بررسی اختلاف بیماری‌زایی جدایه‌های *Phytophthora capsici* عامل پوسیدگی ریشه و ساقه فلفل جمع‌آوری شده از منطقه ورامین- پیشوا استان تهران

Investigating the pathogenic differences *Phytophthora capsici* isolates, the cause of root rot and pepper stems collected from Varamin-Pishva region

محمد قاسمی[۱]، داریوش شهریاری[۲] و سمیه فراهانی[۳*]

دریافت: ۱۳۹۸/۲/۲ پذیرش: ۱۳۹۸/۶/۱۴

چکیده

شبه قارچ عامل بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه فلفل *Phytophthora capsici* یکی از مخرب‌ترین عوامل کاهنده عملکرد گیاه فلفل در مناطق تحت کشت این محصول در دنیا می‌باشد. این بیمارگر می‌تواند در تمام مراحل رشدی به ریشه‌ها و طوقه گیاه حمله کند و سبب پژمردگی یا مرگ گیاه گردد. در این تحقیق، جدایه‌های شبه قارچ بیمارگر از مزارع و گلخانه‌های فلفل مناطق مختلف شهرستان ورامین از گیاهان بیمار دارای علائم مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه و طوقه و بوته‌میری جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از شستشو و ضدعفونی سطحی، در محیط کشت نیمه انتخابی (CMA+ PARPH) کشت گردیدند. تشخیص گونه بر اساس خصوصیات مورفولوژیک و کلیدهای شناسایی اروین وریبیرو (۱۹۹۶) انجام گرفت. بیماری‌زایی گونه‌ها روی گیاهان میزبان مربوطه به اثبات رسید و تفاوت بیماری‌زایی جدایه پس از مایه‌زنی روی فلفل رقم Plato تعیین گردید. بر اساس نتایج به‌دست آمده از کل نمونه‌برداری‌ها از مناطق مختلف، جمعاً ۱۰ جدایه خالص *P. capsici* به‌دست آمد. جدایه Ph-pi-51 جمع‌آوری شده از روی فلفل از منطقه پیشوا با شاخص شدت بیماری ۹۱/۶ درصد در گروه آماری a با بیش‌ترین میزان بیماری‌زایی به‌عنوان قوی‌ترین بیمارگر قرار گرفت. به ترتیب، جدایه کریم آباد Ph-ka-21، با شاخص شدت بیماری۸۸/۶ در گروه آماری ab با بیشترین بیماری‌زایی بعد از جدایه پیشوا بوده است و همچنین جدایه‌های Ph-ta-16 و Ph-dv-44 با شاخص شدت بیماری ۴۸/۸ و۳۳/۳ کم‌ترین میزان بیماری‌زایی روی فلفل داشته است و در گروه بیمارگرهای با بیماری‌زایی ضعیف قرار گرفتند.

واژگان کلیدی: فلفل، *Phytophthora capsici*، جدایه، بیماری‌زایی

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین –پیشوا، ورامین، ایران

۲- استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات وآموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ورامین، ایران

۳- دانشجوی سابق دکتری، گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین –پیشوا، ورامین، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: somaye.farahani@gmail.com

مقدمه

سطح زیر کشت فلفل در مزارع سراسر کشور بالغ بر ۳۵۰۰ هکتار بر اساس آمارنامه وزارت جهاد کشاورزی با عملکرد ۱۰۵۰۰ تن در سال می‌باشد (بی نام، ۱۳۹۷). ارزش اقتصادی محصولات فلفل (جنس *Capsicum*) در صنایع کشاورزی سالانه در حدود ۱۰۰ میلیون دلار تخمین زده می‌شود. بیماری‌ها و آفات اصلی‌ترین چالش روبروی تولیدکنندگان این محصول در سراسر جهان هستند (Kim and Park, 1988; Sagarpa, 2002; Um, 1998). عامل بیماری *P. capsici* یک بیمارگر خاک‌زاد و یکی از مخرب‌ترین عوامل کاهنده عملکرد گیاه فلفل در مناطق تحت کشت این محصول در دنیا می‌باشد. این بیمارگر به گیاه در تمام مراحل رشدی حمله می‌کند. مهم‌ترین قسمت گیاه که توسط بیمارگر مورد حمله قرار می‌گیرد، ریشه‌ها و طوقه می‌باشد. در مرحله گیاهچه‌ای محل حمله قارچ باریک و نرم می‌شود که در نهایت باعث پژمردگی یا مرگ گیاه خواهد شد. ولی در مرحله رشد کامل به‌ویژه در زمان تولید میوه با پوسیدگی و تخریب ناحیه ریشه و طوقه سبب خسارت سنگین به محصول می‌شود (Babadoost and Islam, 2003; Gallegly and Hong, 2008; Erwin and Ribeiro, 1996).

علی‌رغم تلاش‌های متعدد صورت گرفته به منظور کنترل بیماری توسط سموم شیمیایی (Jee *et al.*, 1988; Oelke *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2002) و روش‌های بیولوژیکی (Oelke *et al.*, 2003; Hausbeck and Lamour, 2004; Ahn and Hwang, 1992)، کنترل بیماری در شرایط مزرعه اغلب موفقیت‌آمیز نبوده و به دلیل مشکلات کنترل این بیمارگر، توسعه پایدار ارقام فلفل قرمز مقاوم به پوسیدگی ریشه به منظور دست‌یابی به محصولات پایدارتر فلفل قرمز قویاً پیشنهاد می‌گردد (Jee *et al.*, 1988).

