

بررسی تاکسونومی و بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری شانکر ساقه و ریشه لوبیا در استان خراسان شمالی

پریسا طاهری^{۱*} و ضحی درودی^۲

۱- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

۲- دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۳/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۹/۲۰

چکیده

به منظور شناسایی گروه‌های مختلف تاکسونومیک ریزوکتونیا بیماری‌زا در لوبیاقرمز، از گیاهان آلوده به این بیماری با علائم شانکر ریشه و ساقه در استان خراسان شمالی طی سال ۱۳۹۳ نمونه برداری صورت گرفت. پس از کشت بافت‌های آلوده، ۳۲ جدایه ریزوکتونیا به دست آمد. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از روش‌های مبتنی بر ریخت‌شناسی و همچنین به روش مولکولی انجام شد که ۲۹ جدایه متعلق به گونه *Rhizoctonia solani* چندهسته‌ای و سه جدایه ریزوکتونیا‌های دوهسته‌ای بودند. برای شناسایی دقیق گروه‌های تاکسونومیک *R. solani* از آنالیز PCR-RFLP استفاده شد. ناحیه ITS از rDNA توسط دو آغازگر اختصاصی گونه *R. solani* به نام‌های RS1 و RS4 تکثیر و محصول آن توسط آنزیم‌های *HincII* و *AvaII* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و گروه و زیرگروه‌های آناستوموزی تعیین شدند. از ۲۹ جدایه فوق ۱۷ جدایه متعلق به AG4 HG-I و ۱۲ جدایه AG4 HG-II شناسایی شدند. آزمایشات بیماری‌زایی بر روی لوبیاقرمز رقم ناز نشان داد که جدایه‌های ریزوکتونیای دوهسته‌ای از توان بیماری‌زایی کمتری بر روی ریشه و ساقه گیاه میزبان برخوردارند. شدت بیماری‌زایی زیرگروه‌های آناستوموزی AG4 HG-I و AG4 HG-II تقریباً در یک سطح بود. این اولین گزارش از تعیین وضعیت دقیق تاکسونومیک و بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ ریزوکتونیای به دست آمده از مزارع لوبیا در ایران می باشد.

واژه‌های کلیدی: شناسایی، گروه تاکسونومیک، PCR-RFLP، *Phaseolus vulgaris*، *Thanatephorus cucumeris*

مقدمه

است. با وجود مطالعات زیاد هنوز زوایای مختلف بیولوژی و تاکسونومی قارچ *R. solani* ناشناخته است و به عنوان یک گونه پیچیده شناخته شده است (Cubeta & Vilgalys, 1997). در قارچ نکروتروف *R. solani* مجموعه‌ای از گروه‌های درون گونه‌ای همگن وجود دارند که به وسیله واکنش آناستوموز هیفی بین ایزوله‌ها از یکدیگر متمایز می‌شوند و گروه‌های آناستوموزی (Anastomosis Groups; AGs) نام دارند. جدایه‌های هر گروه آناستوموزی فقط قابلیت آناستوموز با ایزوله‌های دیگر از همان گروه آناستوموزی را دارا می‌باشند. تاکنون ۱۴ گروه آناستوموزی شامل AG1-AG13 و AGBI برای *R. solani* توصیف شده است (Carling, 1996; Gonzalez Garcia et al., 2006). برخی از گروه‌های آناستوموزی دامنه میزبانی وسیعی دارند، در حالی که برخی دیگر بسیار اختصاصی عمل می‌کنند. همچنین یک گونه گیاهی می‌تواند میزبان چندین گروه آناستوموزی باشد (Herr, 1996; Gonzalez Garcia et al., 2006). بعضی از گروه‌های آناستوموزی شامل چند زیرگروه موسوم به گروه‌های ویژه داخلی (Intraspecific Groups; ISGs) می‌باشند که این

بیماری‌های ریزوکتونیایی لوبیا انتشار جهانی داشته و شامل مرگ گیاهچه قبل و بعد از سبز شدن، شانکر ریشه و ساقه و سوختگی اندام هوایی گیاه می‌باشند (Keshavarz-Tohid & Taheri, 2015; Nerey et al., 2010). هنگامی که گیاهان لوبیا دچار تنش هستند، یا به ویژه بر اثر حمله نماتدهای گال ریشه آسیب دیده باشند، شانکر ریزوکتونیایی ریشه و ساقه بسیار شدید می‌شود. عامل این بیماری قارچ خاکزاد چندهسته‌ای *R. solani* Kuhn می‌باشد که فرم جنسی آن *Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk است (Carling, 1996; Gonzalez Garcia et al., 2006).

R. solani به عنوان یک بازیدیومیست خاکزاد که دامنه میزبانی وسیعی دارد و گیاهان زراعی و غیرزراعی متعددی را مورد حمله قرار می‌دهد، تاکنون بسیار مورد بررسی قرار گرفته

* نویسنده مسئول: مشهد، دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه‌پزشکی، کدپستی: ۹۱۷۷۹۴۸۹۷۸، p-taheri@um.ac.ir

در داخل هسته قرار گرفته‌اند. ژن‌های RNA ریبوزومی هسته ای در دو گروه 18S ویژه زیر واحد ریبوزومی کوچک و 5.8S و 28S ویژه زیر واحد بزرگ ریبوزوم قرار می‌گیرند. فاصله بین قطعات 18S و 28S توسط دو ناحیه فاصله‌ساز داخلی ITS1 و ITS2 و یک قطعه 5.8S پُر شده است. روش‌های مولکولی بر اساس آنالیز توالی ژن‌های مسئول تولید RNA ریبوزومی روشی سریع و قابل‌اعتماد برای شناسایی جمعیت‌های *R. solani* در سطح AG و همچنین شناسایی زیرگروه‌های آناستوموزی می‌باشد (Guillemaut et al., 2003). به‌منظور داشتن اطلاعات کامل و دقیق در مورد گروه‌های تاکسونومیک و تنوع جمعیت‌های *R. solani*، تشخیص گونه‌های مختلف این قارچ تنها بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، به‌دلیل عدم ثبات این خصوصیات در محیط کشت کافی و دقیق نمی‌باشد (Taheri et al., 2007). همچنین تشخیص گروه‌های آناستوموزی از طریق پیوند ریشه احتیاج به صرف زمان و تجربه زیادی دارد (Guillemaut et al., 2003). هدف اصلی در این بررسی، تفکیک سطوح مختلف تاکسونومیک شامل گونه، گروه آناستوموزی و زیرگروه آناستوموزی قارچ *R. solani* بیماریزا در لوبیا بر اساس روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی و همچنین کاربرد روش PCR-RFLP برای ناحیه ژنومی rDNA-ITS می‌باشد. در این تحقیق بیماریزایی جدایه‌ها نیز بر روی لوبیا رقم رقم نام در گیاهان چهار هفته‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ عامل بیماری

