

نقش غده‌های بذری سیب‌زمینی در پراکنش *Rhizoctonia solani* AG-3

روشن محمدی¹ و دوستم‌راد ظفری^{2*}

1- کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

2- نویسنده مسؤول: گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان (zafari_d@yahoo.com)

تاریخ پذیرش: 90/8/11

تاریخ دریافت: 89/2/25

چکیده

بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی یکی از عوامل مهم کاهش عملکرد این محصول در جهان می‌باشد. به منظور بررسی اهمیت انتقال عامل بیماری از طریق غده‌های بذری، 36 جدایه *Rhizoctonia solani* از غده‌های بذری انباری و اندام‌های زیرزمینی گیاه سیب‌زمینی در مناطق مهم سیب‌زمینی کاری استان‌های همدان و کردستان جمع‌آوری شد. آزمایش شناسایی گروه‌های همدهانی و تعیین هسته نشان داد که تمام جدایه‌های به دست آمده AG-3 و چند هسته ای می‌باشند. در آزمون بیماری‌زایی، از میان 23 جدایه انتخابی، بیش از 95 درصد جدایه‌ها نشانه‌های بیماری ریزوکتونیایی روی ساقه‌های جوان سیب‌زمینی را در شرایط گلخانه ایجاد نمودند. در مطالعات مولکولی با استفاده از نشانگر RAPD، تشابه ژنتیکی 10 جدایه انتخابی توسط 12 آغازگر تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تجزیه و تحلیل الگوهای باندهای نشان داد که جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف با سطح تشابه 100 درصد در یک گروه قرار می‌گیرند. وجود تشابه ژنتیکی کامل در بین جدایه‌های به دست آمده از مناطق جغرافیایی مختلف نشان می‌دهد که بیمارگر از طریق غده‌های بذری آلوده به سختینه‌های *R. solani* در منطقه گسترش یافته است. بنابراین، با توجه به اهمیت *R. solani* AG-3، به عنوان عامل اصلی بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی در استان‌های همدان و کردستان و دوام طولانی مدت این قارچ در خاک، لازم است از جابجایی و کاشت غده‌های بذری آلوده به سختینه‌های ریزوکتونیا در مزارع جدید سیب‌زمینی خودداری شود.

کلید واژه‌ها: همدهانی، کردستان، همدان، غده، *RAPD Solanum tuberosum*

مقدمه

می‌باشد در حالی که شوره سیاه به وجود سختینه‌های قارچ در سطح غده‌ها باز می‌گردد. شانکرهای ریزوکتونیایی و شوره سیاه را می‌توان به طور هم‌زمان در یک بوته مشاهده نمود (7).

R. solani که به ریزوکتونیاهای چند هسته‌ای تعلق دارد یک گونه ناهمگن است که شامل تعدادی از افراد مستقل می‌باشد (22). طبقه‌بندی *R. solani* و سایر گونه‌های ریزوکتونیا به گروه‌های همدهانی، به عنوان اولین روش تفکیک

بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی، ناشی از قارچ خاک‌زاد *Rhizoctonia solani* Kühn (شکل جنسی: *Thanatephorus cucumeris* [A. B. Donk] Frank)، یکی از مهمترین بیماری‌های سیب‌زمینی در جهان است. بیمارگر اندام‌های زیرزمینی گیاه سیب‌زمینی از جمله ریشه، ساقه، استولن و غده‌ها را مورد حمله قرار می‌دهد. واژه شانکر ریزوکتونیایی معمولاً به دلیل وجود زخم‌های مشخصه یا شانکر روی جوانه، ساقه و استولن‌ها

را حفظ می کند. شکل جنسی این قارچ (*T. cucumeris*) در شرایط خاص و به ندرت تشکیل می شود و در بیماری زایی *R. solani* روی سیب زمینی نقشی ندارد (23).

با توجه به این که بیماری ریزوکتونیایی یکی از بیماری های مهم سیب زمینی در استان های همدان و کردستان است (2) و تبادل غده های بذری در بین کشاورزان این منطقه امری معمول می باشد، در این تحقیق با استفاده از بررسی تشابه ژنتیکی میان جدایه های به دست آمده از مناطق جغرافیایی مختلف توسط نشانگر RAPD، اقدام به بررسی نقش غده های بذری در انتقال مایه ی تلقیح بیمارگر در مزارع منطقه گردید.