دباری (۱۸۷۶) جنس Phytophthora را به‌عنوان یک گروه مهم از عوامل بیمارگر گیاهی معرفی و گونه *P. infestans* de Bary (Montagne) را به‌عنوان گونه پایه آن معرفی نمود. پس از آن گونه *P. cactorum* Schroeter (Lebertand and Cohn) در سال ۱۸۸۶ میلادی توصیف شد و به‌تدریج گونه‌های دیگری از میزبان‌های مختلف جداسازی و نام‌گذاری گردیدند (Waterhouse, 1963). تاکر (Tucker, 1931)، اولین مونوگراف در خصوص جنس Phytophthora را به رشته تحریر درآورد. لئونین کلید تشخیص ۲۲ گونه را ارائه نمود (Leonian, 1934). سپس واترهاوس (Waterhouse, 1963)، با انجام مطالعات وسیع، بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی ۳۷ گونه را در شش گروه قرار داد. در سال ۱۹۷۸ با کامل‌تر شدن مطالعات در خصوص این موجودات، واترهاوس و همکاران اولین کلید جدولی را برای ۵۰ تاکسون Phytophthora (۴۳ گونه و ۷ واریته یا فرم ریخت‌شناسی) ارائه نمودند. در این کلید نیز همانند کلید اولیه واترهاوس (Waterhouse, 1963, 1970) ارائه شده بود و گونه‌ها به شش گروه اصلی تقسیم شدند؛ و پنج گونه جدید نیز به آن اضافه گردید. در سال ۱۹۸۳ با اضافه شدن یک گونه دیگر تعداد گونه‌های معتبر تا آن تاریخ به ۴۴ گونه رسید (Waterhouse *et al.*, 1983). به‌تدریج تعداد تاکسون‌ها به ۶۷ (گونه و واریته) افزایش یافت (Stamps *et al.*, 1990).

جنس فیتوفتورا بیش از ۶۰ گونه مورفولوژیک دارد و از این لحاظ که تمام گونه‌های آن به استثناء گونه آب‌زی و پوده‌زیست *Phytophthora ganapodyiedes* (Peterson) Buismen، بیمارگرهای گیاهان عالی هستند، در میان بیمارگرهای غیراجباری گیاهان از وضعیتی منحصر بفرد برخوردار است (Brassier, 1992). گونه‌های فیتوفتورا به‌عنوان عامل بیماری‌های مختلف در تعداد زیادی از گیاهان زراعی، صیفی و جالیز شناخته شده‌اند که در اثر حمله به گیاه، علائمی مانند مرگ گیاهچه، سوختگی اندام‌های هوایی، پوسیدگی میوه، ساقه، طوقه و ریشه ایجاد کرده و در اکثر موارد هم منجر به مرگ میزبان می‌شوند. عامل بیماری خاک‌زاد بوده و کنترل آن به دلیل طیف میزبانی وسیع و بقاء طولانی در خاک مشکل می‌باشد (ارشاد و مستوفی‌پور، ۱۳۴۸). هاس‌بک و لامور (Hausbeck and Lamour, 2004) گونه *P. capsici* را به‌عنوان یک

فاکتور محدود کننده فلفل گلخانه‌ای در چند منطقه از ایالات متحده و میشیگان معرفی نمودند. پوسیدگی طوقه و ریشه فلفل گلخانه‌ای از نروژ (Herrero *et al.*, 2008)، جنوب شرق اسپانیا (Herrero and Tello, 2002) و مکزیک (Fernandez-Pavia and Rodriguez, 2006) مورد بررسی قرار گرفت و عامل آن *P. capsici* گزارش گردید که بیماری‌زایی آن را روی ارقام مختلف انجام دادند. سپس گونه *P. capsici* به عنوان یک قارچ با پتانسیل بالا حتی در مایه تلقیح اندک معرفی شد (Polach and Webster, 1972). در پژوهش‌های دیگری مشاهده شد که میسلیوم و اسپورانژیوم‌های *P. capsici* در شرایط رطوبتی و حرارتی ۲۸-۲۵ درجه سلسیوس باعث بیماری می‌شود (Hausbeck and Lamour, 2004). همچنین دما و غلظت مایه تلقیح از عوامل بسیار مهم در ایجاد و شدت بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه توسط *P. capsici* معرفی شدند (Herrero *et al.*, 2008). ارشاد و هیله (Ershad and Hille, 1975) بیماری بوته‌میری فلفل را از مزارع فلفل گرمسار، ورامین، پیشوا، کهریزک، شهریار، دماوند و گرگان مشاهده و *P. capsici* را از نسوج آلوده ریشه، طوقه و ساقه گیاهان فلفل جدا کردند. بعدها همین گونه به‌عنوان عامل بلایت گیاهچه فلفل قرمز از آرژانتین، کره و چین نیز گزارش شد (Godoy, 1940) دارد. بر اساس گزارشی از استان آذربایجان شرقی، بوته‌های فلفل در تمام مراحل رشد به بیماری مبتلا می‌شوند. بیماری با ایجاد زخم‌های قهوه‌ای در ریشه و طوقه همراه بود. در چند مزرعه واقع در منطقه کوشک که تراکم کشت و رطوبت بالایی داشتند، آلودگی مستقیم ساقه‌ها در ارتفاع ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متری به‌صورت لکه‌های قهوه‌ای تیره، بدون ارتباط با آلودگی ریشه رؤیت شده و از کشت این ساقه‌ها *P. capsici* جداسازی شد. همچنین از بوته‌های جمع‌آوری شده از ایلخچی، عجب‌شیر، کوشک و ملکان، *P. capsici* جداسازی شد. امتی و کریمی (۱۳۷۷) همچنین این گونه را از فلفل با علائم بوته‌میری در فرومد شاهرود جداسازی و گزارش کردند. بعدها این گونه به‌عنوان عامل بلایت گیاهچه فلفل قرمز از آرژانتین (Godoy, 1940)، کره (Kim *et al.*, 1975) و چین (Ho *et al.*, 1984) نیز گزارش شد. نظر به این‌که این بیمارگر یکی از عوامل مخرب برای کشت فلفل در ایران به شمار می‌آید و تاکنون مطالعه‌ای در مورد اختلاف بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف این بیمارگر بر روی فلفل انجام نگرفته است، لذا در این پژوهش اختلاف بیماری‌زایی جدایه‌های منطقه ورامین مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

