تنوع بیماری‌زایی و ژنتیکی جدایه‌های *Fusarium solani* و ارتباط آن با پوسیدگی ریشه چغندرقند

Pathogenic variability and genetic diversity of *Fusarium solani* isolates and it's association with sugar beet root rot

سارا آشنا*[۱]، حمید رضا زمانی‌زاده[۲] و سید باقر محمودی[۳]

تاریخ دریافت: ۸۶/۹/۱۰ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۷/۱۰/۹

س. آشنا، ح. ر. زمانی‌زاده و س. ب. محمودی . ۱۳۸۷. تنوع بیماری‌زایی و ژنتیکی جدایه‌های *Fusarium solani* و ارتباط آن با پوسیدگی ریشه چغندرقند. **مجله چغندرقند ۲٤(۱): ۹۵-۷۷**

چکیده

از ریشه‌های چغندرقند دارای علائم پوسیدگی، از مناطق چغندرکاری مختلف کشور، یکصد جدایه قارچی جداسازی شد. از بین آن‌ها، ۲۰ جدایه براساس خصوصیات ریخت‌شناسی متعلق به *F. solani* بودند. بیماری‌زایی جدایه‌ها در شرایط آزمایشگاه روی ریشه‌های چغندرقند انجام شد. جدایه‌های مورد بررسی به گروه‌های بیماری‌زا، بیماری‌زایی کم و غیربیماری‌زا دسته‌بندی شدند. جدایه‌های *F. solani* در گلخانه روی بوته‌های ۱٤ هفته‌ای قادر به ایجاد بیماری نبودند اما روی ریشه‌های زخم شده علائم بیماری را نشان دادند. تنوع ژنتیکی ۲۰ جدایه *F. solani* با روش ITS-rDNA با کمک جفت آغازگرهای ITS 1/4 مطالعه شد. آغازگرهای مذکور در تمام جدایه‌ها منجربه تکثیر قطعات DNA شدند. جدایه‌ها با توجه به الگوی نواری به سه گروه یک نواری (۵۵۰ یا ٦۰۰ جفت باز)، دو نواری(۵۵۰ و ٦۰۰ جفت باز) و سه نواری (۵۵۰،۵۰۰و ٦۰۰ جفت باز) تقسیم‌بندی شدند. برش محصولات تکثیری با آنزیم‌های برشی *Msp*1,*Eco*R1,*Bam*H1 نشان داد که آنزیم *Bam*H1 فاقد محل برش در قطعات تکثیری بود. الگوی حاصل‌از آنزیم *Eco*R1 برای همه جدایه‌ها یکسان بود و این آنزیم دارای یک محل برش در کلیه جدایه‌ها بود. برای الگوی برش آنزیم*Msp*1 جدایه‌ها دارای تنوع بودند. در برخی از جدایه‌ها یک محل برش و در برخی دیگر بیش از یک محل برش وجود داشت. ارتباطی بین بیماری‌زایی، منطقه جغرافیایی و تنوع حاصل از آنالیز ITS-rDNA مشاهده نشد.

واژه‌های کلیدی: آنزیم برشی، تنوع بیماری زایی، *Fusarium solani*، ITS-rDNA

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات – تهران *- نویسنده مسئول
Sara.Ashena@gmail.com
۲- استاد دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات- تهران
۳- استادیار مؤسسه تحقیقات چقندرقند- کرج

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

مقدمه

تا به حال تحقیقات وسیعی در زمینه بیماری پوسیدگی ریشه چغندرقند در جهان انجام شده است و عوامل بیماری‌زا متعددی نیز گزارش گردیده‌اند. بیماری زردی فوزاریومی یا پژمردگی آوندی چغندرقند اولین بار از ایالت کلرادو آمریکا گزارش شد (Stewart 1931).

راپل (Ruppel 1991) نیز در بررسی گونه‌های مختلف فوزاریوم که از چغندرهای بیمار جدا شده بود گونه های *F.acuminatum ,F. avenaceum,F. solani* و *F. oxysporum* را معرفی کرد. گونه‌های *F.avenaceum* و *F. moniliforme*,نیز به عنوان عوامل مرگ گیاهچه چغندرقند معرفی شده‌اند (Cook and Scott 1993).گونه *F. oxysporum* به عنوان عامل پوسیدگی نوک ریشه در چغندرقند از ایالت کلرادو و مونتانا گزارش شده است(Hanson 2006).

در ایران گونه‌های مختلف فوزاریوم از مناطق چغندرکاری کشور جداسازی و گزارش شده‌اند. پوسیدگی ریشه چغندرقند اولین باردر تیرماه ۱۳۴۳ از اصفهان گزارش شد و خسارت آن تا ۳۰ درصد برآورد گردید (بهداد ۱۳۶۹). این بیماری در مزارع کرج، فارس، خراسان، کرمانشاه، همدان، یاسوج، ممسنی و قزوین مشاهده شده است (بهداد ۱۳۶۹). ایرانی و ارشاد (۱۳۷۴)، از چغندرکاری‌های آذربایجان‌غربی، قارچ‌های *F. solani* و *F. oxysporum* را جدا کردند که بیشترین فراوانی مربوط به پوسیدگی فوزاریومی ناشی‌از *F. solani* از مناطق خوی، میاندوآب و ارومیه به ترتیب ۴۲ ، ۳۸ و ۳۵ درصد گزارش شد.

عباسی‌مقدم و همکاران(۱۳۷۷) بیماری‌زایی گونه‌های *F. oxysporum* و *F.solani* جدا شده از مزارع چغندرقند در خراسان، در مرحله گیاهچه‌ای و روی گیاهان ۱۰ هفته‌ای چغندرقند بررسی کردند. بیماری‌زایی *F.solani* و *F.oxysporum* روی ریشه‌های چغندرقند در شرایط سیلو نیز بررسی و قارچ‌های مذکور به‌عنوان عوامل پوسیدگی انباری چغندر معرفی شده‌اند (شیخ‌الاسلامی و همکاران ۱۳۷۷). گونه‌های فوزاریوم همراه با پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند را از مناطق کشت محصول در ایران جمع‌آوری وبیماری‌زایی آن‌ها در گلخانه بررسی شده است (رئوفی و همکاران ۱۳۸۲).در این مطالعه گونه‌های مختلف فوزاریوم جداسازی شدند. بیشترین فراوانی مربوط به *F. solani* بود.

ارجمندیان و ارشاد (۱۳۸۳) بیماری‌زایی ۹۷ جدایه *Fusarium* جمع‌آوری شده از مزارع چغندرقند استان همدان را با استفاده‌از روش‌های مختلف بررسی و این بیمارگر را به عنوان یکی از عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند در همدان معرفی کردند.

طی مطالعات انجام شده در سال‌های ۱۳۸۲-۱۳۸۰ در مزارع چغندرقند در منطقه قزوین گونه‌های *F. solani ,F. oxysporum Pythium aphanidermatum* و *Rizoctonia solani* و *Phytophthora drechsleri* روی ریشه‌های کامل و برش‌های خراش‌دار چغندر پوسیدگی ایجاد کردند ولی شدت بیماری‌زایی گونه‌های *F.oxysporum* و

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

F.solani کمتراز سایر گونه‌های فوق بود (داودی و افضلی ۱۳۸۳).