بافت‌های گیاهی آلوده به بیماری ریزوکتونیایی از مزارع لوبیای مناطق عمده کشت این گیاه در استان خراسان شمالی شامل بجنورد، شیروان و فاروج در طی فصل زراعی سال ۱۳۹۳ جمع‌آوری گردیدند. بعد از شستشوی سطحی نمونه‌ها با آب فراوان، قطعات کوچک به اندازه ۳-۴ میلی‌متر از مرز بین بافت سالم و آلوده ساقه، ریشه‌های اصلی و فرعی که علائم شانکر را داشتند، تهیه گردید و توسط هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۱ تا ۲ دقیقه ضدعفونی شدند. سپس سه مرحله شستشو در آب مقطر سترون انجام شد. هر قطعه پس از خشک شدن بر روی کاغذ صافی سترون، بر روی محیط کشت سیب زمینی- دکستروز-آگار (PDA؛ Potato-Dextrose-Agar) حاوی آنتی‌بیوتیک کلرامفنیکل قرار داده شد و در انکوباتور تاریک با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از سه روز محیط کشت‌ها مورد بررسی قرار گرفتند و مشخصات میسلیوم مربوط به گونه‌های ریزوکتونیا ارزیابی گردید. جهت خالص‌سازی قارچ

زیرگروه‌ها از نظر دامنه میزبانی، نیازهای غذایی، خصوصیات مورفولوژیکی، مولکولی و بیوشیمیایی با یکدیگر متفاوت هستند. زیرگروه‌های هر گروه آناستوموزی از نظر ژنتیکی توسط روش‌های مولکولی از یکدیگر متمایز می‌شوند، ولی از طریق آناستوموز هیفی تفکیک آن‌ها امکان‌پذیر نمی‌باشد (Cubeta et al., 2002; Pourmahdi & Taheri, 2015; Sneh et al., 1991). به‌وجود آمدن روش‌های مولکولی سبب شده که این روش‌های جدید جایگزین روش‌های قدیمی‌تر مطالعه جمعیت‌های ریزوکتونیا شوند (Ogoshi, 1996).

در لوبیا، گروه‌های آناستوموزی (IIB, IV) AG2-2 و AG4 (HG-I, HGII, HG-III) به‌عنوان عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه در نواحی مختلف کشت لوبیا در دنیا گزارش شده‌اند (Gonzalez Garcia et al., 2006; Guillemaut et al., 2010; Nerey et al., 2003). در حالی که بیماری سوختگی اندام هوایی لوبیا عمدتاً در اثر جدایه‌های AG1-1A و AG1-1B (Godoy-Lutz et al., 2008) و AG4 HG-I (Yang 2007) ایجاد می‌شود. در ایران جدایه‌های این قارچ متعلق به گروه آناستوموزی AG4 در مزارع لوبیای استان اصفهان شناسایی شده‌اند (Balali & Kowsari, 2004). تاکنون مطالعات دقیقی در مورد شناسایی گروه‌های مختلف تاکسونومیک *R. solani* عامل بیماری پوسیدگی و شانکر ساقه، طوقه و ریشه لوبیا در ایران انجام نشده است. با توجه به دامنه میزبانی متفاوت گروه‌های مختلف تاکسونومیک *R. Solani*، شناسایی دقیق گروه‌ها و زیرگروه‌های آناستوموزی این قارچ مخرب در مدیریت مؤثر این بیماری بسیار حائز اهمیت است.

شناسایی سطوح مختلف تاکسونومیک جنس ریزوکتونیا به کمک روش‌های مولکولی انجام شده است. نتایج بررسی‌های مولکولی محدوده گروه‌های آناستوموزی را تأیید و مشخص کرده است و پیشرفت قابل‌ملاحظه‌ای در تشخیص ISGs به‌عنوان واحدهای اساسی طبقه‌بندی درون گروه‌های مختلف آناستوموزی ریزوکتونیا صورت گرفته است. معتبرترین دیدگاه‌ها پیرامون AG و ISG از مطالعات مربوط به طبقه‌بندی مولکولی حاصل شده است. روش‌های مولکولی که تا به حال جهت بررسی تاکسونومیک ریزوکتونیا به کار رفته‌اند شامل آیزوزایم‌ها، هیبریداسیون DNA/DNA، آنالیز RFLP، نشانگرهای مولکولی بر پایه PCR و توالی‌یابی DNA می‌باشد (Vilgalys & Cubeta, 1994). توالی‌هایی از DNA که RNA ریبوزومی را کد می‌کنند، نواحی مناسبی جهت بررسی روابط فیلولوژنتیکی و تاکسونومیک بین قارچ‌ها به حساب می‌آیند. در قارچ‌ها ژن‌های مسئول تولید RNA ریبوزومی عمدتاً

ژل آگارز ۲ درصد، با استفاده از بافر TAE (1X) با ولتاژ ۹۰ ولت استفاده شد (Taheri et al., 2007). همچنین جهت تعیین کمیت DNA از اسپکتروفتومتر استفاده گردید. DNA نهایتاً در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان مصرف نگهداری شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR)

برای تشخیص گونه *R. solani* در این تحقیق از آغازگرهای اختصاصی این گونه شامل RS1 تا RS4 و الی CAGAGACAGCTGTGACCTGTGCTGTG و الی (TGTCCAAGTCAATGGACTAT) در واکنش PCR استفاده گردید (Guillemaut et al., 2003). ارزیابی محصول PCR در الکتروفورز بر روی ژل آگارز ۱ درصد و با استفاده از بافر TBE (1X)، در ولتاژ ۱۲۰ ولت برای مدت زمان ۳۰ دقیقه صورت گرفت.

