‌ها پس از بالغ شدن چنانچه در شرایط مساعدی قرار بگیرند به طور مستقیم تندش کرده که در این صورت لوله یا لوله‌های تندش از جدار آن‌ها خارج شد. اما در اکثر اوقات به صورت غیرمستقیم و به عبارت دیگر با تولید زئوسپور تندش می‌یابند. پاییل توسعه یافت و لوله تخلیه ایجاد شد. از طریق لوله تخلیه به بیرون جریان می‌یابد و یک وزیکول پر شده از پلاسما در قسمت بالایی اسپورانژیوم تشکیل می‌شود. زئوسپورها به بیرون از اسپورانژیوم راه یافتند و درون وزیکول قرار گرفته و با پاره شدن غشای زئوسپورها آزاد شدند. پس از آزادسازی زئوسپورها، اسپورانژیوم‌های جدید با پرولیفراسیون میانی توسعه می‌یابد. دماهای کمینه، بهینه و بیشینه به ترتیب ۲، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس اندازه‌گیری شدند (شکل ۳).



شکل ۳. *Phytophthium litorale*: A. پرگنه روی محیط کشت CMA، B. آماس ریشه‌ای (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، C. اسپورانژیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، D. آگونیوم و آنتریدیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، E. لوله تخلیه در اسپورانژیوم (مقیاس = ۱۰ میکرومتر)، F. پرولیفراسیون میانی (مقیاس = ۱۰ میکرومتر).

Figure 3. *Phytophthium litorale*: A. Colony on CMA, B. Hyphal swelling (Bar = 10 μm), C. Sporangium (Bar = 10 μm), D. Oogonium and antheridium (Bar = 10 μm), E. Discharge tube (Bar = 10 μm), F. Internal proliferation (Bar = 10 μm).



## شناسایی مولکولی جدایه‌ها

جهت تأیید شناسایی گونه‌های بیماری‌زای پوسیدگی طوقه و ریشه بادام که بر اساس ویژگی‌های مورفولوژیکی به‌عنوان *P. cactorum*، *P. cryptogea* و *Pp. litorale* تشخیص داده شده بودند، از جفت آغازگر Ph2(F) و ITS4 استفاده شد. تمام جدایه‌های *Phytophthora* قطع‌های حدود ۷۰۰ جفت باز را تکثیر نمودند. لازم به ذکر است که جفت آغازگر Ph2(F) و ITS4 در جنس *Phytophythium* قطع‌های حدود ۸۰۰bp جفت باز را تکثیر نمود. تکثیر چنین قطع‌های با این جفت آغازگر در تمام جدایه‌های فیتوفتورا با یافته‌های پژوهشگران هم‌خوانی داشت (Schena et al., 2008; Minerdi et al., 2008). برای تأیید گونه شناسایی شده *P. cactorum*، تمام جدایه‌ها با جفت آغازگر اختصاصی BPhycacL87FRG(F) و BPhycacR87RRG مورد آزمون قرار گرفتند که ۱۹ جدایه قطع‌های حدود ۳۴۰ جفت باز را تکثیر نمودند که اختصاص به گونه *P. cactorum* داشتند که با یافته‌های Schena et al. (2008) هم‌خوانی داشت. برای تأیید گونه شناسایی شده *P. cryptogea* از جفت آغازگر اختصاصی Cryp1(F) و Cryp2 استفاده شد که ۲۱ جدایه از ۵۳ جدایه قطع‌های حدود ۳۶۹ جفت باز را تکثیر نمودند که اختصاص به گونه *P. cryptogea* داشتند که ایجاد چنین قطع‌هایی با یافته‌های Minerdi et al. (2008) هم‌خوانی داشت. Minerdi et al. (2008) جفت آغازگر اختصاصی Cryp1(F) و Cryp2 برای شناسایی مولکولی گونه *P. cryptogea* و اختصاصیت آغازگر طراحی شده روی ۱۷ میزبان مختلف استفاده کردند. در این پژوهش از این جفت آغازگر اختصاصی برای شناسایی گونه *P. cryptogea* روی درختان بادام در مقابل سایر گونه‌های بیماری‌زا استفاده شد.

## تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک

تعداد ۴۱ جدایه به‌عنوان نماینده برای پژوهش‌های مولکولی *Phytophythium* و *Phytophthora* انتخاب شدند (جدول ۲)؛ که از این میان تعداد نه جدایه به این پژوهش اختصاص داشتند. درخت فیلوژنتیکی

ترسیم‌شده با روش NJ بر اساس توالی ناحیه rDNA-ITS نشان می‌دهد که جنس‌های *Phytophthora* و *Phytophythium* مونوفیلتیک هستند؛ و نتیجه‌های مشابهی نیز با درخت فیلوژنتیکی رسم‌شده با روش Maximum Parsimony (MP) به‌دست آمد. در این پژوهش، طول توالی نوکلئوتیدی ناحیه rDNA-ITS توالی‌یابی شده در جدایه‌های مختلف گونه‌های *Phytophthora* (۷۰۰ جفت باز) و *Phytophythium* (۸۰۰ جفت باز) بود.

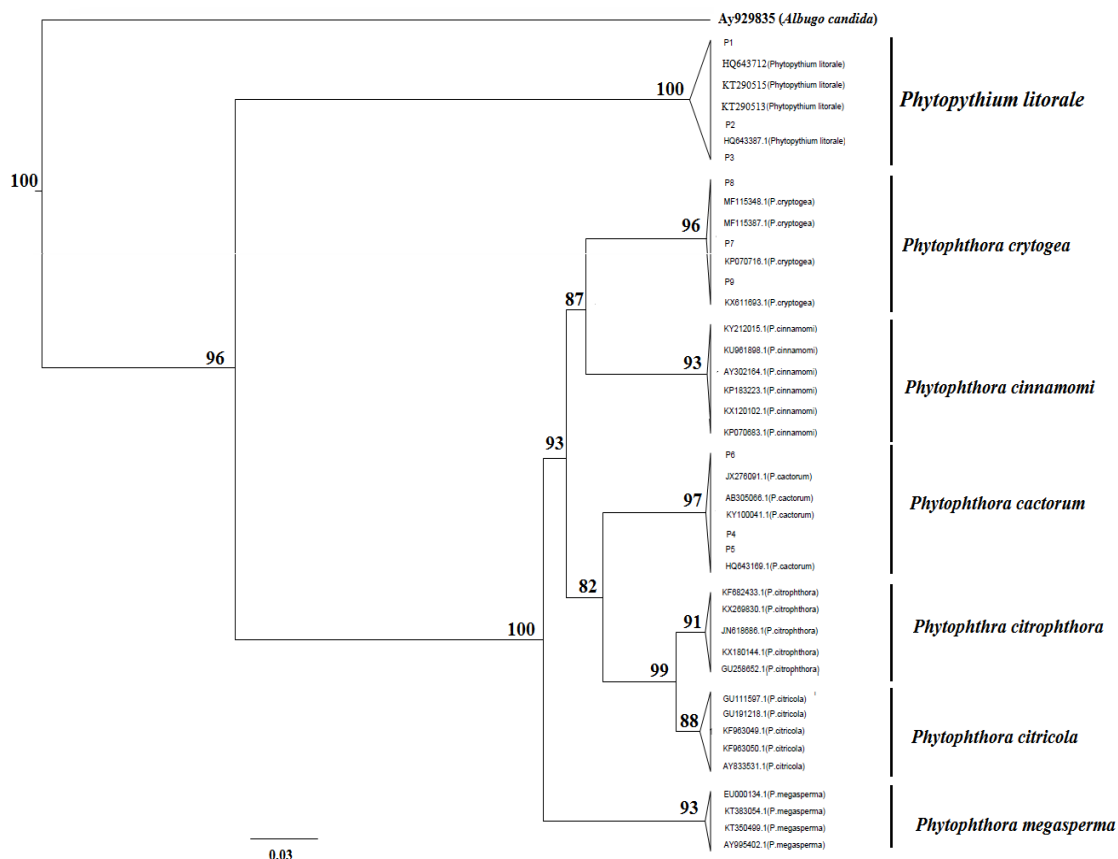
جدایه‌های موردبررسی در این پژوهش، بر اساس نتیجه‌های آنالیزهای فیلوژنتیکی، به سه کلاد *Phytophythium litorale*، *P. cactorum* و *P. crptogea* تعلق داشتند. با توجه به درخت NJ رسم شده، همه جدایه‌های توالی‌یابی شده کلاد *P. crptogea* بر اساس ناحیه rDNA-ITS با اندازه اعتبارسنجی ۹۶ درصد با گونه *P. crptogea* گروه‌بندی شدند و تشکیل یک گروه مونوفیلتیک را می‌دهند (شکل ۴) و میزان شباهت توالی نوکلئوتیدی بین جدایه‌های موردبررسی در این پژوهش بیش از ۹۹ درصد بود. در واقع، بزرگ‌ترین گروه در این پژوهش به *P. crptogea* تعلق داشت. جدایه‌های توالی‌یابی شده کلاد *P. cactorum* با مقدار اعتبارسنجی ۹۷ درصد با گونه *P. cactorum* (که توالی‌های آن از بانک ژن NCBI استخراج شده بودند) گروه‌بندی شد. این کلاد دومین گروه در این پژوهش را به خود اختصاص داد (شکل ۴). جدایه‌های توالی‌یابی شده کلاد *Phytophythium litorale* با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه شدند (de Cock et al., 2015) و مشخص شد که با گونه *Phytophythium litorale* با اندازه اعتبارسنجی ۱۰۰ درصد گروه‌بندی می‌شود (شکل ۴).