وجود تنوع مورفولوژیکی در قارچ *F. solani* این امر را تداعی می‌کند که قارچ باید از تنوع ژنتیکی بالایی برخوردار باشد (Bereneuza et al. 2004). تنوع ژنتیکی قارچ *F. solani* توسط تکنیک ریبوتایپینگ (Ribotyping) در ۱۸ جدایه جمع‌آوری شده از میزبان‌ها و مناطق مختلف جغرافیایی درکشوربرزیل بررسی شد (Bereneuza et al. 2004). در ایران نیز مطالعه روی گونه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند و تعیین تنوع ژنتیکی در گونه *F.solani* انجام شده است. در این بررسی آزمایش بیماری‌زایی روی برش‌های ریشه و گیاهچه چغندرقند صورت گرفته و تنوع ژنتیکی با استفاده‌از VCG(گروه‌های سازگار رویشی) مطالعه شده است.

توالی‌هایی از DNA که RNA ریبوزومی را رمز می‌کنند نواحی مناسبی جهت بررسی روابط فیلوژنیک ، تاکسونومیک و همچنین قرابت‌های ژنتیکی بین قارچها به حساب می‌آیند (Bruns et al.,1991). در قارچها، ژن‌های ریبوزومی (rDNA) در هسته و نیز در DNA میتوکندریایی قرار گرفته‌اند (White et al.1990). ژن‌های ریبوزومی هسته‌ای در دو گروه 18s ویژه زیروا حد کوچک ریبوزومی و ۵/۸S و ۲۸S ویژه زیر واحد بزرگ ریبوزوم قرا رمی‌گیرند. در حدفاصل بین قطعات 18s و 28s دو قطعه فاصله‌انداز داخلی رونوشت‌برداری شده (Internal Transcribed Spacer) به اسامی ITS2 و ITS1 قرار گرفته‌اند که شامل ژن‌های ۵/۸S نیز می‌شوند. تکثیر این نواحی و برش محصولات تکثیری با استفاده‌از آنزیم‌های برشی در تعیین تنوع ژنتیکی گونه‌های نا همگن قارچها اهمیت ویژه‌ای دارد(Cubeta et al. 1997).

با توجه به پژوهش‌های گذشته مبنی‌بر فراوانی گونه *F. solani* در ارتباط با پوسیدگی فوزاریومی ریشه چغندرقند، این تحقیق با هدف بررسی تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف *F. solani* و بررسی قرابت ژنتیکی آن‌ها با استفاده‌از ژن‌های ریبوزومی پایه‌ریزی شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی

در این تحقیق تعدادی از جدایه‌های قارچی از مزارع چغندرقند صفی‌آباد دزفول در سال زراعی ۸۵-۸۴ جمع‌آوری شدند و به همراه جدایه‌های فوزاریوم موجود در کلکسیون بخش تحقیقات گیاه پزشکی مؤسسه تحقیقات چغندرقند مورد بررسی قرار گرفتند. جدایه‌های موجود در کلکسیون از علائم پوسیدگی ریشه چغندرقند و از مناطق مختلف کشور طی سال‌های ۸۴-۱۳۷۸ جمع‌آوری و روی محیط کشت SNA و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شده بودند. در نمونه‌برداری از مزارع، با مشاهده علائم بوته میری، بوته‌ها از خاک خارج شده و در درون یک پاکت کاغذی قرار گرفته و سپس پاکت کاغذی درون کیسه فریزر قرار گرفته و روی یخ به آزمایشگاه منتقل شدند.

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی قارچ عامل بیماری

برای جداسازی قارچ قطعاتی از حدفاصل بافت سالم و آلوده جدا و پس از ضدعفونی با اتانول ۷۵ درصد روی محیط PDA کشت گردیدند. خالص‌سازی قارچها به روش تک‌اسپور، روی محیط آب آگار ۲درصد انجام گرفت.مشخصات جدایه‌ها شامل شکل ماکروکنیدیوم، وجود یا عدم وجود میکروکنیدیوم، شکل میکروکنیدیوم و نحوه تشکیل آن‌ها، وضعیت فیالیدها (منو فیالید یا پلی فیالید)، وجود یا عدم‌وجود کلاً میدوسپور، میزان رشد پرگنه، رنگ پرگنه در محیط بعداز نگه‌داری پرگنه‌ها در شرایط استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. جهت شناسایی از کلیدهای گرلاخ و نیرنبرگ(Gerlach and Nirrenberg 1982) و نلسون (Nelson et al.1983) و کلید اینترنتی Fuskey استفاده شد.

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها بر روی ریشه چغندرقند در شرایط آزمایشگاه

در این آزمایش مطابق روش کرماک و موفات (Cormark and Moffat 1961)، تمامی جدایه‌های *F. solani* روی ریشه‌های رقم زرقان مایه‌زنی شدند. ابتدا ریشه‌ها به وزن تقریبی ۷۰۰-۵۰۰ گرم از خاک خارج شدند و پس‌از شستشو یک شبانه روز در هوای آزاد خشک شدند. سپس برای هرجدایه دو ریشه سالم و بدون خراش انتخاب، در محلول هیپو کلریدسدیم رقیق شده (یک درصد) به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس با آب مقطر سترون شستشو و به اتاق کشت منتقل گردیدند. پس از خشک‌شدن سطحی ریشه‌ها در قطورترین ناحیه ریشه توسط چوب‌پنبه سوراخ‌کن سترون روی ریشه حفره‌های به عمق پنج میلی‌متر ایجاد گردید برای مایه‌زنی از حاشیه کشت ۱۰ روزه قارچ روی محیط کشت WA استفاده شد. در حفره یک قطعه چهار میلی‌متری از کشت قارچ قرار داده شد. برای شاهد نیز قطعه‌ای از محیط کشت WA فاقد قارچ استفاده شد. قطعه خارج شده از ریشه مجدداً در جای خود قرار گرفت و روی محل زخم با پارافیلم پوشانده شد، سپس ریشه‌ها درون کیسه فریزر قرار داده و مشخصات هر جدایه روی آن نوشته شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تکرار برای هر جدایه قارچی انجام شد. بعد از گذشت ۱۰ روز در محل مایه‌زنی شده، برش عرضی داده شد و در صورت مشاهده علائم پوسیدگی و تغییر رنگ، میزان پوسیدگی ریشه در داخل بافت به عنوان شدت آلودگی توسط مقیاس بوتنر و همکاران (Buttner et al. 2004) اندازه‌گیری شد. در این مقیاس ریشه‌های سالم نمره یک و ریشه‌های کاملاً پوسیده نمره نه در یافت می‌کنند. هم‌چنین میزان پیشروی بیمارگر در بافت ریشه به عنوان قطر پوسیدگی بر حسب میلی‌متر نیز اندازه‌گیری شد.