تعیین گروه‌های آناستوموزی و آنالیز PCR-RFLP برای ناحیه rDNA-ITS

برای اطمینان از تشخیص گروه‌های آناستوموزی مشخص شده به روش آناستوموز بین ریشه‌ها و همچنین تشخیص زیرگروه‌های آناستوموزی از آنالیز چندشکلی ایجاد شده در ناحیه ITS از DNA ریبوزومی (rDNA-ITS) جدایه‌های مختلف *R. solani* استفاده شد (Guillemaut et al., 2003). در این فرایند ابتدا ناحیه rDNA-ITS در واکنش PCR تکثیر شد. سپس محصول PCR توسط آنزیم‌های برشی *AvaII* و *HincII* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. هر یک از واکنش‌های PCR-RFLP در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر محصول PCR، ۲-۱ واحد آنزیم برشی، ۱۰ میکرولیتر بافر واکنش و ۱۸ میکرولیتر آب دوبار تقطیر سترون انجام شد. از دو آنزیم برشی *AvaII* و *HincII* به صورت همزمان در یک واکنش استفاده گردید. در استفاده از آنزیم‌های برشی *AvaII* و *HincII* میکروتیوب‌ها در حمام آب گرم به مدت سه ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. لازم به ذکر است که آنزیم‌های برشی مورد استفاده ساخت شرکت Fermentase بودند. پس از آن میکروتیوب‌ها در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

بررسی بیماری‌زایی

بیماری‌زایی جدایه‌های *R. solani* بر روی رقم لوبیا موبیل که حساس به بیماری و غالب در منطقه می‌باشد، صورت گرفت. ابتدا بذور لوبیا به طور مسقیم در گلدان‌های پلاستیکی کشت شدند. خاک گلدان‌ها مخلوطی از خاک زراعی، خاک برگ، ماسه، پرلیت و ورمی‌کمپوست بود که در اتوکلاو در دمای

رایزوکتونیا از روش نوک ریشه در محیط کشت آب-آگار یک درصد استفاده شد و سپس با انتقال آن به PDA کشت خالص آن تهیه گردید. برای نگهداری کوتاه‌مدت، هر جدایه به محیط کشت PDA انتقال یافت و در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. پس از رشد کامل و تولید اسکروت‌ها محیط کشت‌ها در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند.

بررسی خصوصیات مورفولوژیکی

در ابتدا تمام جدایه‌ها از نظر تعداد هسته در سلول‌های جوان هیف از طریق رنگ‌آمیزی هسته بررسی شدند. برای رنگ‌آمیزی هسته از سافرانین (Bandoni, 1979) استفاده شد. در این روش در وسط هر لام یک دیسک از پرگنه در حال رشد قارچ قرار داده شد این لام‌ها در انکوباتور در دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد برای ۲-۳ روز نگهداری شدند، سپس در طرفین پرگنه قارچ دو قطره معرف رنگی سافرانین ریخته و کمی حرارت داده شد. لامل به آرامی بر روی توده هیف قرار داده شد و در بزرگنمایی ۴۰۰ شمارش هسته‌ها صورت گرفت. همچنین به کمک این رنگ‌آمیزی وجود دیواره عرضی بشکه‌ای ارزیابی شد. برای اندازه‌گیری قطر ریشه، ابعاد سلول‌های مونیلیوتید و اسکروت و همچنین بررسی مورفولوژی پرگنه، هر جدایه بر روی سه عدد پتری حاوی محیط PDA کشت شد و در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. پس از سه هفته صفات ذکر شده مورد بررسی قرار گرفتند (Falahati-Rasregar et al., 2010). برای تعیین گروه‌های آناستوموزی جدایه‌های *R. solani* به روش (Carling et al., 2002) جدایه‌های آناستوموز بین ریشه‌های جدایه‌های به دست آمده از لوبیا و جدایه‌های استاندارد هر گروه آناستوموزی مورد بررسی قرار گرفت.

استخراج DNA

برای این منظور از محیط کشت‌های ۵ تا ۶ روزه قارچ قطعه کوچکی به شعاع پنج میلی‌متر برداشته شد و تحت شرایط سترون به ویال‌های ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع سیب‌زمینی-دکستروز منتقل گردید. سپس ویال‌ها در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۷ روز لایه میسلیمی روی سطح محیط کشت به کمک کاغذ صافی جدا گردید و سپس پودر شد. برای استخراج DNA از کیت استخراج DNA شرکت Bioneer کشور کره جنوبی استفاده شد. رسوب DNA استخراج شده بسته به حجم رسوب در ۲۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر بافر TE حل شد. جهت تعیین کیفیت DNA استخراجی از الکتروفورز در