به منظور جمع‌آوری و جداسازی و خالص‌سازی قارچ، در سال ۱۳۹۴ از مزارع وگلخانه‌های مختلف فلفل در شهرستان ورامین بازدید شد و بوته‌هائی که دارای علائم پژمردگی و سبز خشکی بوته با پوسیدگی یا تغییر شکل در ناحیه طوقه یا تغییر رنگ در محل بافت پوستی به صورت قهوه‌ای بودند، جمع‌آوری شدند. نمونه درون پاکت‌های کاغذی قرار داده و سپس در آزمایشگاه بعد از کدگذاری اقدام به جداسازی قارچ عامل بیماری گردید. در آزمایشگاه بافت‌های آلوده به مدت ۲-۱ دقیقه با آب شهری با ملایمت شسته شدند تا قارچ‌های سطحی پوده‌زی و مواد اضافی سطح بافت شسته شوند. سپس بافت به قطعات ۵-۲ میلی‌متری تقسیم گردید و با کاغذ حوله‌ای خشک گردید و بدون ضدعفونی سطحی روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP (شامل پودر ذرت ۴۰ گرم و آگار ۱۸ گرم در یک لیتر آب مقطر و آنتی‌بیوتیک‌های دلواسید (پیمارسین ۵۰٪) ۲۰ میلی‌گرم، آمپی سیلین ۲۵۰ میلی‌گرم، ریفامپسین ۱۰۰ میلی‌گرم و PCNB به مقدار ۱۵ میلی‌گرم که به محیط کشت CMA در دمای ۴۰-۴۵ درجه سلسیوس اضافه شدند) کشت داده شدند. سپس تشتک‌های پتری در انکوباتور در دمای $25^{\circ}C$ نگهداری شدند (Kannwischer and Mitchell, 1981). برای خالص‌سازی پرگنه‌ها به روش نوک ریسه، بلوک‌های میسلیومی ۶-۵ میلی‌متری از حاشیه پرگنه‌های جوان در حال رشد روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP به محیط کشت آب آگار (WA) ۲٪ انتقال داده شدند. بعد از ۴۸-۲۴ ساعت با استفاده از روش نوک ریسه،

قطعات جدا شده به محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP منتقل شدند (Ribeiro, 1978).

به منظور مشاهده مقدماتی قارچ‌هایی که روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP رشد نمودند، تعدادی بذر گیاه شاه‌دانه انتخاب شدند و قطعات مکعبی هویج به ابعاد پنج میلی‌متر که قبلاً به مدت ۲۰ دقیقه جوشانده و کاملاً خشک شده، روی پرگنه‌های جوان مورد نظر قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت در۲۰ درجه سیلسیوس، به تشتک‌های پتری دارای آب مقطر سترون و عصاره خاک ۱٪ منتقل و در زیر نور دائم (به فاصله ۳۰ سانتی‌متری) قرار داده شدند. بذرهای شاه‌دانه و مکعب‌های ۵ میلی‌متری هویج دارای میسلیوم قارچ بعد از ۲۴ ساعت تا مدت ۴۵ روز جهت تشکیل اسپورانژیوم و رهاسازی زئوسپور، تولیدکلامیدوسپور و آماس ریسه، نگـهداری گردیدند (قادری و همکاران، ۱۳۹۰). به منـظور تولید ااسپور از محیط‌های کشت لوبیا چیتی-آگار و تکه هویج استفاده شد (ارشاد، ۱۳۷۱). برای شناسایی گونه‌های فیتوفتورا، خصوصیات مورفولوژیکی اندام‌های رویشی و تولیدمثلی شامل: ویژگی‌های ریسه، نحوه اتصال آنتریدیوم با ااگونیوم (آمفیژینوس یا پاراژینوس)، ریخت‌شناسی اسپورانژیوم (سیلندری، تخم‌مرغی، گلابی وارونه، لیمویی و کروی) و وضعیت پاپیل (پاپیل بزرگ، کوچک و بدون پاپیل)، ریزان یا غیر ریزان بودن اسپورانژیوم، تولیدمثل جنسی (هموتالیک یا هتروتالیک بودن) مورد بررسی قرار گرفت. تشخیص جـدایـه‌ها بر اسـاس کلیدهای شـناسایی مـعتبر و منابـع موجود (Erwin and Ribeiro, 1996; Waterhouse, 1963, 1970; Stamps *et al*., 1990) انجام گرفت.