بررسی بیماری‌زایی به روش آلوده‌سازی خاک و ریشه در شرایط گلخانه

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

در بررسی بیماری‌زایی به روش آلوده‌سازی خاک، از گیاهان ۱۴ هفته‌ای رقم حساس رسول استفاده شد. مایه‌زنی گلدان‌ها توسط بذور جو آلوده به جدایه‌های قارچی موردنظر انجام شد. جهت تهیه مایه تلقیح، ابتدا بذور به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده، سپس در شیشه‌های مک‌کارتنی ریخته و دو مرتبه متوالی به فاصله ۲۴ ساعت سترون شدند. سپس جدایه‌های قارچی موردنظر روی بذر جو به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۷-۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند(Sneh et al. 1991). بذرهای آلوده جو در عمق دو سانتی‌متری خاک کنار ریشه خراشیده قرار گرفتند. جهت مایه‌زنی شاهد از بذور جو تلقیح نشده استفاده شد. دمای گلخانه بین ۳۰- ۲۵ درجه سانتی‌گراد تنظیم شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تکرار برای هر جدایه انجام شد. شدت آلودگی پنج هفته بعد از مایه‌زنی ریشه‌ها، با مقیاس بوتنر و همکاران(Buttner et al.2004) اندازه‌گیری شد. در بررسی بیماری‌زایی در شرایط گلخانه به روش آلوده‌سازی ریشه از رقم زرقان استفاده شد. بوته‌های کاملاً رشد یافته از مزرعه به گلخانه منتقل و در گلدان‌های ۵ کیلویی در شرایط دمایی ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در این آزمایش تعدادی از جدایه‌ها(۱۲ جدایه) بررسی شدند. جهت مایه‌زنی پنج عدد بذر جو آلوده در کنار ریشه زخم شده قرار داده شد و خاک اطراف آن کاملاً پوشانده شد. جهت مایه‌زنی شاهد از بذور جو تلقیح نشده استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه بوته چغندرقند رقم زرقان برای هر جدایه انجام شد. پس از گذشت دو هفته ریشه‌ها از خاک خارج شده و از محل مایه‌زنی برش داده شد. شدت آلودگی با استفاده‌از مقیاس نه گانه بوتنر و همکاران (Buttner et al. 2004) اندازه‌گیری شد.

استخراج DNA

تهیه تودهٔ میسلیومی جدایه‌ها در محیط کشت مایع PDB (عصارهٔ ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی همراه با ۱۵ گرم دکستروز در یک لیتر آب) صورت گرفت. بدین ترتیب که دو یا سه قرص پنج میلی‌متری از میسلیوم سه تا پنج روزه قارچ برداشته شده و به ظرف ارلن مایر محتوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB منتقل گردید. ظروف سه تا پنج روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد روی شیکر دورانی (۹۰ دور در دقیقه) قرار داده شدند. سپس محتوی هرکدام از این ارلن‌ها، با کمک پمپ خلاء و روی قیف بوخنر از کاغذصافی واتمن شماره یک عبور داده شدند. به این ترتیب میسلیوم، از محیط کشت مایع جدا شده و با آب مقطر استریل شستشو گردید. میسلیوم بعداز برداشت و توزین در فویل آلومینیومی قرارداده شده و تا مرحلهٔ استخراج DNA در دمای منهای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری گردید. تکثیر rDNA با استفاده ازآغازگرهای ITS1 و ITS4 انجام شد (Schneider et al. 1997; Salazar et al. 2000). دمای اتصال آغازگرهای ITS1:5'- (19-mer) TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

و -ITS4:5' (20-mer) درجه‌سانتی گراد بود.

TCCTCCGCTTATGATATGC -3' ۶۰

جدول۱ اجزای PCR

اجزای واکنش	مقدار برداشت (μl)	غلظت نهایی
$D.D.H_2O$ آب دوبار تقطیر	۱۴/۷	-
Reaction Buffer ۱۰×	۲/۵	۱X
dNTP $(25mM)$	۲	۰/۲mM
$MgCl_2(25mM)$	۱/۶	۱/۶mM
primers $\left(50\,ng/\mu l\right)$	۱	۱۰۰ng
Taq Polymerase $\left(5\,u/\mu l\right)$	۰/۲	۱ Unit
DNA (50mg/µl)	۲	۱۰۰ng
Total حجم کل	۲۵	-

برش محصولات PCR

از آنزیم‌های *Msp*I, *BamH*I, *EcoR*1 جهت برش قطعات DNA تکثیری با استفاده ازآغازگرهای ITS1/ITS4 استفاده شد (Bereneuza et al. 2004; Edel et al.1997; Mirhendi et al.2001).

قطعات برشی با الکتروفورز ژل آگاروز ۱/۲درصد تفکیک و ژل ها با محلول اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن و با استفاده از نرم‌افزار SPSS(version 11.5) انجام شد. گروه‌بندی خوشه‌ای جدایه‌ها بر مبنای متغیر شدت آلودگی و میزان پیشروی قارچ با استفاده‌از الگوریتم UPGMA براساس توان دوم اقلیدسی با کمک نرم‌افزار SPSS(version 11.5) انجام شد.

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

نتایج

شناسایی جدایه‌های قارچی

در این بررسی از بین ۱۰۰ جدایه قارچی با علائم پوسیدگی ریشه، ۵۸ جدایه فوزاریوم تشخیص داده شد. جدایه‌های فوزاریوم جهت تشخیص گونه مورد بررسی دقیق‌تر قرار گرفتند. از ۵۸ جدایه فوزاریوم، ۲۰ جدایه به گونه *F. solani* تعلق داشتند(جدول۲). از ۲۰ جدایه *F. solani*، ۸۰درصد آن‌ها از ریشه‌های پوسیده، ۱۰درصد از طوقه‌های پوسیده، ۵درصد از گیاهچه‌های مرده و ۵درصد از بوته‌های پژمرده جداسازی شدند.

جدول۲ مشخصات جدایه‌های *Fusarium solani* جدا شده از چغندرقند

کد ایزوله	جداسازی شده از	علائم	محل جمع آوری
81-101-S	طوقه	پوسیدگی قهوه‌ای طوقه	شاهرود
O	ریشه	پوسیدگی ریشه	ارومیه
Safiabad	ریشه	پوسیدگی سیاه	صفی‌آباد
5	ریشه	پوسیدگی ریشه	گناباد
81-16-Ke	ریشه	پوسیدگی نوک ریشه	کرمان
43	ریشه	پوسیدگی ریشه	تربت حیدریه
55-1	ریشه	پژمردگی	چناران
81-128-O	ریشه	پوسیدگی ریشه	ارومیه
84-22-AZ	ریشه	پوسیدگی ریشه	آذربایجان‌غربی
81-143-Ka	طوقه	پوسیدگی طوقه	کرج
81-148-Ka	ریشه	پوسیدگی ریشه	کرج
B5-H	ریشه	پوسیدگی قهوه ای	کرج
78-29-O	گیاهچه	مرگ گیاهچه	ارومیه
44	ریشه	پوسیدگی ریشه	تربت حیدریه
K9/9	ریشه	پوسیدگی ریشه	کرج
87	ریشه	پوسیدگی سیاه	قوچان
16	ریشه	پوسیدگی قهوه ای	بیرجند
81-151-Ka	ریشه	پوسیدگی ریشه	کرج
H_1	ریشه	پوسیدگی قهوه‌ای نوک ریشه	همدان
H_2	ریشه	پوسیدگی قهوه‌ای نوک ریشه	همدان