بررسی مقاومت رقم‌های مختلف بادام به بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه در شرایط گلخانه

جدایه‌های P1، P32 و P41 به ترتیب متعلق به گونه‌های *P. cactorum*، *P. cryptogea* و *P. litorale* (جدول ۳) برای بررسی مقاومت رقم‌های بادام سنگی، ربیع، شاهرود ۱۲ و پایه GF<sub>677</sub> استفاده شدند. نتیجه‌های به‌دست‌آمده از تجزیه واریانس نشان داد که

داشتند (جدول ۴)؛ یعنی بین گونه‌های مختلف قارچ از لحاظ ایجاد بیماری‌زایی و بین رقم‌های مختلف بادام از لحاظ میزان مقاومت، تفاوت وجود دارد.

اثر گونه‌های شبه قارچی بر چهار رقم مختلف بادام، اثر میزبان بر بیماری‌زایی و برهمکنش بیمارگر و میزبان در سطح احتمال ۱ درصد باهم تفاوت معنی‌داری



شکل ۴. درخت تبارزایی ترسیم‌شده بر پایه بخش‌های rDNA-ITS ۴۱ آرایه *Phytophthora* و *Phytophythium* با روش NJ (Neighbor-Joining). اعداد بالای هر شاخه نشان‌دهنده مقدار bootstrap از ۱۰۰۰ تکرار است (طول شاخه‌ها شمار جایگزینی نوکلئوتیدی، به‌وسیله خط مقیاس پایین تبار نشان داده شده است). گونه *Albugo candida* به‌عنوان برون گروه گزینش شده است (شماره دسترسی جدایه‌هایی که از بانک ژن دریافت شده‌اند در کمانک نمایش داده شده است).

Figure 4. A phylogenetic tree of 41 taxa of *Phytophthora* and *Phytophythium* inferred from rDNA-ITS. Bootstrap values > 50% (1000 replicates) of NJ analysis are shown above the branches (Bar indicates the nucleotide substitution in NJ analysis). *Albugo candida* is the outgroup (Accession numbers from Gene Bank are shown in parenthesis).

جدول ۴. تجزیه واریانس شدت بیماری‌زایی مربوط به گونه‌های *Phytophthora cactorum*، *Phytophthora cryptogea* و *Phytophythium litorale* روی رقم‌های بادام در گلخانه

Table 4. Analysis of variance of disease intensity for *Phytophthora cactorum*، *Phytophthora cryptogea*، and *Phytophythium litorale* on almond cultivars

Source of variation	df	Mean square
Isolate	2	799057.722**
Genotype	3	1111637.827**
Isolate× Genotype	6	292883.409**
Error	24	4257.126
Total	35	
CV%	-	13.67%
R <sup>2</sup> %	-	0.98%

\*\* : Significant at 1% of probability level.