به منظور انجام آزمون بیماری‌زایی کنه‌های جنس فیتوفتورا در گلخانه، اقدام به تولید گیاهچه‌های فلفل گردید. بذرهای فلفل رقم Plato (حساس به بیماری)، تهیه شد و به مدت ۲ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ ضدعفونی سطحی گردید. پس از ۱۲ ساعت خیساندن، بذرها در سینی‌های کشـت حـاوی خاک استـریل در شرایـط گلخـانه کاشـته شـدنـد. در روی آن-ها به ارتـفاع ۰/۵ سـانتی‌مـتر خـاک ریختـه و سیـنی‌هـا به‌صـورت روزانـه آبیـاری شدند (قادری و همکاران، ۱۳۹۰؛ Nazavari *et al*., 2016).

به منظور تهیه زادمایه بیمارگر، ابتدا درکیسه‌های پلاستیکی مقاوم به اتوکلاو، ۲۰۰ کیلوگرم ورمی‌کولیت ریخته شد و به آن ۱۲۰ میلی‌لیتر عصاره شاه‌دانه (عصاره ۶۰ گرم بذر شاه‌دانه در لیتر) اضافه گردید. سپس به مدت یک ساعت در اتوکلاو سترون شد. دو تا سه روز بعد، از پرگنه جدایه مورد نظر که قبلاً روی محیط کشت نیمه انتخابیCMA-PARP رشد کرده بودند، هشت بلوک میسلیومی به قطر ۶ میلی‌متر به کیسه‌های پلاستیکی اضافه شد. کیسه‌های پلاستیکی به مدت ۴ هفته در دمای $^{\circ}C$ ۲۵ و در تاریکی قرار داده و هر هفته کیسه‌های حاوی مایه بیمارگر برای چند دقیقه تکان داده شدند تا رشد بیمارگر در داخل کیسه‌ها به‌طور یکنواخت صورت گیرد (بنی‌هاشمی و فاتحی، ۱۳۶۸؛ نعمتی و بنی‌هاشمی، ۱۳۹۴).

برای مایه‌زنی گیاهچه‌های فلفل، از گیاهچه‌های دو هفته‌ای فلفل رقم حساس Plato برای مایه‌زنی استفاده شد. پس از انتقال نشاءها به گلدان‌ها، خاک اطراف هر گیاهچه تا عمق سه سانتی‌متری کنار زده و ۱۰ میلی‌لیتر از مایه تلقیح تهیه شده از هر جدایه به روش گفته شده (زادمایه قارچ در ورمی‌کولیت-عصاره شاه‌دانه) در اطراف طوقه و ریشه هر گیاهچه قرار داده شدند. گیاهچه‌های شاهد سالم نیز به همین روش با ورمی‌کولیت دارای عصاره شاه‌دانه سترون مایه‌زنی شدند. گلدان‌ها به مدت ۴۸ ساعت به حالت غرقابی آبیاری شدند، سپس آبیاری به‌صورت معمول انجام گرفت. گلدان‌ها در گلخانه با حداکثر دمای ۴۲-۳۷ درجه سیلسیوس و حداقل دمای ۲۰-۱۵ درجه سیلسیوس نگهداری شدند. برای هر تیمار چهار گلدان (هر گلدان دو گیاهچه) در نظر گرفته شد. بعد از ظهور علائم، تعداد گیاهچه‌های از بین رفته ثبت و درصد مرگ گیاهچه محاسبه گردید. برای تأیید حضور بیمارگر Phytophtora به‌عنوان عامل بیماری و تکمیل اصول کخ، گیاهچه‌های آلوده از خاک خارج و جداسازی مجدد از ریشه و طوقه گیاهان صورت گرفت. بافت‌های ریشه و طوقه برخی گیاهان آلوده بر روی محیط‌های کشتی که قبلاً توضیح داده شد، کشت داده شدند و خصوصیات مرفولوژیکی و تاکسونومیکی آن‌ها زیر

میکروسکوپ با صفات جدایه‌های مایه‌زنی شده مطابقت داده شدند. این آزمـون در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح احتمال ۱٪ صورت گرفت (بنی‌هاشمی و فاتحی ۱۳۶۸؛ نعمتی و بنی‌هاشمی، ۱۳۹۴؛ Nazavari *et al.*, 2016).

برای تعیین تفاوت بیماری‌زایی جدایه‌های جمع‌آوری شده، ارزیابی از شدت پوسیدگی ریشه و طوقه فیتوفتورایی هر دو روز یک‌بار تا ظهور کامل علایم بیماری در شاهد حساس (به‌طور متوسط ۳۰ روز بعد از مایه‌زنی) بر اساس مقیاس ۵ نمره‌ای گلسیر و همکاران (Glosier *et al.*, 2008) (۱= سالم، ۲= پژمردگی جزئی (۳۰٪)، ۳= پژمردگی متوسط (۵۰٪)، ۴= پژمردگی شدید (۹۰٪) و ۵= مرگ کامل گیاه) انجام شد. پس از ثبت علائم ،شاخص شدت بیماری DSI با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$DSI = \frac{\sum i \times P_i}{i_{max} \times P_{total}} \times 100$$

در این فرمول i نمره آلودگی، Pi تعداد گیاهان با نمره مشابه i، i_{max} بالاترین نمره آلودگی و P_{total} تعداد کل گیاهان مایه‌زنی شده بودند. این آزمایش بر اساس طرح آماری کاملاً تصادفی در گلخانه بیماری‌شناسی گیاهی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران در ورامین و با چهار تکرار انجام شد. تعداد تیمارها به تعداد جدایه‌های تهیه شده قارچ *P.capsici* و یک تیمار شاهد بدون آلودگی نیز منظورگردید.