بیماری‌زایی جدایه‌های فوزاریوم در شرایط آزمایشگاه

در این آزمایش، ریشه‌های مایه‌زنی شده پس از گذشت ۱۰روز از انکوباتورخارج شدند. سپس از وسط

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

به دو قسمت تقسیم شدند. جدایه‌های قارچی در قیاس با شاهد باعث تغییر رنگ و پوسیدگی قهوه‌ای بافت ریشه شده بودند. میزان پوسیدگی ریشه به عنوان شدت آلودگی با استفاده‌از مقیاس نه گانه بوتنر و همکاران(۲۰۰۴) اندازه‌گیری شد. هم‌چنین میزان پیشروی قارچ بر حسب میلی‌متر، نیز اندازه‌گیری شد. مقاسه میانگین‌ها به روش دانکن برای شدت آلودگی، تیمارها را به دو گروه دسته‌بندی کرد. جدایهO– ۱۲۸–۸۱ با میانگین شدت آلودگی ۴/۵ (در مقیاس۱تا۹) بیماری‌زاترین جدایه در بین تیمارهای مورد بررسی شناخته شد. مقایسه میانگین‌ها برای میزان پیشروی قارچ دربافت ریشه تیمارها را در سه گروه دسته‌بندی کرد (جدول ۳) که جدایهO –۱۲۸–۸۱ نیز بیشترین میزان پوسیدگی ریشه را سبب شده بود. تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها بر مبناء متغییر شدت آلودگی و میزان پیشروی قارچ(۱۰ روز پس از مایه‌زنی)با استفاده‌از الگوریتم UPGMA بر اساس توان دوم اقلیدسی، جدایه‌ها را به ۳ گروه بیماری‌زا، بیماری‌زایی کم و غیربیماری‌زا تقسیم کرد(شکل‌های ۱ و ۲).

بیماری‌زایی در شرایط گلخانه به روش آلوده‌سازی خاک و ریشه

در بررسی بیماری‌زایی در شرایط گلخانه به روش آلوده‌سازی خاک، بوته‌ها پس‌از گذشت ۴۰ روز از مایه‌زنی، از خاک خارج شده و به آزمایشگاه منتقل شدند پس از شستشو، با مقایسه ریشه‌های مایه‌زنی شده با شاهد هیچ‌گونه علائمی ناشی‌از پوسیدگی ریشه مشاهده نشد. در بررسی بیماری‌زایی در شرایط گلخانه به روش آلوده‌سازی ریشه، ریشه‌های مایه‌زنی شده پس‌از گذشت دو هفته از خاک خارج شدند. علائم بیماری به صورت پوسیدگی خشک یا نرم و قهوه‌ای در محل مایه‌زنی دیده شد. میزان پوسیدگی ریشه جدایه‌های مختلف درخور توجه و قابل ارزیابی با مقیاس بوتنر و همکاران(۲۰۰۴) نبود (جدول ۳). تجزیه واریانس اختلاف معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد.

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

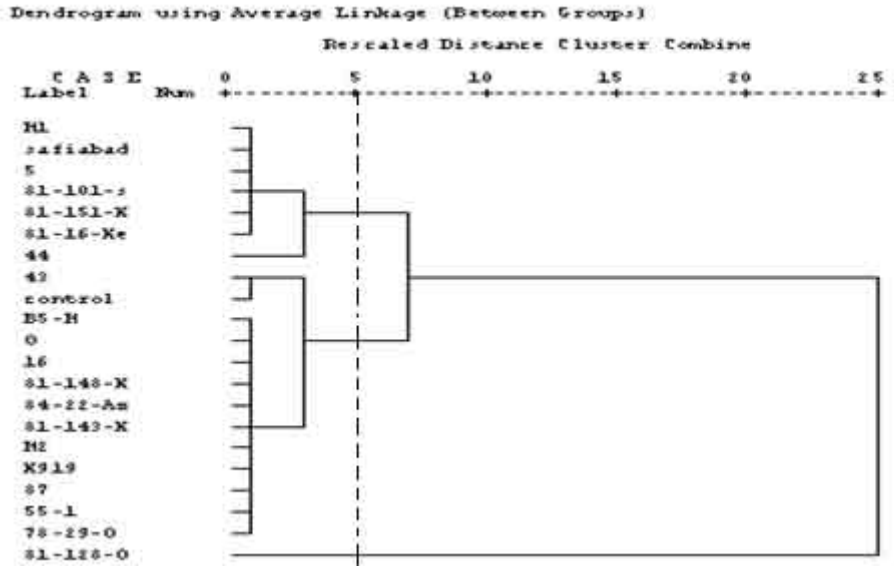
جدول۳ مقایسه شدت آلودگی جدایه‌های مختلف*F.solani* و میزان پیشرفت آن‌ها در بافت ریشه در آزمون‌های بیماری‌زایی

ردیف	کد ایزوله	شدت آلودگی در آزمایشگاه	قطر پوسیدگی بر حسب میلی متر	شدت آلودگی در گلخانه
۱	81-101-S	۲/۵ b	۱۲/۵ ab	–
۲	O	۲b	۷/۵ bc	۲
۳	Safiabad	۲/۵ b	۱۵ ab	–
۴	5	۲/۵ b	۱۲/۵ ab	۲
۵	81-16-Ke	۳ ab	۷/۵ bc	۱/۳۳
۶	43	۱ b	۰c	۱
۷	55-1	۱/۵ b	۲c	۱
۸	81-128-O	۴/۵ a	۱۷/۵ a	–
۹	84-22-AZ	۲ b	۲/۵c	–
۱۰	81-148-Ka	۲ b	۷/۵ bc	۱/۶۶
۱۱	B5-H	۲ b	۳ c	۲
۱۲	78-29-O	۱ b	۰c	–
۱۳	44	۳ ab	۱۵ ab	۱/۶۶
۱۴	K9/9	۱/۵ b	۲/۵ c	۱
۱۵	87	۱ b	۰c	۱
۱۶	16	۱ b	۰c	–
۱۷	81-151-Ka	۳ ab	۷/۵ bc	۱/۶۶
۱۸	H1	۲/۵ b	۷/۵ bc	–
۱۹	H2	۲ b	۱۲/۵ ab	–
۲۰	شاهد	۱ b	۰c	۱