\*\* : معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

### بحث

در این پژوهش فقط گونه‌های *P. cactorum*، *P. cryptogea* و *Pp. litorale* از طوقه، ریشه و خاک جدا شدند ولی احتمال دارد به جز این گونه‌ها، گونه‌های دیگری نیز در باغ‌های بادام وجود داشته باشند که جدا نشده‌اند. جداسازی گونه‌ها در خردادماه و اواسط تا اواخر تابستان سال‌های ۱۳۹۴-۱۳۹۳ از طوقه، ریشه و خاک انجام شد، اما در نمونه‌برداری‌هایی که در اوایل تابستان و پاییز همان سال انجام گرفت، گونه‌های عامل بیماری جدا نشد. به همین دلیل، انتخاب فصل و زمان جداسازی اهمیت زیادی دارد. همچنین، استفاده از محیط کشت نیمه‌انتخابی و روش مورد استفاده نیز در امر جداسازی دارای اهمیت است (Haygood et al., 1986; Wicks & Lee, 1986). در این پژوهش پراکنش عامل‌های پوسیدگی طوقه و ریشه بادام در استان‌های اصفهان و چهارمحال و بختیاری نشان داد که این گونه‌های شبه قارچ (*Phytophthora* و *Phytophthium*) از اهمیت زیادی برخوردار است، به طوری که از اکثر باغ‌ها بادام جداسازی شد. با توجه به ویژگی‌های مرفولوژیکی جدایه‌ها مشخص شد که سه گونه از این جنس در زوال و مرگ درختان بادام در استان‌های چهارمحال و بختیاری و اصفهان نقش دارند که دو گونه *P. cactorum* و *P. cryptogea* در هر دو استان اما گونه *Pp. litorale* فقط از استان اصفهان جداسازی و شناسایی شد. به طور کلی شیوه آبیاری در این منطقه‌ها بیشتر از نوع آبیاری غرقابی است و به نظر می‌رسد آب رودخانه در انتشار اندام‌های تکثیری قارچ، آلودگی و همه‌گیری بیماری نقش مهمی داشته باشد؛ زیرا پژوهش‌های Sahragard & Banihashmi (2006) نشان داد که در حاشیه زاینده‌رود از طرف سد زاینده‌رود به سمت شرق (مسیر رودخانه) میزان جداسازی قارچ *P. cactorum* افزایش می‌یابد. با توجه به اینکه در منطقه امامیه آبیاری از نوع آبیاری قطره‌ای است احتمالاً پوسیدگی فیتوفترایی طوقه در این منطقه ناشی از زیر خاک کردن طوقه و ایجاد تشک پای درخت باشد. این نتیجه‌ها با یافته‌های Wicks & Lee (1989) تا حدودی هم‌خوانی دارد. آن‌ها تفاوت در

مقایسه میانگین پیشروی علائم بیماری روی طوقه حاصل از عکس‌العمل بیمارگر-میزبان رقم‌های بادام مختلف در مقابل جدایه‌های *P. cactorum*، *P. cryptogea* و *Pp. litorale* در گلخانه نشان داد که رقم‌های مختلف و جدایه‌های قارچی از نظر عکس‌العمل اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد با یکدیگر دارند (جدول ۵). مقایسه میانگین پیشرفت بیماری نشان داد که گونه‌های *P. cactorum* و *P. cryptogea* و *Pp. litorale* به لحاظ ایجاد بیماری‌زایی روی رقم‌های مختلف بادام اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشته و بیشترین درصد پیشرفت بیماری مربوط به جدایه *Pp. litorale* از استان اصفهان است در حالی که گونه *P. cactorum* کمترین تهاجم را در بین گونه‌ها داشت. همچنین مقایسه میانگین میزان آلودگی در رقم‌های مختلف بادام نشان داد که رقم‌های مختلف بادام به لحاظ حساسیت برابر بیمارگر اختلاف معنی‌داری دارند که رقم سنگی و پایه GF<sub>677</sub> به ترتیب کمترین و بیشترین حساسیت را در برابر هر سه گونه قارچی *P. cactorum*، *P. cryptogea* و *Pp. litorale* نشان دادند.

جدول ۵. هم‌سنجی میانگین پیشروی نشانه‌های بیماری روی طوقه بادام مربوط به گونه‌های *Phytophthora cactorum*، *Phytophthora cryptogea* و *Phytophthium litorale* روی رقم‌های بادام در شرایط گلخانه

Table 5. Rate of necrosis on almond crown (mm) in relation to *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cryptogea*, and *Phytophthium litorale* isolates on almond cultivars under greenhouse conditions

Host×Pathogen	Rates of necrosis on crown (mm)
( <i>P. cactorum</i> ×Sangi)	137.6i
( <i>P. cactorum</i> × Rabee)	208.5g
( <i>P. cactorum</i> × Shahrood12)	295.8f
( <i>P. cactorum</i> × GF <sub>677</sub> )	896.4d
( <i>P. cryptogea</i> ×Sangi)	140.1i
( <i>P. cryptogea</i> × Rabee)	223.2g
( <i>P. cryptogea</i> × Shahrood12)	289.1f
( <i>P. cryptogea</i> × GF <sub>677</sub> )	1002.1c
( <i>Pp. litorale</i> ×Sangi)	194.8h
( <i>Pp. litorale</i> × Rabee)	397.7e
( <i>Pp. litorale</i> × Shahrood12)	1291.9b
( <i>Pp. litorale</i> × GF <sub>677</sub> )	1308/7a

حرف‌های مشترک در سطح احتمال ۱ درصد تفاوت معنی‌داری ندارند. Similar letters non-significant differences at 1% of probability levels.