مواد و روش ها

جداسازی و شناسایی عامل بیماری

نمونه های مشکوک به بیماری ریزوکتونیایی از انبارها و مزارع عمده ی نگهداری و کشت سیب زمینی در استان های همدان و کردستان به صورت غده های بذری آلوده به سختینه و گیاهان آلوده به شانکر ریزوکتونیایی در طول سال زارعی 1385 جمع آوری گردیدند (جدول 1). جداسازی و شناسایی بیمارگر از سختینه های سطح غده ها و اندام های آلوده سیب زمینی بر اساس روش کارلینگ و سامنر¹ (11) انجام شد. جهت خالص سازی جدایه های ریزوکتونیا از روش نوک ریسه² استفاده شد. برای انجام این کار، ابتدا جدایه های به دست آمده روی محیط کشت آب آگار³ دو درصد کشت شدند و سپس با استفاده از دستگاه استریومیکروسکوپ⁴ و توسط یک سوزن سترون، سلول انتهایی یکی از

جمعیت ناهمگن به گروه های همگن تر، به طور گسترده ای مورد پذیرش محققین قرار گرفته است (15). برخی از گروه های همدهانی بر اساس اختلافات بیوشیمیایی و ژنتیکی به زیرگروه های کوچک تر تقسیم شده اند (5). در *R. solani* تا کنون 13 گروه همدهانی شامل AG-1 تا AG-13 و 21 زیرگروه شامل AG-1-IB، AG-1-IA، AG-1-IC، AG-1-ID، AG-2-1، AG-2-2IIB، AG-2-2IV، AG-2-3، AG-2-4، AG-2-4، AG-2-4، AG-2-4، AG-2-4، AG-2-4، AG-3-IIB، AG-3-IIA، AG-2-BI، AG-3-TB، AG-4-HG-I، AG-4-HG-II، AG-9-TX، AG-6-HG-I، AG-6-GV و AG-9-TP شناسایی شده است (15).

هر چند که AG-3 *R. solani* عامل غالب ایجاد بیماری ریزوکتونیایی سیب زمینی است، اما اعضای سایر گروه های همدهانی از قبیل AG-1، AG-2-1، AG-4، AG-5، AG-9 هم به عنوان عامل بیماری در مناطق مختلف کشت سیب زمینی در جهان گزارش شده اند (23). علاوه بر این AG-3 *R. solani* از سایر میزبان های گیاهی از قبیل چغندر قند نیز گزارش شده است، اگر چه که عامل اصلی بیماری ریزوکتونیایی در چغندر قند AG-4 و AG-2-2 می باشند (3).

جلوگیری از ورود مایه ی تلقیح عوامل بیماری زا به مزارع جدید، یکی از اصول مهم در مدیریت بیماری های گیاهی می باشد که با اجرای قوانینی از قبیل قرنطینه و برنامه های صدور گواهی بذر و اندام های تکثیری، قابل اجرا می باشد (16). علی رغم اینکه انتقال عوامل بیماری زای گیاهی به روش های مختلفی صورت می گیرد اما در ارتباط با بیماری ریزوکتونیایی سیب زمینی، پراکنش بیمارگر تنها از طریق غده های بذری و خاک آلوده صورت می پذیرد (21)، زیرا که *R. solani* یک قارچ سترون است و تنها به صورت میسیلیوم و سختینه های موجود در سطح غده ها یا درون خاک بقاء خود

1- Carling & Sumner

2- Hyphal tip

3- Water agar

4- Stereomicroscope

ارزیابی شدند. شدت بیماری‌زایی روی ساقه‌های جوان گیاهان سیب‌زمینی بر اساس مقیاس کارلینگ و لینر (9) انجام پذیرفت و داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل شدند.

استخراج DNA

جهت انجام آزمایش RAPD، 10 جدایه که بر اساس پراکنش جغرافیایی انتخاب شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا برای تکثیر میسلیوم، از حاشیه فعال پرگنه‌های رشد یافته روی محیط PDA، به ازای هر جدایه چهار حلقه پنج میلی‌متری به فلاسک‌های حاوی 150 میلی‌لیتر محیط مایع سترون شده پیتون-مخمر-مالت⁴ منتقل شد. فلاسک‌ها به مدت 15 روز در داخل دستگاه شیکر انکوباتور⁵ در دمای 25 درجه سلسیوس و در تاریکی، با سرعت 120 دور در دقیقه، قرار داده شدند. بعد از گذشت این دوره، توده میسلیومی تولید شده پس از صاف شدن با پمپ خلاء تا زمان استخراج DNA، در دمای 20- درجه سلسیوس نگهداری شد.