متغیر بود. در جدایه‌های چندهسته‌ای اندازه ابعاد سلول‌های مونیلیوئید ۳۷-۲۰×۱۸-۹ میکرومتر، ابعاد اسکروت ۰.۳-۲.۵ میلی‌متر و قطر هیف اصلی ۱۱-۸ میکرومتر بود. در حالی که در جدایه‌های دوهسته‌ای به ترتیب اندازه ابعاد سلول‌های مونیلیوئید ۲۷-۱۹×۱۴-۱۰ میکرومتر، ابعاد اسکروت ۰/۵-۰/۲ میلی‌متر و قطر هیف اصلی ۸-۵ میکرومتر بود. در ریزوکتونیاهای چندهسته‌ای رنگ پرگنه قارچ در محیط کشت PDA در ابتدا سفید بود که به مرور زمان به قهوه‌ای تغییر رنگ می‌داد. در مورد ریزوکتونیاهای دوهسته‌ای نیز رنگ پرگنه در محیط کشت PDA در ابتدا سفید رنگ بود که به تدریج کرم رنگ می‌شد. به‌طور کلی رنگ و شکل پرگنه جدایه‌ها در محیط کشت PDA در مقایسه با محیط کشت WA متنوع‌تر بود. جدایه‌های دوهسته‌ای نیز به‌طور متعددی تولید اسکروت‌های ریز کروی شکل می‌کردند. به‌طور کلی قارچ *R. solani* جدا شده از این گیاه زراعی از نظر رنگ پرگنه، قطر ریشه، فرورفتگی در محل انشعابات ریشه، محل تشکیل دیواره عرضی، شکل سلول‌های مونیلیوئید، تعداد هسته در هر سلول ریشه و تشکیل اسکروت با سایر گزارش‌ها (Ogoshi, 1987; Pourmahdi & Taheri, 2015) مطابقت داشت. بررسی آناستوموز بین ریشه‌های جدایه‌های *R. solani* در این پژوهش با جدایه‌های استاندارد گروه‌های مختلف آناستوموزی این گونه نشانگر وقوع واکنش آناستوموز بین ریشه‌های جدایه‌های به‌دست آمده از لوبیا با جدایه متعلق به AG4 بود. تفکیک زیرگروه‌های مختلف این گروه آناستوموزی بر اساس واکنش آناستوموز ممکن نبود.

شناسایی گونه *R. solani* و تعیین گروه‌های آناستوموزی بر اساس آنالیز PCR-RFLP

الکتروفورز ناحیه rDNA-ITS تکثیر شده در واکنش PCR با کاربرد آغازگرهای RS1/RS4 نشانگر وجود یک باند به وزن مولکولی ۵۵۰ جفت باز برای تمام جدایه‌های *R. solani* بود (شکل 1A). نتایج به‌دست آمده با نتایج سایر محققان در استفاده از این آغازگرها برای تکثیر ناحیه ژنومی مذکور در قارچ *R. solani* مشابه بود (Guillemaut et al., 2003).

بررسی صورت گرفته در مورد تعیین گروه آناستوموزی جدایه‌های *R. solani* به روش تماس ریشه‌ای مشخص کرد که تمام جدایه‌های این گونه به‌دست آمده در پژوهش حاضر به گروه آناستوموزی AG4 تعلق دارند. در آناستوموز ریشه‌ای جدایه‌های مربوط به گروه آناستوموزی AG4 دیده شد که برخی از این جدایه‌ها با استرین‌های استاندارد مربوط به هر دو زیرگروه‌های آناستوموزی AG4 HG-I و AG4 HG-II

۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار یک اتمسفر به مدت یک ساعت سترون شده بود. در هر گلدان یک بذر لوبیا کشت شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار صورت گرفت. در هر تکرار، سه گیاه برای مایه‌زنی هر جدایه در نظر گرفته شد. گلدان‌ها در شرایط گلخانه با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. گیاهان لوبیا چهار هفته پس از سبزشدن برای مایه‌زنی مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه مایه تلقیح از بذور گندم کلونیزه شده با ریشه‌های قارچ ریزوکتونیا استفاده شد (Nikraftar et al., 2013). ابتدا ۳۰۰ گرم بذر گندم درون هر ظرف شیشه‌ای ریخته شد. ۳۰۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه گردید و برای سه روز متوالی در اتوکلاو سترون شد. سپس در شرایط کاملاً سترون بذور گندم به پتری‌های شیشه‌ای منتقل شدند و در داخل هر پتری یک دیسک میسلیومی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه پرگنه ۷ روزه قارچ ریزوکتونیا اضافه گردید. پتری‌ها به مدت ۵ روز در انکوباتور دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از پوشش کامل بذورهای گندم با قارچ، از آن‌ها جهت تلقیح گیاهچه‌های سالم لوبیا در زمان چهار هفته پس از سبزشدن گیاه استفاده شد. برای تلقیح به مقدار ۳۰ گرم از بذورهای گندم کلونیزه شده با قارچ در اطراف ساقه هر گیاه ریخته شد. گلدان‌ها در گلخانه در دمای 28 ± 2 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۹۰ درصد نگهداری شدند. پس از گذشت ۷ روز از زمان مایه‌زنی، ثبت علائم با اندازه‌گیری طول زخم ناشی از هر ایزوله بر روی گیاه صورت گرفت. برای آنالیز آماری داده‌ها از نرم افزار SPSS.12 استفاده شد. آنالیز آماری با استفاده از آزمون‌های مقایسه‌ای Kruskal-Wallis تکمیل شده با آزمون Mann-Whitney در سطح $P=0.05$ انجام شد.