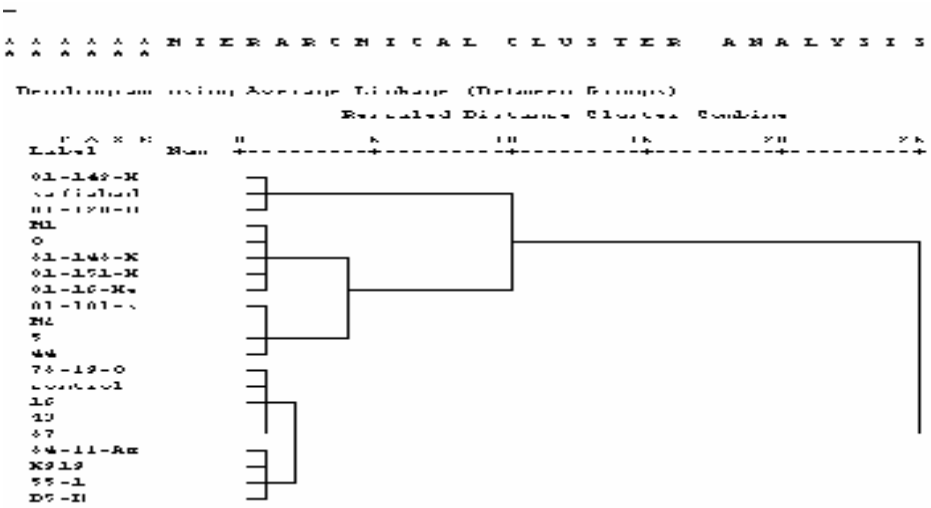
در هر ستون میانگینهای برخوردار از حروف غیر مشترک دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵درصد (آزمون دانکن) می‌باشند

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

شکل۱ تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های*F.solani* بر مبنای شدت بیماری ۱۰ روز بعداز مایه‌زنی (مقیاس ۱ تا ۹) روی ریشه‌های چغندرقند رقم زرقان در شرایط آزمایشگاه.



شکل ۲ تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های*F.solani* برمبنای قطر پوسیدگی ۱۰ روز بعداز مایه‌زنی بر روی ریشه‌های چغندر رقم زرقان در شرایط آزمایشگاه.

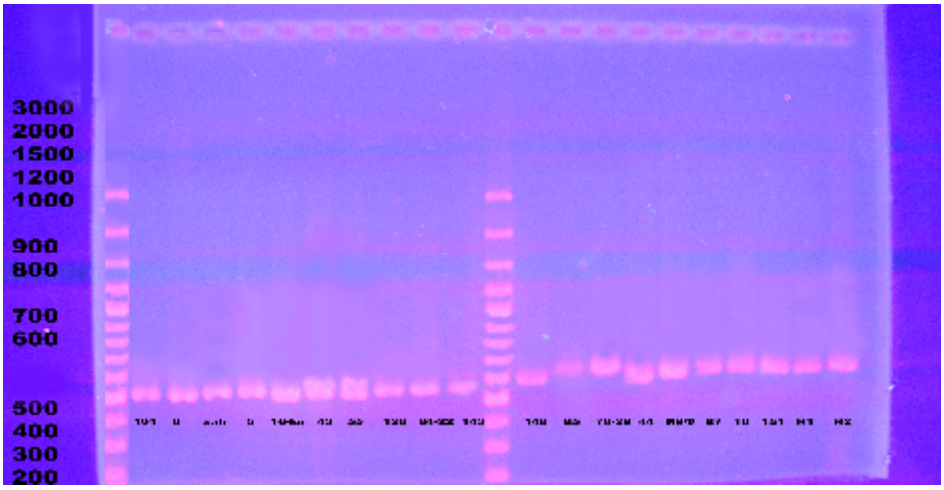


تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *F. solani* براساس تجزیه ITS-rDNA

آغازگرهای ITS1/4 در تمام جدایه‌ها منجربه تکثیر قطعات DNA شد (شکل ۳). در جدایه‌های ۴۳، ۱-۵۵،۴۴ و 81-16-ke سه قطعه به طول ۵۰۰، ۵۵۰

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

و۶۰۰ و در جدایه‌های B5-H،۵ ,k9/9 و 78-29-o دو قطعه به طول‌های ۶۰۰ و ۵۵۰ و در بقیه جدایه‌ها یک قطعه با طول ۵۵۰ یا۶۰۰ جفت باز تکثیر شد. به این ترتیب جدایه‌ها در سه دسته یک، دو و سه نواری دسته‌بندی شدند (جدول ۴).

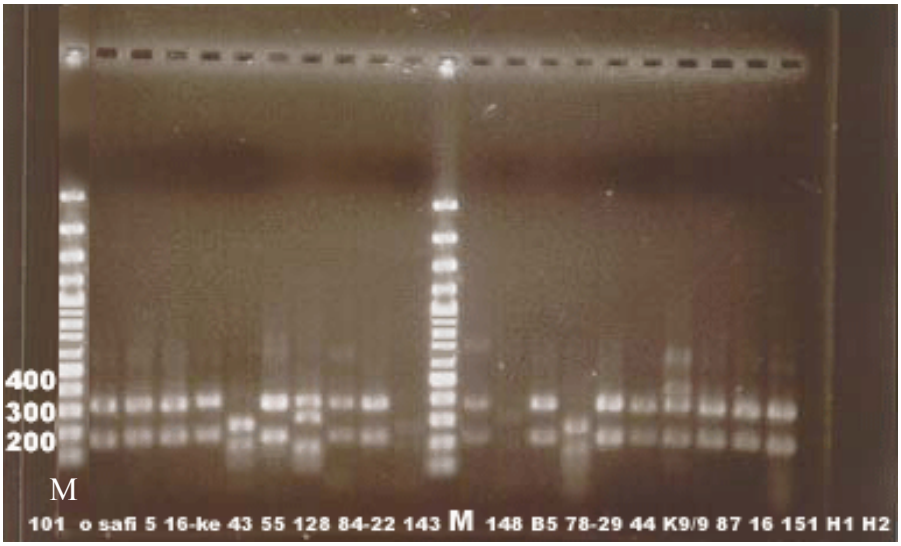


شکل۳ الگوی نواری محصولات تکثیری جدایه‌های *F.solani* جدا شده از چغندرقند با استفاده از آغازگرهای ITS1/4 در ژل آگاروز ۲٪ .M نشانگر وزن مولکولی(۱۰۰ جفت باز)

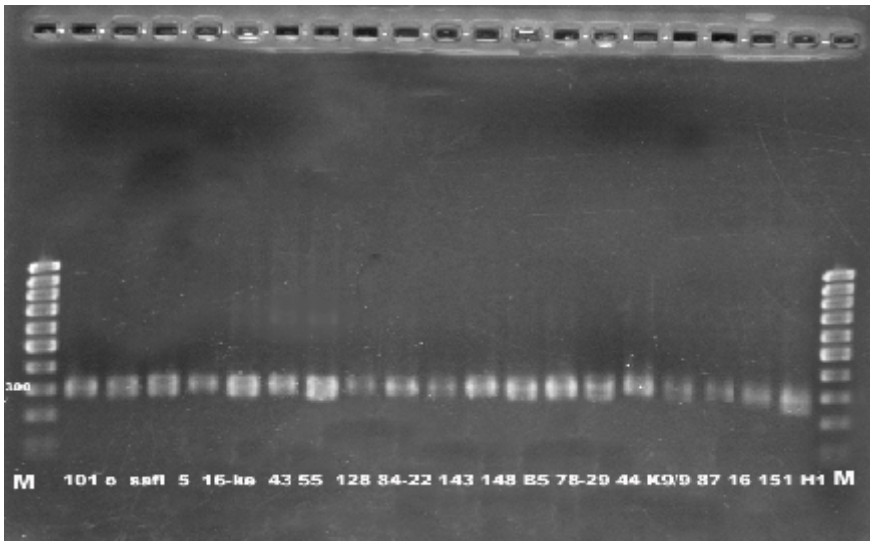
مقایسه اثر آنزیم‌های برشگر روی محصول PCR