GF<sub>677</sub> بیشترین حساسیت را در برابر هر سه گونه قارچی *P. cactorum*، *P. cryptogea* و *Pp. litorale* از خود نشان دادند؛ بنابراین استفاده از دو پایه GF<sub>677</sub> و Shahrood12 در باغ‌هایی که احتمال آلودگی به این سه گونه فیتوفتورا وجود دارد پیشنهاد نمی‌شود زیرا ممکن است که گیاهان در شرایط تنش غرقابی به عامل بیماری حساس‌تر شوند. به‌طور کلی باید از کشت عمیق تمام پایه‌ها و زیر خاک کردن طوقه جلوگیری شود، همچنین از برخورد مستقیم آب آبیاری با طوقه درخت پرهیز گردد و از سامانه آبیاری قطره‌ای استفاده شود تا از پراکنش عامل بیماری جلوگیری شود.

گونه‌های مختلف جنس *Phytophthora* دارای توان ساپروفیتی و رقابتی کم بوده و در غیاب میزبان و وجود آنتاگونیست‌ها و تداخل میکروفلوورهای ثانویه که رشد سریع دارند، جمعیت آن‌ها در خاک و بافت‌های پوسیده و خشک به شدت کاهش می‌یابد از این‌رو، برای جداسازی آن‌ها از بافت‌های آلوده، آب و خاک از روش طعمه‌گذاری بافت‌های حساس و محیط کشت نیمه انتخابی استفاده شد (Erwin & Ribeiro, 1996). این محیط‌ها علاوه بر *Phytophthora* به *Pythium* نیز اجازه رشد می‌دهند. ولی با قرار دادن بافت‌ها در دمای ۲۰ درجه سلسیوس و یا کمی پایین‌تر همان‌طور که تعدادی از پژوهشگران (Haygood et al., 1986) اشاره کرده‌اند، می‌توان تاندازه‌ای این مشکل را برطرف کرد و باعث بازیافت بهتر گونه‌های *Phytophthora* شد. لازم به ذکر است با توجه به اینکه هیمکسازول دارای اثر بازدارندگی روی *P. cactorum* است، از به‌کارگیری قارچ‌کش فوق در محیط کشت خودداری شد (Hansen et al., 1979).

شستشوی بافت‌های آلوده (پوست و چوب سطحی) با آب به مدت چند ساعت باعث حذف باکتری‌ها و مواد بازدارنده (صمغ و مواد فنولی) و بازیافت بهتر گونه‌های *Phytophthora* شد. حذف آب قطعات شستشو داده‌شده باعث کاهش جمعیت باکتری‌ها که در آب آزاد جمعیت آن‌ها سریعاً بالا رفته و نسبت به گونه‌های *Phytophthora* بازدارنده هستند، شد (Weste, 1983). جداسازی گونه‌ها از بافت پوست که میسلیوم‌های زنده در آن‌ها وجود دارد به راحتی

فراوانی قارچ‌ها را در ارتباط با دمای محیط خاک، هوا و قدرت سازگاری آن‌ها با محیط دانستند.

پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از گونه‌های فیتوفتورا از مهم‌ترین بیماری‌های خاکزاد در دنیا است که سالیانه باعث مرگ‌ومیر تعداد زیادی از درختان می‌شود. چندین گونه فیتوفتورا در دنیا به‌عنوان عامل پوسیدگی طوقه و ریشه هسته‌داران گزارش شده است که از بین آن‌ها گونه *P. cactorum* اهمیت بیشتری دارد (Erwin & Ribeiro, 1996). در ایران نیز شش گونه فیتوفتورا *P. cryptogea*، *P. cactorum*، *P. drechsleri*، *P. citricola*، *P. citrophthora* و *P. capsici* از روی درختان هسته‌دار معرفی شده‌اند که گونه *P. cactorum* شدت بیماری‌زایی بیشتری نسبت به سایر گونه‌ها داشته و از اهمیت بیشتری برخوردار است (Afzali & Khabbaz & Jolfai, 2004; Banihashemi, 1995; Ghaderi & Banihashemi, 2006; Zakii & Ershad, 1994).