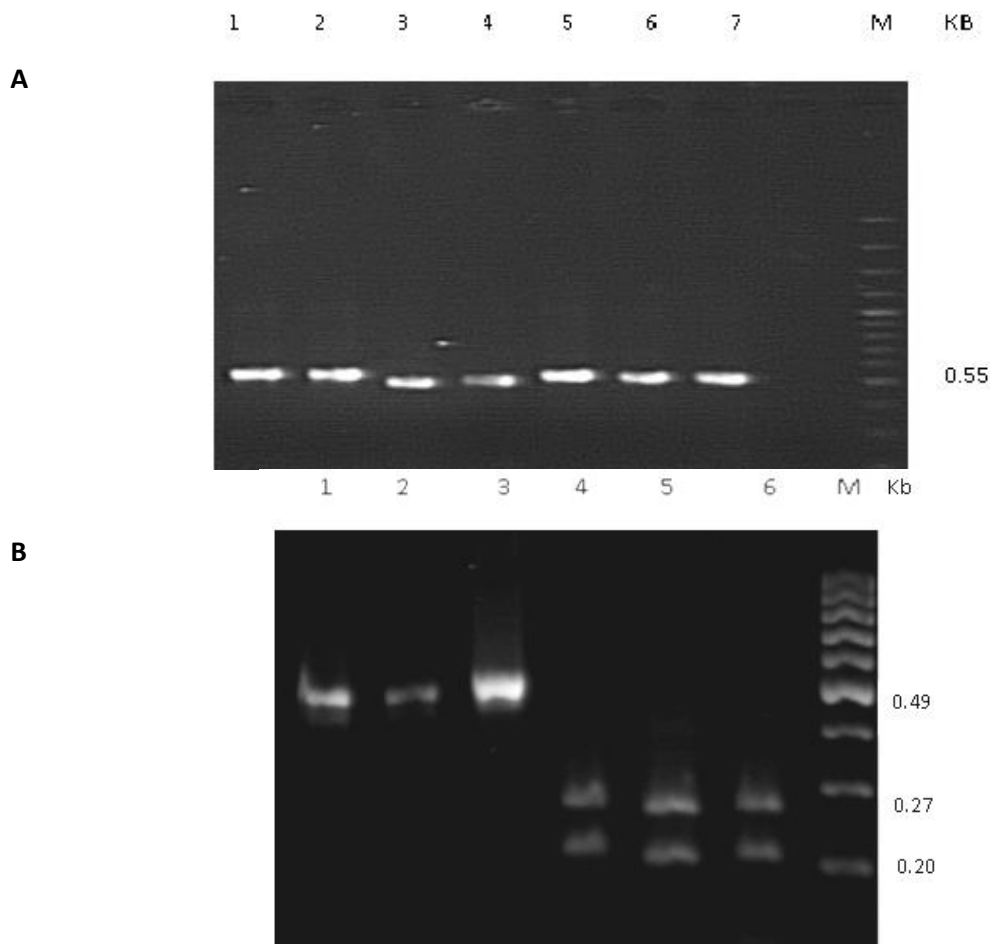
نتایج و بحث

مشخصات مورفولوژیکی

در این پژوهش شناسایی مورفولوژیکی ۳۲ جدایه قارچ ریزوکتونیای جداسازی شده از مناطق عمده کشت لوبیا در استان خراسان شمالی بر اساس کلید شناسایی این قارچ (Sneh et al., 1991) صورت گرفت. بر این اساس ریشه‌های قارچ دارای قطرهای متفاوت با انشعابات قائمه بودند. در قاعده انشعابات فرورفتگی مشخص دیده شد که یک دیواره عرضی کمی بالاتر از محل فرورفتگی وجود داشت. سلول‌های مونیلیوئید نیز به صورت زنجیره‌هایی ساده یا منشعب وجود داشتند. نتایج آزمون رنگ آمیزی هسته نشان داد که ۲۹ جدایه چندهسته‌ای و سه جدایه دوهسته‌ای می‌باشند. تعداد هسته در سلول‌های ریشه در جدایه‌های چندهسته‌ای بین ۴ تا ۱۲ عدد

Pourmahdi & () بیماریزا در گوجه فرنگی *R. solani* (Taheri, 2015) درباره توان آناستوموز هیفی میان جدایه‌های زیرگروه‌های مختلف مربوط به گروه آناستوموزی AG4 با یکدیگر مشابه بود.

آناستوموز می‌دهند. بنابراین، نتایج نشان داد که برای تعیین زیرگروه‌های آناستوموزی، استفاده از روش آناستوموز ریشه‌ای بر روی اسلاید امکان‌پذیر نمی‌باشد. این نتیجه با نتایج به‌دست‌آمده از مطالعات انجام‌شده بر روی جدایه‌های



شکل ۱- نتایج PCR مربوط به DNA ژنومی *R. solani* (A) و باندهای به‌دست‌آمده در روش PCR-RFLP پس از هضم محصول PCR با استفاده از آنزیم‌های *AvaII* و *HincII* برای جدایه‌های گروه آناستوموزی AG4 (B). در شکل A شماره‌های ۱ تا ۷ به‌ترتیب جدایه‌های BR1، BR2، BR3، BR4، SR1، SR2 و FR1 می‌باشند. در شکل B شماره‌های ۱، ۲ و ۳ جدایه‌های زیرگروه AG4 HG-II، و ۴، ۵ و ۶ جدایه‌های زیرگروه AG4 HG-I می‌باشند. M نشانگر مولکولی سایز باندهاست.

Fig. 1. PCR results of *R. solani* genomic DNA, and fragments obtained in the PCR-RFLP method after digestion of the PCR products using *AvaII* and *HincII* restriction enzymes for the isolates of AG4

Numbers 1 to 7 in the figure A are belonged to the isolates BR1, BR2, BR4, SR1, SR2, and FR1, respectively. Numbers 1, 2, and 3 in the figure B are the isolates of AG4 HG-II, and 4, 5, and 6 are the isolates of AG4 HG-I
M: Molecular size marker

جدول ۱- نتایج آزمون بیماریزایی بر روی گیاهان لوبیاقرمز چهار هفته‌ای با استفاده از جدایه‌های رایزوکتونیا سولانی
Table 1. Results of pathogenicity tests on 4 weeks old red bean plants using *Rhizoctonia solani* and binucleate *Rhizoctonia* isolates