محصول تکثیر شده از rDNA جدایه‌های مختلف، با استفاده‌از آغازگرهای ITS4 و ITS5 با سه آنزیم برشی *Msp*I، *EcoR*1 و *Bam*HI در شرایط مناسب برای هر آنزیم تیمار و محصول روی ژل آگاروز ۱/۲درصد الکتروفورز و با اتیدیوم بروماید رنگ‌آمیزی شد. آنزیم برشی *Bam*HI دارای محل برش روی قطعه مذکور نبود. آنزیم *EcoR*1 منجربه تولید دو نوار نزدیک به هم به طول تقریبی حدود ۲۷۰ و ۳۰۰ جفت باز شد و از نظر الگوی نواری حاصل از این آنزیم تفاوتی بین جدایه‌ها مشاهده نشد (شکل ۵). تیمار محصولات تکثیری با آنزیم برشی *Msp*I منجربه تولید دو نوار با طول تقریبی به ترتیب ۲۰۰ و ۳۵۰ جفت بازدر کلیه جدایه‌ها بجز جدایه‌های 81-16-ke, B5-H,44, 55-1 شد. در جدایه‌های مذکور نوارهایی با طول ۱۸۰،۱۲۰و۲۵۰ جفت باز تولید شد (شکل ۴). جدایه ۱- ۵۵ الگوی متفاوتی نسبت به سایر جدایه‌ها داشت. جدایه ۴۴ نیز دو نوار به طول تقریبی ۲۷۰و ۱۸۰ جفت باز نشان داد (جدول۴). با توجه به تعداد قطعات تکثیری و الگوی هضم آن‌ها با آنزیم‌های مختلف، جدایه‌ها به ۴ گروه ITS تقسیم شدند(جدول۴).

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional



شکل٤ الگوی نواری محصولات تکثیری جدایه‌های *F.solani* جدا شده از چغندرقند تیمار شده با آنزیم برشی M.*Msp*I نشانگر وزن مولکولی(۱۰۰ جفت باز)



شکل٥ الگوی نواری محصولات تکثیری جدایه‌های *F. solani* جدا شده از چغندرقند تیمار شده با آنزیم برشی *Eco*R1 M نشانگر وزن مولکولی(۱۰۰ جفت باز)

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

جدول ٤ اندازه قطعات تکثیرشده با آغازگرهای ITS4 و ITS5 در جدایه‌های مختلف *F. solani* و هضم آن‌ها با آنزیم‌های برشی مختلف

ردیف	جدایه ها	اندازه نوارها (جفت باز)	*Bam*HI	*Eco*R1	*Msp*I	نوع ITS
۱	81-101-S	۵۵۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۲	O	۵۵۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۳	Safiabad	۵۵۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۴	5	۵۵۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۵	81-16-Ke	۵۵۰،۵۰۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۱۲۰،۱۸۰و ۲۵۰	۲
۶	43	۵۵۰،۵۰۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۷	55-1	۵۵۰،۵۰۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۱۷۰،۲۰۰و ۳۰۰	۳
۸	81-128-O	۵۵۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۹	84-22-AZ	۵۵۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۱۰	81-148-Ka	۵۵۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۱۱	B5-H	۵۵۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۱۲۰،۱۸۰و ۲۵۰	۲
۱۲	78-29-O	۵۵۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۱۳	44	۵۵۰،۵۰۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۱۸۰ و ۲۷۰	۴
۱۴	K9/9	۵۵۰ و ۶۰۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۱۵	87	۵۵۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۱۶	16	۵۵۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۱۷	81-151-Ka	۵۵۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۱۸	H1	۵۵۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱
۱۹	H2	۵۵۰	۵۵۰	۲۷۰ و ۳۰۰	۲۰۰ و ۳۵۰	۱

بحث

در این تحقیق از ۵۸ جدایه فوزاریوم جمع‌آوری شده، تعداد ۲۰ جدایه *F. solani* از مناطق مختلف کشور با شرایط آب و هوایی متفاوت جدا شدند. از آن جایی که قارچ فوزاریوم قارچ خاکزی است و قادر به تولید کلامیدوسپور می‌باشد. کلامیدوسپورها می‌توانند شرایط نا مناسب را تحمل کنند بنابراین، دوام و بقای قارچ در طبیعت نسبتا بالا است.

قارچ *F. solani* در شرایط مختلف اقلیمی و در مزارع و مراتع گسترش دارد این گسترش همه جانبه

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

به علت توانایی آن‌ها در زندگی ساپروفیتی روی مواد مختلف در شرایط نامناسب می باشد(صارمی ۱۳۸۲).

مطابق گزارش‌های موجود علائم بیماری‌های فوزاریومی در چغندرقند به صورت پژمردگی یا نکروز آوندی و پوسیدگی ریشه می باشد (Whithney and Duffus 1986، رئوفی و همکاران۱۳۸۲). در نمونه‌های جمع‌آوری شده در این تحقیق و در آزمون‌های بیماری‌زایی، علائم بیماری بیشتر به صورت پوسیدگی خشک قهوه‌ای تیره و در برخی موارد به صورت پوسیدگی نرم قهوه‌ای روشن، ایجاد شده توسط جدایه‌های *Fusarium* مشاهده شد.

در تحقیق حاضر بیماری‌زایی ۲۰ جدایه *F.solani* روی گیاه چغندرقند به دو روش بررسی شد. در روش اول، که مایه‌زنی با استفاده‌از بذر جو آغشته به جدایه موردنظر انجام شد که هیچکدام از جدایه‌ها علائم پوسیدگی روی ریشه ایجاد نکردند. به طور کلی اعتقاد بر این است که گونه‌های فوزاریوم در مزارع تحت تنش خشکی یا در حضور زخم و یا در کنار سایر عوامل بیماری‌زا به عنوان یک عامل ثانویه در ایجاد بیماری پوسیدگی ریشه به حساب می‌آید (روستایی ۱۳۸۰ و Abawi et al. 1986). علی‌رغم این که عباسی‌مقدم و همکاران (۱۳۷۷)، بیماری‌زایی گونه‌های *F.solani* و *F.oxysporum* را روی گیاه ۱۰ هفته‌ای چغندرقند در گلخانه نشان دادند اما شیخ‌الاسلامی و همکاران (۱۳۸۱) با آزمون بیماری‌زایی گونه‌های فوزاریوم روی چغندرقند بالغ در شرایط گلخانه علائم مشخصی مشاهده نکردند.

ارجمندیان و ارشاد (۱۳۸۳) با مایه‌زنی ریشه‌های بالغ چغندرقند بیماری زایی ۹۷ جدایه *Fusarium* spp را نشان دادند حال آن که داوودی و افضلی (۱۳۸۳ قارچ *Pythium aphanidermatum* را به عنوان بیمارگر غالب پوسیدگی ریشه در قزوین معرفی وگونه‌های فوزاریوم را به عنوان عوامل ثانویه شناختند. در آزمون بیماری‌زایی که در گلخانه روی ریشه‌های زخم شده چغندرقند انجام شد علائم پوسیدگی و لهیدگی بافت‌های ریشه بعداز گذشت ۱۰ روز روی ریشه‌ها مشاهده شد. این نشان‌دهنده آن است که *F.solani* در اثر زخم قادر به پوسیدگی ریشه چغندرقند شده است.