DNA با استفاده از روش CTAB استخراج شد (19). جهت تعیین کمیت و کیفیت DNA، دو میکرولیتر از DNA هر کدام از نمونه‌ها روی ژل آگارز⁶ 0/8 درصد بارگذاری شد و پس از مقایسه با غلظت DNA استاندارد⁷، غلظت هر کدام به 10ng/μl رسانده شد.

ریسه‌های رشد یافته روی محیط آب آگار دو درصد روی محیط کشت جدید PDA منتقل شد. جدایه‌های شناسایی شده به عنوان *R. solani*، روی محیط مذکور در لوله‌های آزمایش و دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تعیین تعداد هسته‌ها و گروه‌های همدهانی

جهت تعیین وضعیت هسته و همچنین تعیین گروه‌های همدهانی جدایه‌های به دست آمده، از گروه‌های همدهانی محک در دسترس شامل AG-1-IB، AG-2-2-IIIB، AG-3، AG-4، AG-5، AG-6، AG-8، AG-9، AG-10، AG-11 و AG-13 و از تکنیک اسلاید تمیز تشریح شده توسط کرونانلد و استانجلینی¹ (17) استفاده شد.

اثبات بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی مطابق روش کارلینگ و لینر² (9) انجام گرفت. از میان جدایه‌های ریزوکتونیای به دست آمده، 23 جدایه بر اساس محل جغرافیایی و اندام گیاهی انتخاب شدند و آزمایش بیماری‌زایی آنها روی جوانه‌های سیب‌زمینی صورت پذیرفت. غده‌های جوانه‌دار بذری سیب‌زمینی رقم سانت³ پس از ضدعفونی با فرم‌آلدهید دو درصد، در یک مخلوط سترون پیت‌موس-پرلیت (به نسبت 4 و 1) کشت شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. به منظور تلقیح غده‌ها، از کشت چهار روزه جدایه‌های رشد یافته روی محیط PDA، چهار حلقه 10 میلی‌متری در حدود دو سانتی‌متری بالای غده‌های بذری قرار داده شد. گلدان‌ها در 15 ± 1 درجه سلسیوس به مدت پنج هفته نگهداری شدند و در زمان نیاز با آب مقطر سترون آبیاری شدند. بعد از گذشت این دوره گیاهان از گلدان‌ها خارج شده و ضمن شستشو، جهت شدت خسارت روی جوانه‌ها

4- Malt yeast peptone (MYP)