نتایج و بحث

در اولین مرحله به هجده منطقه شهرستان ورامین مراجعه شد. در اغلب مزارع بر اثر حمله بیمارگر، علائمی نظیر مرگ گیاهچه‌ها در اوایل رشد و همچنین پژمردگی، سبزخشک شدن و در نهایت مرگ گیاهان کامل به‌صورت پراکنده مشاهده شد. بیماری با ایجاد زخم‌های قهوه‌ای در ریشه و طوقه همراه بود. در مزارع واقع در منطقه پیشوا با تراکم کشت و رطوبت بالا، آلودگی مستقیم ساقه‌ها در ارتفاع بالای خاک تا ۲۰ سانتی‌متری بوته به صورت لکه‌های قهوه‌ای تیره، بدون ارتباط با آلودگی ریشه رؤیت شد. از بافت‌های آلوده ۱۰ جدایه قارچ *Phytophthora* جمع‌آوری شدند که به شرح جدول ۱ بر حسب منطقه کدگذاری شدند.

جدول۱- مناطق جمع‌آوری نمونه‌های فلفل آلوده به بیماری بوته‌میری در سال ۱۳۹۶ و ۱۳۹۷

Table 1. Collection areas of pepper specimens infected with plant death in 2017 and 2018

ردیف No.	Country	شهرستان	Location	منطقه	قارچ به‌دست آمده Isolated fungus	کد نمونه Sample code
1	Pishva	پیشوا	Tarand	طارند	Phytophthora	Ph-ta-15
2	Pishva	پیشوا	Tarand	طارند	Phytophthora	Ph-ta-16
3	Pakdasht	پاکدشت	Karimabad	کریم آباد	Phytophthora	Ph-ka-19
4	Varamin	ورامین	Khaveh	خاوه	Phytophthora	Ph-kh-26
5	Varamin	ورامین	Toghan	طغان	Phytophthora	Ph-to-31
6	Pakdasht	پاکدشت	Afarin	آفرین	Phytophthora	Ph-af-42
7	Varamin	ورامین	Davvodabad	داود آباد	Phytophthora	Ph-dv-44
8	Pishva	پیشوا	Pishva	پیشوا	Phytophthora	Ph-pi-51
9	Pishva	پیشوا	Pishva	پیشوا	Phytophthora	Ph -pi-52
10	Varamin	ورامین	Varamin	ورامین	Phytophthora	Ph-va-55

به منظور اثبات بیماری‌زایی، ابتدا قارچ بیمارگر از روی نمونه‌های جمع‌آوری شده جداسازی و خالص‌سازی شد و بر اساس مناطق جمع‌آوری شده کدگذاری شدند، سپس روی گیاه فلفل رقم Plato، اثبات بیماری‌زایی انجام گردید. بر اساس عکس‌العمل فلفل به قارچ *Phytophthora* اولین علائم بیماری یک هفته بعد از مایه‌زنی مشاهده گردید. تمام بوته‌های فلفل در اثر مایه‌زنی علائم پوسیدگی طوقه و ریشه به‌صورت تغییر رنگ بافت در ناحیه ساقه بالای خاک و سپس تیرگی در بافت و نهایتاً باریک شدن ناحیه طوقه و مرگ گیاه را نشان دادند.

از نظر علائم ماکروسکوپی،کلنی یا کشت فیتوفتورا روی محیط کشت‌های آگاردار رشد نسبتاً سریعی داشت و از پشت تشتک پتری منظره‌های متفاوتی را نشان می‌داد. از بالا به صورت پرزدار و میسیلیوم هوایی و یا بدون هیچ‌گونه پرز در سطح مشاهده گردید. همان‌طورکه در شکل ۱ نشان داده شده است، قارچ به‌صورت شعاعی، گل‌سرخی، گل داوودی، شعله‌ای، دایره‌ای، کلم‌گلی کاملاً یکنواخت و بدون ساختار رشد کرده و نامنظم بود. میسیلیوم‌ها بی‌رنگ و به‌صورت توده سفید رنگ بودند.

شکل ۱- پرگنه قارچ *Phytophthora capsici*

Fig. 1. *Phytophthora capsici* fungus

تشخیص گونه‌های قارچی با استفاده از کلیدهای معتبر در شرایط نگهداری استاندارد روی محیط کشت‌های WA, PDA, CMA صورت گرفت (Waterhouse, 1963, 1970; Erwin and Ribeiro, 1996). نمونه‌هایی که آلودگی بیش‌تری داشتند در محیط کشت اختصاصی PARPH نیز کشت داده شدند و گونه‌های فیتوفتورای و پیتیوم رشد کرده به محیط‌های CMA, PDA منتقل شدند. برای تعیین خصوصیات پرگنه و خصوصیات میکروسکوپی از محیط کشت PDA و CMA استفاده شد.