در آزمون بیماری‌زایی بر روی ریشه مطابق روش کرماک و موفات (Cormark and Moffat 1961) که در آزمایشگاه انجام شد جدایه‌ها از یکدیگر متمایز و در سه گروه بیماری‌زا، بیماری‌زایی کم و غیربیماری‌زا دسته‌بندی شدند. نتایج حاصل‌از این آزمون با بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها در شرایط گلخانه هم خوانی داشت(جدول۳). علاوه بر این، در این دو آزمایش مایه تلقیح در مجاورت بافت زخم شده گیاه میزبان قرار داشت در صورتی که در روش اول به‌دلیل وجود مایه تلقیح (بذر جو) در مجاورت ریشه شاید مایه تلقیح با ریشه فاصله داشته و تماس حاصل نشده است.

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

تفاوت در شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها، در جدایه‌های *F.solani* وجود دارد. در بررسی‌های اخیر روی بیماری‌زایی فوزاریوم‌های مولد پژمردگی و پوسیدگی ریشه نخود در استان فارس تفاوت زیادی در شدت بیماری‌زایی جدایه‌های *F.solani* دیده شده است که در آن جدایه‌های *F.solani* روی نخود و نخودفرنگی ایجاد پوسیدگی ریشه نموده‌اند ولی روی سایر حبوبات بیماری‌زا نبودند (محمدی و بنی‌هاشمی ۱۳۸۴). قارچ *F.solani* دارای فرم اختصاصی می‌باشد، احتمال آن می‌رود که جدایه‌هایی که روی چغندرقند بیماری‌زایی ایجاد نکردند فرم اختصاصی چغندرقند نبوده و می‌توانند روی میزبان مخصوص خود بیماری‌زا باشند. با توجه به نتایج فوق و به استناد تحقیقات گذشته *F. solani* در چغندرقند در اغلب موارد به عنوان یک عامل ثانویه ایجادکننده آلودگی به حساب می آید.

نشان‌گرهای مختلفی جهت شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی به‌کار می‌روند. از آن‌جا که بیمارگر دارای تنوع بیماری‌زایی است برای بررسی احتمال وجود تنوع درون گونه‌ای از ITS-RFLP استفاده شد. برای تعیین تنوع ژنتیکی با استفاده از ITS-RFLP چند شکلی نواحی فاصله‌انداز داخلی رونوشت‌برداری شده (Internal Transcribed Spacer)، توسط آنزیم‌های برشی بررسی شد. محصولات PCR، ۱۹ جدایه با یکدیگر مقایسه شدند و بر این اساس جدایه‌ها به سه گروه یک نواری، دو نواری و سه نواری تقسیم شدند. طول قطعات ۵۰۰ و ۵۵۰ و۶۰۰ جفت باز، با طول قطعات تکثیرشده توسط برانزا و همکاران (Lee et al. 2000, Bereneuza et al, 2004) تقریباً مشابه بود. تنوع جدایه‌های *F. solani* جمع‌آوری شده از میزبان‌ها و مناطق مختلف کشور برزیل با استفاده از آغازگرهای ITS5 و ITS4 بررسی شده است (Bereneuza et al. 2004). در این بررسی نوارهایی با طول ۶۲۰bp مشاهده شد و از بین چهار آنزیم برشی *Eco*R1، *Hae*III و *Msp*I و *Dra*I سه آنزیم *Eco*R1 و *Hae*III و *Msp*I دارای جایگاه برش در محصولات تکثیری بودند که نتایج آن‌ها تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای را در میان جدایه‌های *F.solani* بدون هیچ رابطه‌ای بین منطقه جغرافیایی و میزبان آن‌ها نشان داد (Bereneuza et al. 2004).

در این مطالعه چند شکلی حتی در ناحیه ITS-rDNA مشاهده شد. در تیمار با سه آنزیم برشی *Msp*I,*Eco*R1 و *Bam*HI تنها تنوع توسط برش با آنزیم *Msp*I مشاهده شد. در حالی که در تیمار با آنزیم *Eco*R1 تنوعی بین جدایه‌ها مشاهده نشد. آنزیم *Eco*R1 دارای یک جایگاه برش روی قطعه تکثیری حاصل از ITS1/4 بود. نتایج حاصل از این بررسی با نتایج سایر محققین (Lee et al. 2000; Bereneuza et al. 2004) که از آنزیم *Eco*R1 جهت بررسی چندشکلی استفاده کردند مطابقت داشت. تاکنون از آنزیم برشی *Bam*HI در بررسی چندشکلی در *F. solani* استفاده نشده است این آنزیم جایگاه برش

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

روی قطعه تکثیری حاصل‌از ITS1/4 نداشت. تحقیقات اخیر نیز روی *F. solani* جدا شده از میزبان‌های متفاوت، در برش آنزیمی محصول PCR تنوع را فقط توسط برش با آنزیم *Msp*I نشان دادند (Lee et al. 2000). از بین سه آنزیم برشی *Msp*I, *Eco*R1, *Bam*HI مورد بررسی در این مطالعه نیز تنها تنوع توسط برش با آنزیم *Msp*I مشاهده شد. از آنالیز ITS-rDNA برای تشخیص جدایه‌های قارچی در حدگونه و زیرگونه استفاده می‌شود (محمودی و همکاران ۱۳۸۴، تاجیک و همکاران ۱۳۸۴). در استفاده‌از این روش برای شناسایی گونه‌ها و فرم‌های اختصاصی فوزاریوم نیز استفاده شده است که چندان موفقیت‌آمیز نبوده است(Lee et al. 2000). این تحقیق نیز بر آن بود تا با توجه به فراوانی جدایه‌های فوزاریوم در مزارع چغندرقند و جداسازی آن‌ها از ریشه‌های پوسیده، ضمن بررسی بیماری‌زایی آن‌ها از آنالیز ITS-rDNA جهت تشخیص و ارتباط جدایه‌ها با بیماری‌زای استفاده نماید. نتایج این بررسی نشان داد که علی‌رغم فراوانی جدایه‌های فوزاریوم در ریزوسفر چغندرقند آن‌ها نمی‌توانند عامل مهم و تهدیدکننده‌ای برای این زراعت باشند و وجود تنوع در نواحی فاصله سازداخلی ربطی به بیماری‌زایی یا منطقه جغرافیایی محل جمع‌آوری قارچ ندارد.

منابع مورد استفاده:

References:

ارجمندیان، ا. ارشاد، ج.۱۳۸۳. شناسایی وبررسی پراکنش عوامل قارچی مسبب پوسیدگی‌های ریشه چغندرقند در استان همدان. خلاصه مقالات شانزدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران .صفحه ۱۳۸.

ایرانی، ح. ارشاد، ج.۱۳۷۴.شناسایی قارچهای مرتبط با پوسیدگی ریشه قند در آذربایجان غربی. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران.آموزشکده کشاورزی کرج.صفحه۱۲۶.