5- Shaker incubator

6- Agaros

7- λ phage

1- Kronland & Stanghellini

2- Carling & Leiner

3- Sante

جدول 1- مشخصات جدایه های *R. solani* به دست آمده از سیب زمینی های آلوده

نام جدایه	اندام	محل**	تاریخ	نام جدایه	اندام	محل	تاریخ
T1	غده بذری	انبار بهار	فروردین 85	P12 ⁺	ساقه و ریشه	صالح آباد	اردیبهشت 85
T2	غده بذری	انبار بهار	فروردین 85	P13 ⁺	ساقه و ریشه	صالح آباد	اردیبهشت 85
T3 ⁺	غده بذری	انبار قروه	فروردین 85	P14	ساقه و ریشه	لالجین	اردیبهشت 85
T4 ⁺	غده بذری	انبار بهار	فروردین 85	P15 ^{**}	ساقه و ریشه	قروه	خرداد 85
T5 ^{**}	غده بذری	انبار قهاوند	فروردین 85	P16 [*]	ساقه و ریشه	قروه	خرداد 85
T6 ^{**}	غده بذری	انبار رزن	فروردین 85	P17 [*]	ساقه و ریشه	قروه	خرداد 85
T7	غده بذری	انبار قهاوند	فروردین 85	P18	ساقه و ریشه	نهاوند	خرداد 85
P1 ⁺	ساقه و ریشه	همدان	اردیبهشت 85	P19	ساقه و ریشه	نهاوند	خرداد 85
P2 ⁺	ساقه و ریشه	همدان	اردیبهشت 85	P20 ⁺	ساقه و ریشه	دهگلان	تیر 85
P3 ⁺	ساقه و ریشه	بهار	اردیبهشت 85	P21 [*]	ساقه و ریشه	دهگلان	تیر 85
P4 ⁺	ساقه و ریشه	بهار	اردیبهشت 85	P22 ^{**}	ساقه و ریشه	دهگلان	تیر 85
P5 ⁺	ساقه و ریشه	بهار	اردیبهشت 85	P23 ⁺	ساقه و ریشه	قروه	تیر 85
P6 ⁺	ساقه و ریشه	بهار	اردیبهشت 85	P24 [*]	ساقه و ریشه	قروه	تیر 85
P7 ⁺	ساقه و ریشه	بهار	اردیبهشت 85	P25 ⁺	ساقه و ریشه	اسدآباد	تیر 85
P8 [*]	ساقه و ریشه	بهار	اردیبهشت 85	P26 ⁺	ساقه و ریشه	کیودرآهنگ	مرداد 85
P9 ⁺	ساقه و ریشه	بهار	اردیبهشت 85	P27	ساقه و ریشه	کیودرآهنگ	مرداد 85
P10 ⁺	ساقه و ریشه	لالجین	اردیبهشت 85	P28 ⁺	ساقه و ریشه	قروه درجزین	مرداد 85
P11 ⁺	ساقه و ریشه	لالجین	اردیبهشت 85	P29 ⁺	ساقه و ریشه	قروه درجزین	مرداد 85

⁺ جدایه های مورد استفاده در آزمایش بیماری زایی

^{*} جدایه های مورد استفاده در بررسی مولکولی

^{**} شهرستان های بهار، لالجین، صالح آباد، نهاوند، قهاوند، رزن، اسدآباد، کیودرآهنگ و قروه درجزین از توابع استان همدان و شهرستان های قروه و دهگلان از توابع استان کردستان می باشند.

صورت؛ چهار دقیقه در 94°C ، 35 چرخه (یک دقیقه در 94°C ، یک دقیقه در 36°C و دو دقیقه در 72°C) و مرحله پایانی شامل پنج دقیقه در 72°C درجه سلسیوس انجام شد.

فراورده های تکثیر شده بر روی ژل آگارز 1/5 درصد به مدت 2/5 ساعت با 80 ولت الکتروفورز شدند و توسط اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی گردیدند. پس از عکس برداری به وجود باند عدد یک و عدم وجود باند عدد صفر داده شد و با استفاده از نرم افزار NTSYS V.2.2 تجزیه و تحلیل انجام گرفت.

بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر RAPD
در بررسی تنوع ژنتیکی توسط نشانگر RAPD، از 12 آغازگر تصادفی 10 نوکلئوتیدی استفاده شد (جدول 2). واکنش زنجیره ای پلیمرز در حجمی معادل 50 میکرولیتر شامل پنج میکرولیتر بافر پی-سی آر (10X)، 2/5 میکرولیتر Mg CL_2 (50mM)، یک میکرولیتر (10mM) dNTPs، پنج میکرولیتر آغازگر (10Pmol/ μl)، 0/6 میکرولیتر آنزیم *Taq DNA Polymerase* (5u/ μl) و 30/9 میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به همراه پنج میکرولیتر DNA (10ng/ μl) الگو انجام گرفت. برنامه حرارتی برای واکنش پی سی آر به

جدول 2- ترتیب توالی آغازگرهای تصادفی مورد استفاده در آزمایش RAPD

ردیف	نام	توالی	ردیف	نام	توالی
1	OPE 01	5'-CCCAAGGTCC-3'	7	OPE 15	5'-ACGCACAACC-3'
2	OPE 02	5'-GGT GCGGGAA-3'	8	OPE 16	5'-GGTGACTGTG-3'
3	OPE 03	5'-CCAGATGCAC-3'	9	OPE 19	5'-ACGGCGTATG-3'
4	OPE 04	5'-GTGACATGCC-3'	10	OPE 20	5'-AACGGTGACC-3'
5	OPE 07	5'-AGATGCAGCC-3'	11	OPA 02	5'-TGCCGAGCTG-3'
6	OPE 14	5'-TGCGGCTGAG-3'	12	R 20	5'-ACGGCAAGGA-3'