از نظر خصوصیات کلیدی میکروسکوپی، ریسه‌های Phytophthora معمولاً در طول دارای ضخامت غیر یکنواخت و اغلب با برجستگی‌های گره مانند، اسپورانژیوفور معمولاً باریک، طویل، گاهی قابل تمیز از ریسه‌های معمولی، غیر منشعب یا به‌صورت سیمپودیال منشعب در محل اسپورانژ به‌صورت انتهایی، شکل اسپورانژها بیضوی تخم‌مرغی و گلابی وارونه، کروی یا نزدیک به کروی می‌باشد و محل تشکیل زئوسپور درون اسپورانژ بودند. پاپیل‌ها بزرگ و برجسته یا فاقد پاپیل بوده و مقر آنتریدی در اووگن پاراژن یا آمفیژن بود. این جدایه تحت نام *Phyophthora capsici* تشخیص داده شد (Erwin and Ribeiro, 1996).

در این آزمایش ده جدایه *P. capsici* که اثبات بیماری‌زائی شده بودند، روی فلفل رقم Plato مایه‌زنی شدند. داده‌های آزمایش ۲۸ روز بعد از مایه‌زنی بر اساس مقیاس ۵ نمره‌ای گلسیر و همکاران (Glosier *et al.*, 2008) (۱= سالم، ۲= پژمردگی جزئی، ۳= پژمردگی متوسط، ۴= پژمردگی شدید و ۵= مرگ کامل گیاه) یادداشت برداری شدند و شاخص شدت

بیماری محاسبه گردید. داده‌های به‌دست آمده با نرم‌افزار SPSS مورد تجزیه واریانس یک طرفه قرار گرفتند و میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱٪ مقایسه شدند. نتایج حاصل نشان داد جدایه‌ها در سطح احتمال یک درصد با هم اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس شاخص شدت بیماری جدایه‌های *P. capsici* روی فلفل رقم Plato

Table 2. Variation index of disease severity index *P. capsici* isolates on Plato pepper

Source of Variation (SOV)	منابع تغییر	درجه آزادی Degree of Freedom (df.)	میانگین مربعات Mean of Squares
Replication	تکرار	3	151.4
Treatment	تیمار	10	32769.11
Error	خطاء	30	595.6
CV (%)	درصد ضریب تغییرات	7.16	

در بررسی مقایسه میانگین‌ها مشخص شد، جدایه Ph-pi-51 از روی فلفل جمع‌آوری شده از منطقه پیشوا با شاخص شدت بیماری ۹۱/۶ درصد در گروه آماری a با بیش‌ترین میزان بیماری به‌عنوان قوی‌ترین بیمارگر از نظر ایجاد بیماری قرار گرفت. در ادامه، جدایه کریم‌آباد Ph-ka-21، با شاخص شدت بیماری ۸۸/۶ در گروه آماری ab با بیش‌ترین بیماری‌زایی بعد از جدایه پیشوا بوده است و به ترتیب جدایه‌های Ph-ka-19، Ph-kh-26، Ph-to-31، Ph-af-42، Ph-pi-15، Ph-va-55، Ph-ta.16 و Ph-dv-44 در گروه‌های آماری b الی d با بیش از ۵۰ درصد شدت بیماری در گروه دوم بیمارگرها با شدت بیماری‌زایی بالا قرار گرفتند. در عین حال، جدایه‌های Ph-ta-16 و Ph-dv-44 به ترتیب با شاخص شدت بیماری‌زایی ۴۸/۸ و ۳۳/۳ کم‌ترین میزان بیماری روی فلفل داشته است و در گروه بیمارگرهای با بیماری‌زایی ضعیف قرار گرفتند (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین شاخص شدت بیماری جدایه‌های *P. capsici* روی فلفل رقم Plato

Table 3. Comparison of mean disease severity index *P. capsici* isolates on pepper Plato

شماره No.	نام جدایه Isolate Code	شدت شاخص بیماری (درصد) Mean disease severity index	
1	Ph-pi-51	91.6	a
2	Ph-ka-21	88.6	ab
3	Ph-ka-19	83.3	b
4	Ph-kh-26	78.3	c
5	Ph-to-31	76.6	c
6	Ph-af-42	65.0	d
7	Ph-pi-15	63.3	d
8	Ph-va-55	63.3	d
9	Ph-ta-16	48.8	e
10	Ph-dv-44	33.3	f
11	Chek	2.0	h

میانگین‌ها با حروف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ هستند.

Means with similar letters have no significant difference in probability level of 1%

ارزش اقتصادی محصولات فلفل (جنس *Capsicum*) در صنایع کشاورزی سالانه در حدود ۱۰۰ میلیون دلار تخمین زده می‌شود. بیماری‌ها و آفات اصلی‌ترین چالش روبروی تولیدکنندگان این محصول در سراسر جهان می‌باشد(Kim and Park, 1988; Sagarpa, 2002; Um, 1998). جنس فیتوفتورا با بیش از ۶۰ گونه مورفولوژیک، اغلب به گیاهان عالی حمله کرده و در میان بیمارگرهای غیر اجباری گیاهان از وضعیتی منحصر بفرد برخوردار است

(Brassier, 1992). گونه‌های فیتوفتورا به‌عنوان عامل بیماری‌های مختلف در تعداد زیادی از گیاهان زراعی، صیفی و جالیز شناخته شده‌اند که در اثر حمله به گیاه، علائمی مانند مرگ گیاهچه، سوختگی اندام‌های هوایی، پوسیدگی میوه، ساقه، طوقه و ریشه ایجاد کرده و در اکثر موارد هم منجر به مرگ گیاه می شوند. بررسی‌های انجام شده در این تحقیق به روش مورفولوژیکی نشان دهنده این بود که گونه قارچی بیماری‌زای گیاه فلفل در شهرستان ورامین *P. capcisi* می‌باشد. در این بررسی در مجموع ۱۰ جدایه قارچ فیتوفتورا به دست آمد که بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و پاره‌ای از ویژگی‌های فیزیولوژیک با استفاده از کلید شناسایی معتبر این جنس شناسایی شدند. این نتایج تا حدودی با گزارش‌های Katsura *et al.* (1971) و فاتیما و همکاران Fatima *et al.* (2009) مطابقت دارد و همچنین با کارهای شکاری و همکاران (۱۳۸۵) هم‌خوانی دارد.