در پژوهشی که (Banihashemi & Sartipi, 2004) روی نهال‌های شش‌ماهه رقم‌های مختلف بادام در استان فارس انجام دادند، رقم‌های مامائی و تلخه را به ترتیب حساس‌ترین و مقاوم‌ترین به گونه *P. cactorum* گزارش نمودند. سپس (Sahragard & Banihashmi, 2006) گونه *P. cactorum* را تنها عامل پوسیدگی طوقه و ریشه درختان بادام در استان چهارمحال و بختیاری ذکر کرده و رقم‌های تلخه شوراب، تلخه صادق‌آباد، تلخه امامیه و تلخه پوست نازک هوره را به‌عنوان رقم‌های مقاوم و رقم‌های بادام‌کوهی، مامائی، سفید، آذر، شاهرود ۱۷ را به‌عنوان رقم‌های حساس به گونه *P. cactorum* معرفی نمودند، اما در این پژوهش از درختان بادام دارای پوسیدگی طوقه و ریشه، دو گونه *P. cactorum* و *P. cryptogea* از استان‌های چهارمحال و بختیاری و اصفهان و گونه *Pp. litorale* از استان اصفهان جداسازی و شناسایی شدند و گونه *Pp. litorale* دارای شدت بیماری‌زایی و اهمیت بیشتری نسبت به دو گونه *P. cactorum* و *P. cryptogea* بود. نتیجه‌های این پژوهش روی رقم‌های بادام سنگی، ربیع، شاهرود ۱۲ و پایه GF<sub>677</sub> نشان دادند که رقم سنگی کمترین حساسیت و پایه‌های Shahrood12 و

مورد توجه است. در نهایت با توجه به نتیجه‌های این پژوهش، ردیابی گونه‌های فیتوفتورا از بافت آلوده بادام به‌طور مستقیم امکان‌پذیر بود؛ بنابراین آزمایش PCR با جفت آغازگر اختصاصی BPhycacL87FRG(F) و BPhycacR87RRG و جفت آغازگر اختصاصی Cryp1(F) و Cryp2 ابزارهای مفیدی برای شناسایی و ردیابی به ترتیب گونه‌های *Phytophthora cactorum* و *Phytophthora cryptogea* هستند که این امر در مدیریت مؤثر بیمارگر در منطقه‌های مشکوک به پوسیدگی ریشه و طوقه می‌تواند نقش بسزایی داشته باشد.

نتیجه‌های این پژوهش با بررسی‌های De Cock (2015) که پژوهش‌های خود را بر اساس آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از توالی ژن‌های زیر واحد بزرگ و کوچک ریبوزومی (LSU, SSU)، ناحیه‌های ITS-DNA و زیر واحد شماره یک سیتوکروم اکسیداز DNA میتوکندریایی در سطح جهانی انجام داده بودند نیز همسو بودند. در میان سه کلاد شناسایی شده در این پژوهش، کلاد *Phytophthora litorale* برای اولین بار از باغ‌های بادام در ایران جداسازی و شناسایی می‌شود. البته، لازم به ذکر است که بیشتر گونه‌های *Phytophthora* ساپروفیت‌های آب و خاک در محیط‌های مختلف هستند، هرچند که گونه‌های بیماری‌زای گیاهی مانند *Pp. litorale* عامل گیاهچه‌میری و پوسیدگی میوه کدو و *Pp. helicoides* عامل پوسیدگی ریشه و ساقه بگونیا و *Pp. vexans* عامل پوسیدگی ریشه نیز گزارش شده‌اند. بادام به‌عنوان میزبان جدید برای *Pp. litorale* معرفی می‌شود. این شبه قارچ قبلاً از ایران فقط از ریزوسفر گیاه *Juncus spp.* از میانه زنجار گزارش شده است (Bouket et al., 2016).

#### نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش ۵۳ جدایه شبه قارچی از ریشه، طوقه و خاک از باغ‌های بادام استان اصفهان و چهارمحال و بختیاری جداسازی شدند. با بررسی ویژگی‌های مورفولوژیکی جدایه‌ها، سه گونه *Phytophthora*

صورت می‌گیرد، ولی چنانچه بافت پوسیده و خشک باشد، جداسازی قارچ مشکل است.

در این پژوهش، از روش زخمی کردن طوقه استفاده نشد چون زخمی کردن طوقه باعث حساس شدن گیاه می‌شود و ممکن است میزبانی که در مایه‌زنی مصنوعی (زخمی نمودن طوقه) حساس باشد، در طبیعت مقاومت مزرعه‌ای داشته باشد. همچنین، ممکن است حساسیت قسمت مایه‌زنی شده با قسمت‌های پایین‌تر متفاوت باشد (Tuzcu et al., 1984). به‌طور کلی زخمی کردن ممکن است اثرات متفاوتی در امر مقاومت داشته باشد. چون واکنش دفاعی گیاهان و سرعت تولید مواد بیوشیمیایی پس از زخمی شدن گیاهان مختلف متفاوت است (El-Hamalawi & Menge, 1994).