جدایه ^۱ Isolate	گروه تاکسونومیکی Taxonomic group	میانگین طول زخم (میلی‌متر) (Mean lesion length mm)	جدایه ^۱ Isolate	گروه تاکسونومیکی Taxonomic group	میانگین طول زخم (میلی‌متر) (Mean lesion length mm)
BR1	AG4 HG-I	5.5 b	FR8	AG4 HG-I	19 cd
BR2	AG4 HG-I	6 b	BR5	AG4 HG-II	22.5 cd
BR3	AG4 HG-I	8.5 bc	BR6	AG4 HG-II	9.5 bc
BR7	AG4 HG-I	9.5 bc	BR8	AG4 HG-II	8 bc
BR11	AG4 HG-I	19.5 c	BR10	AG4 HG-II	11 bc
BR12	AG4 HG-I	12.5 bc	SR1	AG4 HG-II	10 bc
BR13	AG4 HG-I	13 c	SR7	AG4 HG-II	12 bc
SR2	AG4 HG-I	14.5 c	SR8	AG4 HG-II	12.5 bc
SR3	AG4 HG-I	12 bc	FR1	AG4 HG-II	14.5 c
SR4	AG4 HG-I	15 c	FR2	AG4 HG-II	17.5 cd
SR5	AG4 HG-I	19.5 c	FR7	AG4 HG-II	7.5b
SR9	AG4 HG-I	27.5 d	BR14	AG4 HG-II	8.5 bc
FR3	AG4 HG-I	28 d	BR15	AG4 HG-II	9 bc
FR4	AG4 HG-I	8.5 bc	BR9	Binucleate	8.5 bc
FR5	AG4 HG-I	15 c	BR4	Binucleate	0 a
FR6	AG4 HG-I	15.5 c	SR6	Binucleate	4.25 b

^۱ حروف مورد استفاده در نام جدایه‌ها معرف منطقه نمونه‌برداری هستند. BR: بجنورد، SR: شیروان و FR: فاروج



شکل ۲- علائم بیماری ناشی از جدایه BR11 قارچ *Rhizoctonia solani* بر روی ساقه لوبیا
Fig. 2. Disease symptoms caused by the isolate BR11 of *Rhizoctonia solani* on the bean stem

آناستوموزی AG4 به‌دست‌آمده از گیاه لوبیا از آنزیم‌های برشی *AvaII* و *HincII* استفاده کرده‌اند (Çebi Kiliçoğlu & Özkoç, 2010). از دو آنزیم برشی *AvaII* و *HincII* به‌صورت همزمان در یک واکنش استفاده گردید. الکتروفورز rDNA هم‌شده بر روی ژل آگارز ۲ درصد نشان داد که ۱۷ تا از جدایه‌های گروه آناستوموزی AG4 در هضم با آنزیم‌های برشی *AvaII* و *HincII* دو قطعه در حدود اندازه‌های ۰/۲۷ و ۰/۲۰ کیلو باز ایجاد می‌کنند و همچنین ۱۲ جدایه یک قطعه در حدود ۰/۴۹۰ کیلو باز ایجاد کردند. مقایسه این نتایج با نتایج سایر پژوهشگران (Guillemaut et al., 2003) تعیین کرد که ۱۷ جدایه از گروه آناستوموزی AG4 به زیرگروه آناستوموزی AG4 HG-I و ۱۲ جدایه به زیرگروه AG4 HG-II تعلق دارند (شکل 1B).

بدین ترتیب برای تعیین زیرگروه‌های آناستوموزی از روش PCR-RFLP ناحیه ژنومی rDNA-ITS استفاده گردید (Guillemaut et al., 2003). همان‌طور که قبلاً ذکر شد، ابتدا ناحیه rDNA-ITS تمام جدایه‌های چندهسته‌ای از طریق دو آغازگر اختصاصی گونه *R. solani* تکثیر شد. سپس محصول PCR برای تمام جدایه‌ها توسط دو آنزیم برشی *AvaII* و *HincII* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. مقایسه نتایج به‌دست‌آمده از هضم آنزیمی ناحیه ژنومی rDNA-ITS جدایه‌های *R. solani* به‌دست‌آمده توسط این آنزیم‌های برشی با نتایج حاصل از مطالعات قبلی (Guillemaut et al., 2003) در مورد استرین‌های استاندارد نشان داد که جدایه‌های AG4 متعلق به زیرگروه‌های AG4 HG-I و AG4 HG-II بودند (شکل 1B). سایر محققان نیز برای تعیین زیرگروه‌های

گوجه‌فرنگی استان خراسان رضوی مشاهده شد (Pourmahdi & Taheri, 2015).

با توجه به سایر گزارش‌ها در مورد کاربرد جدایه‌های کم آزار یا غیربیماریزای رایزوکتونیا در القای مقاومت علیه جدایه‌های شدیداً بیماریزای *R. solani* (Keshavarz-Tohid & Taheri, 2015) شاید بتوان در مبارزه بیولوژیک از این جدایه‌های دوهسته‌ای علیه جدایه‌های مخرب رایزوکتونیا عامل شانکر ساقه و ریشه گیاه لوبیا استفاده نمود. البته باید در مورد کاربرد جدایه‌های دوهسته‌ای علیه *R. solani* تحقیقات تکمیلی دیگری از جمله بررسی دامنه میزبانی در محصولات زراعی رایج در منطقه صورت گیرد.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق مشخص گردید که بیماری شانکر ریشه و ساقه لوبیا ناشی از *R. solani* در تمام مناطق کشت این گیاه در استان خراسان شمالی کم‌وبیش وجود دارد. همچنین مشخص شد که زیرگروه آناستوموزی AG4 HG-I شایع‌ترین گروه تاکسونومیکی است که در مزارع لوبیای استان خراسان شمالی وجود دارد. آزمون بیماریزایی نشان داد که زیرگروه‌های AG4 HG-I و AG4 HG-II از لحاظ توان بیماریزایی تفاوت معنی‌داری ندارند. این اولین گزارش از تعیین جایگاه دقیق تاکسونومیکی (تعیین AG و ISGs) جدایه‌های قارچ مخرب *R. solani* آلوده‌کننده لوبیا در ایران است. با توجه به این که لوبیا پس از سیب‌زمینی دومین محصول پُرارزش دنیا محسوب می‌شود و در کشور نیز از اهمیت بالایی برخوردار است، لذا ضرورت دارد که راه‌های کنترل این عامل قارچی که تأثیر به‌سزایی بر کاهش کمیت و کیفیت محصول می‌گذارد، بیش از پیش مورد بررسی قرار گیرد و راهکارهای مناسب جهت مدیریت این بیماری اندیشیده شود.