نتایج و بحث

جداسازی قارچ و تعیین گروه‌های همدهانی و تعداد هسته‌ها

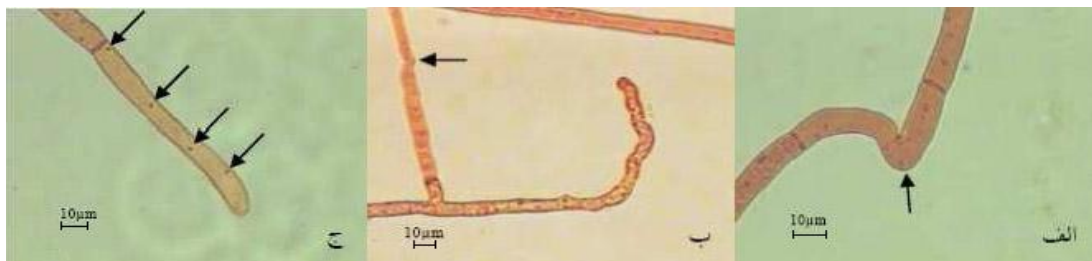
از میان نمونه‌های جمع‌آوری شده، در مجموع هفت جدایه از سختینه‌های سطح غده‌های بذری نگهداری شده در انبار و 29 جدایه از اندام‌های زیرزمینی گیاه سیب‌زمینی در مزارع جداسازی و خالص شد. تمام 36 جدایه‌ی به دست آمده متعلق به AG-3 بودند. در غالب موارد واکنش همدهانی صورت گرفته بین جدایه‌های مجهول و جدایه‌ی محک از نوع همدهانی ناقص (C2) بود. در این حالت سلول‌های همدهان شده و گاهی سلول‌های مجاور آنها از بین می‌روند (شکل 1، ب). در واکنش C3، دیواره و غشا سلول‌های همدهان شده ترکیب شده و نقطه همدهان بطور کامل مشخص نیست و سلول مرده وجود ندارد (شکل 1، الف). بر اساس مطالعات مکینیش و همکاران¹ (18) واکنش همدهانی C2 نشان دهنده وجود تفاوت‌های ژنتیکی بین جدایه‌ها می‌باشد. در اکثر مناطق سیب‌زمینی کاری جهان به غیر از AG-3 سایر گروه‌های همدهانی، بیماری‌زایی چندانی روی سیب‌زمینی ندارند (4، 14 و 20). با این وجود، گروه‌های همدهانی دیگری از

جمله AG-1 (14)، AG-2-1 (8)، AG-4، AG-5 (6) و AG-9 (10) نیز در ارتباط با غده و سایر اندام‌های سیب‌زمینی در مناطق مختلف جهان گزارش شده است. هر چند که انتظار می‌رفت در میان جدایه‌های به دست آمده، گروه‌های همدهانی مختلف مرتبط با سیب‌زمینی به دست آید، اما از آنجا که کشت سیب‌زمینی در این منطقه غالباً در طول ماه‌های خنک فصل بهار صورت می‌گیرد و AG-3 نسبت به سایر گروه‌های همدهانی در برابر دماهای پایین مقاوم‌تر است، در طول مراحل اولیه رشد بوته‌های سیب‌زمینی تنها این گروه همدهانی قادر به فعالیت است (22). البته با بالا رفتن دمای خاک سایر گروه‌های همدهانی نیز فعال می‌شوند اما از آنجا که گیاه در این مرحله کاملاً توسعه می‌یابد قارچ دیگر قادر به ایجاد شانکر روی اندام‌های زیرزمینی آن نمی‌باشد (4 و 9). از نظر تعداد هسته‌ها، تمام جدایه‌های جمع‌آوری شده چند هسته‌ای بودند (شکل 1، ج). نتایج به دست آمده با تحقیقات صورت گرفته در ژاپن و پاکستان در زمینه بررسی ریزوکتونیاهای مرتبط با سیب‌زمینی مطابقت دارد (20 و 22).

آزمایش بیماری‌زایی

در بررسی آزمایش بیماری‌زایی از میان 23 جدایه انتخاب شده، 22 جدایه روی جوانه‌های سیب‌زمینی ایجاد بیماری کردند و تنها جدایه‌ی شماره P12 علایم بیماری ریزوکتونیایی را نشان نداد.