در این بررسی فقط گونه *P. capsici* ازگیاهان و مناطق آلوده شهرستان ورامین جداسازی شد. جمعیت کم پاتوژن و عدم جداسازی گونه‌های دیگر، دلیل بر نبود آن‌ها در منطقه نیست. عدم موفقیت در جداسازی عامل بیماری ممکن است به علت کاهش زادمایه قارچ در اثر عوامل ناشناخته محیطی خاک باشد. گونه‌های مختلف جنس *Phytophthora* به‌طور کلی دارای قدرت ساپروفیتی و رقابتی کمی هستند و در غیاب میزبان و شرایط نامطلوب برای توسعه بیماری، به شدت جمعیت آن‌ها در خاک کاهش می‌یابد (Kannwischer and Mitchell, 1981).

منابع References

ارشاد، ج. ۱۳۷۱. گونه‌های *Phytophthora* در ایران. انتشارات سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران. ۲۱۷ صفحه.

ارشاد، ج. و مستوفی پور، پ. ۱۳۴۸. بوته‌میری جالیز در ایران. بیماری‌های گیاهی ۵(۲): ۴۵-۳۸.

امتی، ف. و کریمی، ع. ۱۳۷۷. بررسی بوته‌میری در فرومد شاهرود. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، آموزشکده کشاورزی کرج. صفحه ۱۷۳.

بنی‌هاشمی، ض. و فاتحی، ج. ۱۳۶۸. واکنش ارقام کدوئیان به *Phytophthora drechsleri* و *Phytophthora capsici* در گلخانه. خلاصه مقالات نهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، مشهد. صفحه ۸۹.

بی‌نام، ۱۳۹۷. آمارنامه کشاورزی، جلد دوم. وزارت جهاد کشاورزی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات. ۴۴۲ صفحه.

شکاری، ا.، میرابوالفتحی، م.، محمدی‌پور، م.، زاد، .ج. و اخوت، م. ۱۳۸۵. پوسیدگی فیتوفتورایی ریشه و طوقه تعدادی از گیاهان زراعی و صیفی و جالیز در استان آذربایجان شرقی. بیماری‌های گیاهی ۲: ۳۰۸-۲۹۳.

قادری، ف.، عسکری، ش. و 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: ۴۶-۳۱.

نعمتی، ز. و بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۹۴. واکنش ارقام مختلف کدوییان به *P. drechsleri* و *P. melonis* در شرایط گلخانه. بیماری‌های گیاهی ۵۱: ۳۸۴-۳۷۵.

Ahn, S. J. and Hwang, B. K. 1992. Isolation of antibiotic producing actinomycetes antagonistic to *Phytophthora capsici* from pepper-growing soils. Korean Journal of Mycology 20: 259-268.

Babadoost, M. and Islam, S. Z. 2003. Fungicide seed treatment effects on seedling damping-off of pumpkin caused by *Phytophthora capsici*. Plant Disease 87: 63-68.

Brassier, C. M. 1992. Evoltionary biology of *Phytophthora*. Annual Review of Phytopathology 30: 153-171.

Ershad, D. and Hille, M. 1975. Study of pepper root rot in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 11: 21-29.

Erwin, D. C. and Ribeiro, O. K. 1996. *Phyophthora* diseases worldwide. APS Press. St. Paul, Minn. USA. 562 pp.

Fatima, N., Batool, H., Sultana, V., Ara, J. and Ehteshamolhaque, S. 2009 Prevalence of post-harvest rot of vegetables and fruits in Karachi, Pakistan. Pakistan Journal of Botany 41(6): 3185-3190.

Fernandez-Pavia, S. P. and Rodriguez, G. 2006. First report of *P. capsici* causing wilt on hydroponically grown cucumber in Mexico. Plant Disease 90: 12. 1552.

Gallegly, M. C. and Hong, C. 2008. *Phytophthora*, identifying species by morphology and DNA fingerprints. Journal of Plant Protection Research 48(3): 274.

Glosier, B. R., Ogundiwin, E. A., Sidhu, G. S., Sischo, D. R. and Prince, J. P. 2008. A differential series of pepper (*Capsicum annuum*) lines delineates fourteen physiological races of *Phytophthora capsici*. Euphytica 162(1): 23-30.

Godoy, E. F. 1940. Mildew of pimiento caused by *Phytophthora capsici* in Argentina. Revista de la Facultad Agronomia 24: 235-280.

Hausbeck, M. K. and Lamour, K. H. 2004. *Phytophthora capsici*on vegetable crops: research progress and management challenges. Plant Disease 88: 1292-1303.

Herrero, M. L., Brurberg, M. B. and Hermansen, A. 2008. First report of crown and root rot caused by *Phytophthora capsici* on hydroponically grown Cucumbers in Norway. Plant Disease 92(7): 1138.