در این مطالعه برای اطمینان از تشخیص گروه‌های آناستوموزی به روش پیوند ریشه‌ای و نیز تعیین زیرگروه‌های آناستوموزی از برش آنزیمی توالی ناحیه ITS استفاده گردید. توالی ناحیه ITS به‌عنوان یک ابزار مهم در شناسایی و تعیین گروه‌ها و زیرگروه‌های آناستوموزی می‌باشد و نسبت به روش‌های قدیمی از دقت، سهولت و سرعت عمل بالاتری برخوردار است (Stojšin *et al.*, 2007).

بررسی بیماریزایی

نتایج حاصل از بررسی بیماریزایی نشان داد که تمام جدایه‌های *R. solani* متعلق به AG4 HG-I و AG4 HG-II بر روی گیاهچه‌های لوبیا بیماریزا بودند، همچنین از سه جدایه رایزوکتونیا دوهسته‌ای دو جدایه علائم بیماری را ایجاد کردند. گیاهان شاهد که با بذور گندم عاری از قارچ مایه‌زنی شده بودند، هیچ علائمی از بیماری را نشان ندادند. علائم بارز بیماری بر روی گیاهان به‌صورت زخم‌هایی به رنگ قهوه‌ای در ناحیه ساقه مشاهده می‌شد (شکل ۲) که گاهی اوقات این زخم‌ها در سطح ریشه نیز توسعه پیدا می‌کردند. در برخی از جدایه‌ها که شدت بیماریزایی بیشتری داشتند، در ناحیه ساقه باریک‌شدگی مشاهده می‌شد که با سایر تحقیقات انجام‌شده در خصوص علائم ایجادشده توسط این بیماری در گیاه لوبیا مطابقت داشت (Balali & Kowsari, 2004; Keshavarz-Tohid & Taheri, 2015; Keshavarz-Tohid *et al.*, 2016). آنالیزهای آماری داده‌های آزمایش‌های بیماریزایی نشان داد که شدت بیماریزایی در جدایه‌های زیرگروه‌های آناستوموزی AG4 HG-I و AG4 HG-II جدایه‌های مربوط به رایزوکتونیا دوهسته‌ای نیز دارای کمترین توان بیماریزایی بر روی گیاهچه‌ها بودند و حتی یک جدایه دوهسته‌ای فاقد توان بیماریزایی بود. اخیراً نتایج مشابهی در بررسی بیماریزایی گروه‌های مختلف تاکسونومیکی رایزوکتونیا بیماریزا در مزارع

منابع

- Balali, G.R., and Kowsari, M. 2004. Pectic zymogram variation and pathogenicity of *Rhizoctonia solani* AG-4 to bean (*Phaseolus vulgaris*) isolates in Isfahn, Iran. *Mycopathologia* 158: 377-384.
- Bandoni, R.J. 1979. Safranin O as a rapid nuclear stain for fungi. *Mycologia* 71: 873-874.
- Carling, D.E. 1996. Grouping in *Rhizoctonia solani* by hyphal anastomosis. In: B. Sneh, S.H. Jabaji-Hare, S. Neate, and G. Dijkstra. (Eds.). *Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology, and Disease Control*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands., pp. 37-47.
- Carling, D.E., Kuniyaga, S., and Brainard, K.A. 2002. Hyphalanastomosis reactions, rDNA-internal transcribed spacers sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 2 (AG-2) and AG BI. *Phytopathology* 92: 43-50.
- Çebi Kiliçoğlu, M., and Özkoç, İ. 2010. Molecular characterization of *Rhizoctonia solani* AG4 using PCR-RFLP of rDNA-ITS region. *Turk Journal of Biology* 34: 261-269.

6. Cubeta, M.A., and Vilgalys, R. 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. *Phytopathology* 87: 480-484.
7. Falahati-Rastegar, M., Taheri, P., Jafarpour, B., Rouhani, H., and Mahdikhani-Moghadam, E. 2010. taxonomic identification of *Rhizoctonia* spp. associated with sugar beet root and crown rot using rDNA-ITS and PCR-RFLP analysis. *Journal of Plant Protection* 24: 285-293.
8. González García1, V., Portal Onco, M.A., and Rubio Susan, V. 2006. Biology and systematic of the form genus *Rhizoctonia*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 4: 55-79.
9. Godoy-Lutz, G., Kuninaga, S., Steadman, J.R., and Powers, K. 2008. Phylogenetic analysis of *Rhizoctonia solani* subgroups associated with web blight symptoms on common bean based on ITS-5.8S rDNA. *Journal of General Plant Pathology* 74:32-40.
10. Guillemaut, C., Hermann, V.E., Camporota, P., Alabouvette, C., Molard, M.R., and Steinberg, C. 2003. Typing of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* by restriction analysis of ribosomal DNA. *Canadian Journal of Microbiology* 49: 556-568.
11. Herr, L.J. 1996. Sugar beet diseases incited by *Rhizoctonia* spp. In *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate and G. Dijst (Eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 341-350.
12. Keshavarz-Tohid, V., and Taheri, P. 2015. Investigating binucleate *Rhizoctonia* induced defence responses in kidney bean against *Rhizoctonia solani*. *Biocontrol Science and Technology* 25: 444-459.
13. Keshavarz-Tohid, V., Taheri, P., Taghavi, S.M., and Tarighi, S. 2016. The role of nitric oxide in basal and induced resistance in relation with hydrogen peroxide and antioxidant enzymes. *Journal of Plant Physiology*, Doi:10.1016/j.jplph.2016.05.005.
14. Nerey, Y., Pannecoucq, J., Hernandez, H.P., Diaz, M., Espinosa, R., De Vos, S., and Hofte, M. 2010. *Rhizoctonia* spp. causing root and hypocotyl rot in *Phaseolus vulgaris* in Cuba. *Journal of Phytopathology* 158: 236-243.
15. Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *R. solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology* 23: 23-45.
16. Ogoshi, A. 1996. The genus *Rhizoctonia*. In: B. Sneh, S. Jabaji-Hare, S. Neate, and G. Dijst (Eds.). *Rhizoctonia* species: taxonomy, molecular biology, ecology, pathology and disease control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands. pp. 1-9.
17. Pourmahdi, A., and Taheri, P. 2015. Genetic diversity of *Thanatephorus cucumeris* infecting tomato in Iran. *Journal of Phytopathology* 163: 19-32.
18. Sneh, R., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. *The American Phytopathological Society*, St. Paul, MN. 133pp.
19. Taheri, P., Gnanamanickam, S., and Höfte, M. 2007. Characterization, genetic structure, and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. associated with rice sheath diseases in India. *Phytopathology* 97: 373-383.
20. Vilgalys, R., and Cubeta, M.A. 1994. Molecular systematics and population biology of *Rhizoctonia*. *Annual Review of Phytopathology* 32: 135-155.
21. Yang, G.H., Chen, J.Y., and Pu, W.Q. 2007. First report of head rot of cabbage and web blight of snap bean caused by *Rhizoctonia solani* AG-4 HGI. *Plant Pathology* 56: 351-351.