هنگام ردیابی بیمارگر هدف از بافت آلوده، طیف وسیعی از قارچ‌های دیگر نیز جداسازی می‌شوند انتخاب آغازگرهایی که دارای اختصاصیت بالایی باشند و تنها توانا به ردیابی گونه مورد نظر باشند از اهمیت بالایی برخوردار است، از این رو اختصاصیت برای ردیابی گونه‌های *P. cactorum* و *P. cryptogea* ضروری است. جفت آغازگر BPhycacR87RRG و BPhycacL87FRG(F) و جفت آغازگر Cryp1(F) و Cryp2 توانا به تکثیر قطعه DNA به ترتیب به اندازه ۳۴۰ جفت بازی در تمام جدایه‌های گونه *P. cactorum* و ۳۶۹ جفت بازی در تمام جدایه‌های گونه *P. cryptogea* بودند. این در حالی است که این آغازگرها هیچ باند DNA را در گونه‌های دیگر فیتوفتورا و قارچ‌های دیگر (عامل‌های ایجادکننده بوته‌میری و پژمردگی) تکثیر نکردند. با توجه به نتیجه‌های به‌دست‌آمده آغازگرها دارای اختصاصیت بالایی برای ردیابی و تشخیص *P. cactorum* و *P. cryptogea* هستند.

بالا بودن حساسیت آغازگر، سبب ردیابی بیمارگر پیش از پیدایش علائم می‌شود، با توجه به بالا بودن قدرت بیماری‌زایی و خسارت فیتوفتورا، شناسایی عامل بیماری قبل از ظهور علائم بسیار مهم است. غالباً باغداران زمانی متوجه حضور بیمارگر می‌گردند که این قارچ عمده خسارت خود را وارد نموده است. به همین دلیل معرفی روشی با حساسیت بالا بسیار

داد که گونه‌های *P. cactorum* و *Pp. litorale* به ترتیب بیشترین و کمترین تهاجم را در بین گونه‌ها داشتند و رقم‌های سنگی و GF<sub>677</sub> به ترتیب بیشترین و کمترین حساسیت را در برابر سه گونه شبه قارچی از خود نشان دادند. این پژوهش اولین گزارش از بیماری‌زایی *Pp. litorale* روی بادام در ایران است. همچنین جدایه‌های مورد بررسی در این پژوهش، بر اساس نتیجه‌های آنالیزهای فیلوژنتیکی، به سه کلاد *P. cactorum*، *P. crptogea* و *Pp. litorale* تعلق داشتند.

*Phytophythium litorale* و *P. cryptogea cactorum* شناسایی شدند. گونه *P. cryptogea* با ۲۱ جدایه به‌عنوان گونه غالب شناخته شد و گونه *Pp. litorale* برای اولین بار به‌عنوان بیمارگر عامل پوسیدگی ریشه و طوقه از باغ‌های بادام در ایران جداسازی و شناسایی شد. شناسایی مولکولی به‌منظور تأیید گونه‌های شناسایی‌شده مورفولوژیکی، با استفاده از جفت آغازگرهای BPhycacR87RRG/ BPhycacL87FRG(F) و Cryp2 /Cryp1(F) انجام پذیرفت. واکنش رقم‌های مختلف بادام به عامل بیماری در شرایط گلخانه نشان