Herrero, M. L. and Tello, J. C. 2002. First Report of *P. capsici* on cucumber in southeastern spain. Plant Disease 86: 5. 558.

Ho, H. H., Lu, J. Y. and Gong, L. Y. 1984. Mating types of heterothallic species of *Phytophthora* in China. II. Acta Mycology 3: 29-32.

Jee, H. J., Nam, C. G. and Kim, C. H. 1988. Studies on biological control of *Phytophthora* blight of red-pepper I. Isolation of antagonists and evaluation of antagonistic activity *in vitro* and in greenhouse. Korean Journal Plant Pathology 4: 305-312.

Katsura, K. 1971. *Phytophthora* disease of plants. Seibundoshinko, Tokyo. 128 pp.

Kannwischer, M. E. and Mitchell, D. J. 1981. Relationships of numbers of spores of *Phytophthor*a *parasitica var nicotianae* to infection and mortality of tobacco. Phytopathology 71: 69-73.

Kim, C. H. and Park, K. S. 1988. A predictive model of disease progression of red-pepper anthracnose. Korean Journal of Plant Pathology 4: 325-331.

Leonian, L. H. 1934. Identification of *Phytophthora* species. Bulletin of Agricultural Experiments Station, West Virginia University. 36pp.

Margulis, L. and Schwartz, K. V. 2000. Five kingdoms: an illustrated guide to the phyla of life on earth. W. H. Freeman and Co., New York, USA.

Nazavari, K. H., Jamali, F., Bayat, F. and Modarresi, M. 2016. Evaluation of resistance to seedling damping-off caused by *Phytophthora drechsleri* in cucumber cultivars under greenhouse conditions. Biological Forum 8: 54-60.

Oelke, L. M., Bosland, P. W. and Steiner, R. 2003. Differentiation of race specific resistance to Phytophthora root rot and foliar blight in *Capsicum annuum*. Journal of American Society of Horticultural Science 128: 213-218.

Polach, F. J. and Webster, R. K. 1972. Identification of strains and inheritance of pathogenicity in *Phytophthora capsici*. Phytopathology 62: 20-26.

Ribeiro, O. K. 1978. A source book of the genus *Phytophthora*. Vaduz**,** Liechtenstein: J. Cramer. 417 pp.

Sagarpa, 2002. Programma agrícola de los ciclos 0.1.2001/2002 .pv. 2002/2003.

Shen, S. S., Choi, O. H., Lee, S. M. and Park, C. S. 2002. *In vitro* and *In vivo* activity of a biocontrol agent, *Serratia plymurhica* A21-4, against *Phytophthora capsici*. Plant Pathology Journal 18: 221-224.

Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., New Hook, F. and Hall, G. S. 1990. Revised tabular key to the species of *Phytophthora*. Mycological Papers 162: 28pp.

Tucker, C. M. 1931. Taxonomy of the genus *Phytophthora* de Bary. Research Bulletin of the Missouri Agricultural Experiment Station 153: 188.

Um, K. H. 1998. Conidia germination and appressorium formation of *Colletotrichum* spp. isolate pepper fruits. MS Dissertation. Seoul National University.

Waterhouse, G. M. 1963. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycological Paper 92: 30pp.
Waterhouse, G. M. 1970. The Genus *Phytophthora* deBary. Mycological Paper12: 259 pp.
Waterhouse, G. M., Newhook, F. J. and Stamps, D. J. 1983. Present criteria for classification of *Phytophthora*. Pp:139-147. In: Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S. and Tsao, P. H. (eds.) Phytophihora Its biology, taxonomy, ecology and pathology. APS. St. Paul.

Investigating the pathogenic differences *Phytophthora capsici* isolates, the cause of root rot and pepper stems collected from Varamin-Pishva region

M. Ghasemi[1], D. Shahriari[2*] and S. Farahani[3]

Received: 22 Ap., 2019 Accepted: 5 Sep., 2019

ABSTRACT

Phytophthora capsici, is one of the most destructive factors of pepper crown and root rot in pepper cultivation regions across the world. This pathogen attacks the roots and crown of the plant at all growth stages and causes the wilt or death of the plant. In this study, fungus isolates collected from the pepper fields and greenhouses in different regions of Varamin and plants with symptoms of damping-off, root and crown rot. Samples were cultivated in semi-selective Phytophthora culture medium (CMA + PARPH) after washing and disinfection. Cultivars were identified on morphological characteristics and identification keys of Erwin Verbieru (1996). The pathogenicity of the species was demonstrated on host plants and the isolate pathogenicity was determined after inoculation on Plato sensitive cultivar by Golsir *et al*. methods. According to results from all sampling from different regions, a total of 10 pure *P. capsici* isolates were obtained. The Ph-pi-51 isolate collected from pepper from Pishva region with a disease severity index of 91.6% was in the statistical group "a" with the highest rate of pathogenesis as the most destructive pathogen. Karimabad Ph-ka-21 isolate, with a disease severity index of 88.6 in the ab statistical group, was the most pathogenic after the first isolate. Also the Ph-ta-16 and Ph-dv-44 isolates with the disease severity index of 48.8 and 33.3 had the lowest rates of disease on pepper and were included in the group of isolates with low pathogenicity.

Keywords: Pepper, *Phytophthora capsici*, isolate, pathogenicity

1 Former MSc. Student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2. Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Tehran Agricultural and Natural Resources Research and Education, Varamin, Iran.

3. Former PhD Student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

Corresponding author: somaye.farahani@gmail.com