Taxonomnic status and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. isolates, causing bean stem and root canker in Northern-Khorassan province

Taheri^{1*}, P. & Daroodi², Z.

1. Associate Professor, Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
2. PhD. Student of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

Received: 13 June 2016
Accepted: 10 December 2016

DOI: 10.22067/ijpr.v9i1.56724

Introduction

Red bean (*Phaseolus vulgaris*) is an important legume cultivated in various areas with different climates worldwide. Bean damping-off, stem and root canker are caused by several fungal pathogens. Soil-borne pathogenic fungi are the most important pathogens in bean plants, which cause destructive diseases. *Rhizoctonia solani* is one of the most serious causal agents of stem and root canker that is reported in all kinds of beans. The *Rhizoctonia* species belong to Basidiomycota which are the causal agents of various diseases different monocots and dicots with high yield losses. The isolates of *R. solani* are classified into 13 anastomosis groups (AGs). The most common AGs of *R. solani* which infect bean plants are AG-1 IE, AG-1 IF, AG-2-2, AG-2-3, AG-BI, AG-4 and AG-5. In overall, isolates of AG-4 HG-II were more virulent in peas, soybeans and beans compared to other AGs. Knowledge of taxonomic status of *Rhizoctonia* spp. causing bean diseases in different geographic regions of Iran is still scarce. However, accurate identification of various taxonomic groups in *Rhizoctonia* spp. populations is necessary for designing effective disease management strategies. So, we identified the accurate taxonomic status of *R. solani* isolates causing bean diseases. Also, pathogenicity of these fungal isolates was investigated on red bean.

Materials & Methods

Red bean plants with the symptoms of stem and root canker were sampled during growing season of 2014 in the fields of this crop for characterizing various taxonomic groups of pathogenic *Rhizoctonia* spp. Symptomatic bean tissues were surface-disinfected with 0.5% sodium hypochlorite solution for 2 min and rinsed three times with sterile distilled water. Then, pieces of the stem or root tissues were dried on sterilized filter paper, placed on a potato dextrose agar (PDA) petri dish containing chloramphenicol, and incubated at 28°C in dark conditions. After 2 to 3 days, cultures were examined microscopically for hyphal characteristics typical of *Rhizoctonia* spp. All plated samples readily yielded *Rhizoctonia* spp., and a hyphal tip of each isolate was subcultured onto AWA for further purification. Isolates were transferred to PDA test tube slants and maintained at 28°C. Fungal isolates were initially characterized as either binucleate or multinucleate by the trypan blue staining technique. Colonies of *Rhizoctonia* on PDA, 2 to 3 days old, were stained to determine nuclear number and were examined for the presence of a septal pore (dolipore) apparatus. The width of the main runner hyphae was investigated from the same preparations. Isolates were subcultured onto PDA petri dishes in triplicate, incubated at 28°C for 3 weeks, and compared for colony morphology and the size and shape of moniloid cells and sclerotia. *Rhizoctonia* spp. isolates were distinguished using specific primers for PCR amplification based on the ITS region of *R. solani*. PCR-RFLP of rDNA-ITS region was used to determine the taxonomic group of each *R. solani* isolate. Genomic DNA of the isolates was used for PCR amplification of the ITS region using a pair of primers, RS1 (5'-CCTGTGCACCTGTGAGACAG-3') and RS4 (5'-TGTC CAAGTCAATGGACTAT-3'). Restriction polymorphisms were detected using two discriminating restriction enzymes, *Ava*II and *Hinc*II.

*Corresponding Author: p-taheri@um.ac.ir

Results & Discussion

32 *Rhizoctonia* isolates were obtained from culturing the infected plant tissues. Identification of these isolates was carried out using morphological and molecular methods. Among 32 isolates, 29 isolates belonged to multinucleate *R. solani* and 3 were binucleate *Rhizoctonia* spp. Investigating restricted PCR products on agarose gel was performed and anastomosis groups and subgroups were determined. Among 29 *R. solani* isolates, 17 isolates were AG4 HG-I and 12 isolates belonged to AG4 HG-II. Pathogenicity tests on red bean cv. Naz revealed that all isolates of *R. solani* were pathogenic on bean. Lower level of pathogenicity was observed for the binucleate *Rhizoctonia* isolates on the root and stem of host plant. Similar levels of pathogenicity were observed for the isolates of AG4 HG-I and AG4 HG-II. This is the first report on exact taxonomic status of *Rhizoctonia* isolates, on the anastomosis groups and subgroups levels, obtained from bean field of Iran.

Conclusion

It can be concluded that *R. solani* AG4 HG-I is the main taxonomic group of *Rhizoctonia*, causing stem and root canker on bean plants in the regions investigated in this research. Binucleate *Rhizoctonia* isolates, which were hypovirulent or avirulent on bean plants might be used in biocontrol assays to investigate their potential for inducing host defense responses against highly pathogenic *R. solani* isolates.

Key words: Identification, PCR-RFLP, *Phaseolus vulgaris*, Taxonomic group, *Thanatephorus cucumeris*