## REFERENCES

1. Afzali, H. & Khabbazjolfai, H. (2004). *Phytophthora iranica* a new causal agent of almond trees death in Tehran province In: Proceedings of the 16<sup>th</sup> Iranian Plant Protection Congress, 28 August-1 September, Tabriz, Iran, pp. 397.
2. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J. & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402.
3. Banihashemi, Z. (1995). Role of *Phytophthora cactorum* on decline of fruit and nut trees in Fars province. In: Proceedings of the 12<sup>th</sup> Iranian plant protection congress, 21-26 August, Karaj, Iran, pp. 224.
4. Fatemi, G. (1977). Almond decline in Fars province and it's relation with the *Phytophthora* Fungus species. In: Proceedings of 6<sup>th</sup> Iranian plant protection congress, 12-14 September, Karaj, Iran, pp. 34.
5. Banihashemi, Z. & Sartipi, A. (2004). Identification of *Phytophthora* species associated with stone fruits crown rot in Fars province and reaction of certain rootstock to *P. cactorum*. *Journal of Sciences and Technology of Agriculture and Natural Resources*, 8, 241-249
6. Banihashemi, Z. (2004). A method to monitor the activity of *Phytophthora* spp. in the root zone of *Pistacia* spp. *Phytopathologia Mediterranea*, 43, 411-414.
7. Bouket, A. C., Babai-Ahari, A., Arzanlou, M. & Tojo, M. (2016). Morphological and molecular characterization of *Phytophythium litorale* and *Pp. oedochilum* from Iran. *Nova Hedwigia*, 102, 257-270.
8. De Cock, A. W. A. M. & Levesque, C. A. (2004). New species of *Pythium* and *Phytophthora*. *Studies in Mycology*, 50, 481-487.
9. De Cock, A. W. A. M., Lodhi, A. M., Rintoul, T. L., Bala, K., Robideau, G. P., Abad, Z. G., Coffey, M. D., Shahzad, S. & Levesque, C. A. (2015). *Phytophythium*: Molecular phylogeny and systematics. *Persoonia*, 34, 25-39.
10. El-Hamalawi, Z. A. & Menge, J. A. (1994). Effect of wound, age and fungicide treatment of wound on susceptibility of stems to infection by *Phytophthora citricola*. *Plant Disease*, 78, 700-704.
11. Ershad, D. (1992). *Phytophthora species in Iran (Isolation, Purification, Identification)*. Agriculture Research Organization. 215pp.
12. Ersek, T., Schoelz, J. E. & English, J. T. (1994). PCR Amplification of species-specific DNA sequences can distinguish among *Phytophthora* species. *Applied Environmental Microbiology*, 60, 2616-2621.
13. Erwin, D. C. & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora: Diseases worldwide*. APS Press. St. Paul, Minn. 562p.
14. Food and Agriculture Organization. (2012). *Biodiversity: Agricultural biodiversity in FAO*. Retrieved January 12, 2009. From <http://www.fao.org/biodiversity>.
15. Ghaderi, F. & Banihashemi, Z. (2006). Distribution and relative importance of *Phytophthora* species isolated from declining walnut tree in Fars, Kerman, and Kohgilueh and Boyer-Ahmad provinces and reaction of walnut genotype to them. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 43, 163-183. (in Farsi)
16. Grasselly, C. & Duval, H. (1997). *L aimandier: Centre technique interprofessionnel des fruits et legumes (Ctifl)*, 167 pp.
17. Hall, T. A. (1999). BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

18. Hansen, E. M., Hamm, P. B., Julis, A. J. & Roth, L. F. (1979). Isolation, incidence and management of *Phytophthora* in forest tree nurseries in the Pacific Northwest. *Plant Disease Report*, 63, 607-611.
19. Haygood, R. A., Graves, C. H. & Riding, W. H. (1986). *Phytophthora* root rot and stem canker of peach trees in Mississippi. *Plant Disease*, 70, 866-868.
20. Kannwischer, M. E. & Mitchell, D. J. (1981). Relationships of numbers of spores of *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* to infection and mortality of tobacco. *Phytopathology*, 71, 69-73.
21. Katoh, K. & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software. Version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 772-780.
22. Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
23. Li, M., Asano, T., Suga, H. & Kageyama, K. (2011). A multiplex PCR for the detection of *Phytophthora nicotianae* and *Phytophthora cactorum*. *Plant Disease*, 95, 1270-1278.
24. Minerdi, D., Yuan, L., Garibaldi, A., Lodovica, M., Moretti, M. & Gaggero, L. (2007). Conventional PCR and Real time quantitative PCR detection of *Phytophthora cryptogea* on *Gerbera jamesonii*. *Plant Pathology*, 122, 227-237.
25. Murray, M. G. & Thompson, W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4326.
26. Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Science*, 70, 3321-3323.
27. Robideau, G., Pde Cock, A. W. A. M., Coffey, M. D., Voglmayr, H., Brouwer, K., Bala, D. W., Chitty, N., Desaulniers, Q. A., Eggertson, C. M., Gachon, C. H., Rintoul, T. L., Sarhan, E., Verstappen, E.C., Zhang, Y., Bonants, P. J., Ristaino, G B. & Levesque, C. A. (2011). DNA barcoding of oomycetes with cytochrome c oxidase subunit I and internal transcribed spacer. *Molecular Ecology Resources*, 11, 1002-1011.
28. Saitou, N. & Nei, M. (1987). The Neighbor-Joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
29. Sahragard, N. & Banihashmi, Z. (2006). Evaluation of resistance of some almond genotypes and cultivars to *Phytophthora cactorum*. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 42, 309-322.
30. Schena, L., Duncan, J. M. & Cooke, D. E. L. (2008). Development and application of a PCR-based molecular tool box for the identification of *Phytophthora* species damaging. *Plant Pathology*, 57, 64-75.
31. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. (2007). Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24, 1596-1599.
32. Weste, G. (1983). Population dynamics and survival of *Phytophthora*. Pp.: 237-259. In: *Phytophthora: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology*. Erwin, D.C., Bartnicki-Garcia, S., and Tsao, P.H. (eds.). APS Press. 329 P.
33. Zakii, Z. & Ershad, D. (1994). Isolation of *Phytophthora cactorum* from cherry trees in Karaj. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 30, 78. (in Farsi)