بهداد، ا.۱۳۶۹. بیماری‌های گیاهان زراعی. دانشگاه تهران.۴۲۴ صفحه.

تاجیک، م. ع. رحیمیان، ح. علیزاده، ع. ۱۳۸۴. مطالعه جمعیت‌های *Rhizoctonia solani* AG-1IA جداشده از برنج در استان مازندران به کمک rDNA-RFLP. مجله بیماری‌های گیاهی ۴۱: ۵۰۷-۵۲۳.

رئوفی، م. ۱۳۸۲. بررسی گونه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه چغندرقند در ایران و تعیین تنوع ژنتیکی در گونه غالب. پایان‌نامه کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی. دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران اهواز. ایران.۱۸۶ صفحه.

روستایی، م.۱۳۸۰. مدیریت بیماری‌های گیاهی (ترجمه) مؤسسه نشر جهاد.۴۱۶ صفحه.

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

داودی، ع. افضلی، ح. ۱۳۸۳. شناسایی عوامل قارچی پوسیدگی‌های مختلف ریشه چغندرقند در منطقه قزوین. شانزدهمین کنگره گیاه ژزشکی ایران. دانشگاه تبریز صفحه ۱۶۸.

شیخ‌الاسلامی، م. حجارود، ق و اخوت، م.۱۳۷۷.قارچ‌های مولد پوسیدگی ریشه چغندرقند بعداز برداشت در کرمانشاه. بیماری‌های گیاهی. ۳۴:۹۲-۸۱.

شیخ‌الاسلامی، م. یونسی، ح. ارشاد، ج. ۱۳۸۱. شناسایی قارچ‌های عامل پوسیدگی ریشه چغندرقند و تعیین پراکندگی آن‌ها در استان کرمانشاه. پانزدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران. صفحه۱۳۳.

صارمی، ح.۱۳۸۲.الگوی پراکنش گونه‌های فوزاریوم در اقلیم‌های مختلف. مجله بیماری‌های گیاهی ۳۹(۱و۲):۸۵-۷۳.

عباسی‌مقدم، ا. رستگار، م و جعفرپور، ب.۱۳۷۷. اتیولوژی پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند در خراسان. سیزدهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج. صفحه۱۲۵.

محمودی، س. ب. مصباح، م. رحیمیان، ح. علیزاده، ع. نوروزی، پ.۱۳۸۴. تعیین تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* از چغندرقند با استفاده از RAPD-PCR و آنالیز ITS-rDNA. بیماری‌های گیاهی ۴۱(۴):۵۴۲-۵۲۳.

محمدی، ح. بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۸۴. انتشار، بیماری‌زایی و پایداری فوزاریوم‌های مولد پژمردگی و پوسیدگی ریشه نخود در استان فارس. مجله بیماری‌های گیاهی جلد۴۱،۴. ۷۰۸-۶۷۸.

Abawi GS, Crosier DC, Cobb AC, Becke RF (1986) Root rot of table beets in New York State. New York's Food and Life Sciences Bulletin.No:115

Bereneuza T, Brasileiro RV, Coimbra MRM, De Morais MA, De Oliveira NT (2004) Genetic variability within *Fusarium solani* specie as revealed by PCR- fingerprinting based on PCR markers.Braz. J. Microbial., 35 (3): 1-10

Burns TD, White TJ, Tylor JW (1991) Fungal molecular systematics. Ann. Rev. Ecol. System 22: 525-564

Buttner G, Pfahler B, Marlander B (2004) Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to Rhizoctonia root and crown rot. Plant Breeding123: 158-166

Cormarc MW, Moffatt JE (1961) Factors influencing storage decay of sugar beet by *Phoma betae* and other fungi. Phytopathology 51: 3-5

Cook DA, Scott RK (1993) The Sugar beet Crop: Science into Practice. Champan and Hall, New York.675pp

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

Cubeta MA, Vilgalys R (1997) Population biology of *Rhizoctonia solani* complex. Phytopathology 87: 480-484

EdelV Steinberg C, Gautheron N, Alabouvette C (1997) Evaluation of restriction analysis of polymerase chain reaction (PCR)-amplified ribosomal DNA for the identification of *Fusarium* species. Mycological Research,101: 179-187

Gerlach W, Nirenberg H (1982) The Genus Fusarium- a Pictorial atlas. Mitt. Biol. Bund. Land-Forst. 406pp

Grajal-Martin MJ, Simon CJ, Muehlbauer FJ (1993) Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*. Phytopathology 83:612- 614

Hanson LE (2006) Beet Root-rot inducing isolates of *Fusarium oxysporum* from Colorado and Montana. Plant Dis. 90:247

Harveson RM, Rush CM (1997) Genetic variation among *Fusarium oxysporum* isolates from sugar beet as determined by vegetative compatibility. Plant Dis.81:85-88

Lee Y, Choi Y, Min B (2000) PCR-RFLP and sequence analysis of the rDNA ITS region in the *Fusarium* spp. J. Microbiology 38: 66-73

Mirhendi SH, Kordbacheh P, Kazemi B, Samiei S, Pezeshki M, Khoramshahi M (2001) A PCR-RFLP method to identification of the important opportunistic fungi:*Candidia* sp, *Cryptococcus neoformans, Aspergillus famigatus* and *Fusarium solani*. Iranian J.Pub.Health, 30: 103-106

Nelson PE, Toussoun TA, Marasas WFO (1983) Fusarium species: an illustrated manual for identifiation. Pennsylvania state university, University Park and London. 193pp

Ruppel EG, (1991) Pathogenecity of *Fusarium* spp.from diseased sugar beets and variation among sugar beet isolates of *Fusarium oxysporum*. Plant Dis.75:486-489

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional

Salazar O, Julian MC, Rubio V (2000) Primers based on specific rDNA-ITS sequence for PCR detection of *Rhizoctonia solani*, *R. solani* AG-2 subgroups and ecological types ,and binucleate *Rhizoctonia.*Mycological Research 104:281-285

Schneider JHM, Salazar O, Rubio V, Keijer J (1997) Identification of *Rhizoctonia solani* associated with field grown tulips using ITS rDNA polymorphism and pectic zymograms. European Journal of Plant Pathology 103:607-622

Schwartz H, Panella LW, Brick MA, Byrne P F (2001) *Fusarium* wilt and yellows of sugar beet and dry bean. Colorado state University , Cooprative Extension, no:2. 950

Stewart D (1931) Sugar beet yellows caused by *Fusarium conglutinans* var. *betae*. Phytopathology 21:59-70

Sneh B, Burpee LL, Ogoshi A (1991) Identification of *Rhizoctonia* Species.St.Paul-MN APS Press 133p

Seifert K (2000) Fuskey. http:// res.agr.ca/brd/fusarium/home1.html

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M A. Gelfand, D H Sninsky, J Jand White, T J.(eds): PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications, M A INNis Academic Press San Diego.CA.USA. pp 315-322

Weiland JJ (1997) Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia.Fungal Genet. Newsl. 44:60-63

Whithney ED, Duffus EJ (1986)Compendium of beet diseases and Insects. APS press. St. Paul, Minnesota, USA

created with nitroPDF professional
download the free trial online at nitropdf.com/professional