1- MacNish *et al.*



شکل 1- الف، واکنش همدانه‌های کامل یا C3 (محل پیکان)، ب، واکنش همدانه‌های ناقص یا C2 (محل پیکان) و ج، هسته‌های موجود در سلول انتهایی یک ریشه جوان (پیکان‌ها)

به دلیل همپوشانی آشیانه اکلوزیک آنها با گیاه سیب‌زمینی باشد زیرا در بازرسی‌های صورت گرفته، مزارعی که با تاخیر کشت شده بودند و بوته‌های سیب‌زمینی در دماهای بالا رشد کرده بودند، نشانه‌های شانکر ریزوکتونیایی روی اندام‌های زیرزمینی آنها به ندرت مشاهده می‌شد. ارتباط قابل توجه جدایه‌های *R. solani* AG-4 به عنوان بیمارگر محصول سیب‌زمینی در مناطق معتدل چین و پرو (14) و همچنین جداسازی جدایه‌های *R. solani* AG-4 و AG-5 از سیب‌زمینی آلوده به شانکر ریزوکتونیایی در مناطق مرکزی ایران توسط بلالی و همکاران² (6) نیز می‌تواند این نتایج را تأیید نماید.

تمامی جدایه‌های به دست آمده از سختینه‌های سطح غده‌های بذری مورد استفاده در آزمایش بیماری‌زایی، روی جوانه‌های سیب‌زمینی بیماری‌زا بودند. برخی از این جدایه‌ها از لحاظ شدت بیماری‌زایی با برخی از جدایه‌های بدست آمده از ساقه و ریشه یکسان بودند. این نتایج نشان می‌دهد که منبع مایه‌ی تلقیح عامل بیماری تأثیری در شدت بیماری‌زایی ندارد و با آزمایشات انجام گرفته توسط کارلینگ و لینر (8) همخوانی دارد.

نتایج تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS نشان داد که جدایه‌های مختلف آزمایش شده، از لحاظ شدت بیماری‌زایی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر دارند (جدول 3) که با نتایج فرخی‌نژاد و همکاران¹ (15) همخوانی دارد و می‌تواند به دلیل وجود تفاوت‌های ژنتیکی در میان جدایه‌های *R. solani* AG-3 باشد. با توجه به اینکه تمام جدایه‌های به دست آمده به گروه همدانه‌های سه تعلق داشتند و بیش از 95 درصد آنها در شرایط گلخانه قادر به ایجاد شانکر روی ساقه‌های جوان بوته‌های سیب‌زمینی شدند، این نتیجه حاصل می‌شود که عامل اصلی بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی در استان همدان و کردستان *R. solani* AG-3 می‌باشد که با مطالعات قبلی در زمینه عامل بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی مطابقت دارد (2، 8 و 20). عدم جداسازی سایر گروه‌های همدانه‌های از سیب‌زمینی‌های آلوده این منطقه می‌تواند بیانگر این موضوع باشد که سایر گروه‌های همدانه‌های دماهای بالاتری فعال شده و نقش چندانی در ایجاد بیماری روی سیب‌زمینی‌های کشت شده در این ناحیه ندارند و ممکن است تنها روی غده‌های دختری تشکیل سختینه دهند. در حقیقت، توانایی بیماری‌زایی جدایه‌های *R. solani* AG-3 روی سیب‌زمینی در این منطقه ممکن است

2- Balali et al.

1- Farrokhi-Nijad et al.

جدول 3- مقایسه میانگین شدت بیماری‌زایی جدایه‌های مورد آزمایش

نام جدایه	شدت بیماری‌زایی	نام جدایه	شدت	نام جدایه	شدت بیماری‌زایی	نام جدایه	شدت
T3	2 AB*	P3	2 AB	P10	2 AB	P22	2 AB
T4	2 AB	P4	2 AB	P11	1 BC	P23	1 BC
T5	3 A	P5	3 A	P12	0 C	P25	3 A
T6	2 AB	P6	3 A	P13	1 BC	P26	1 BC
P1	1BC	P7	1 BC	P15	2 AB	P29	3 A
P2	2 AB	P9	1 BC	P20	1 BC		

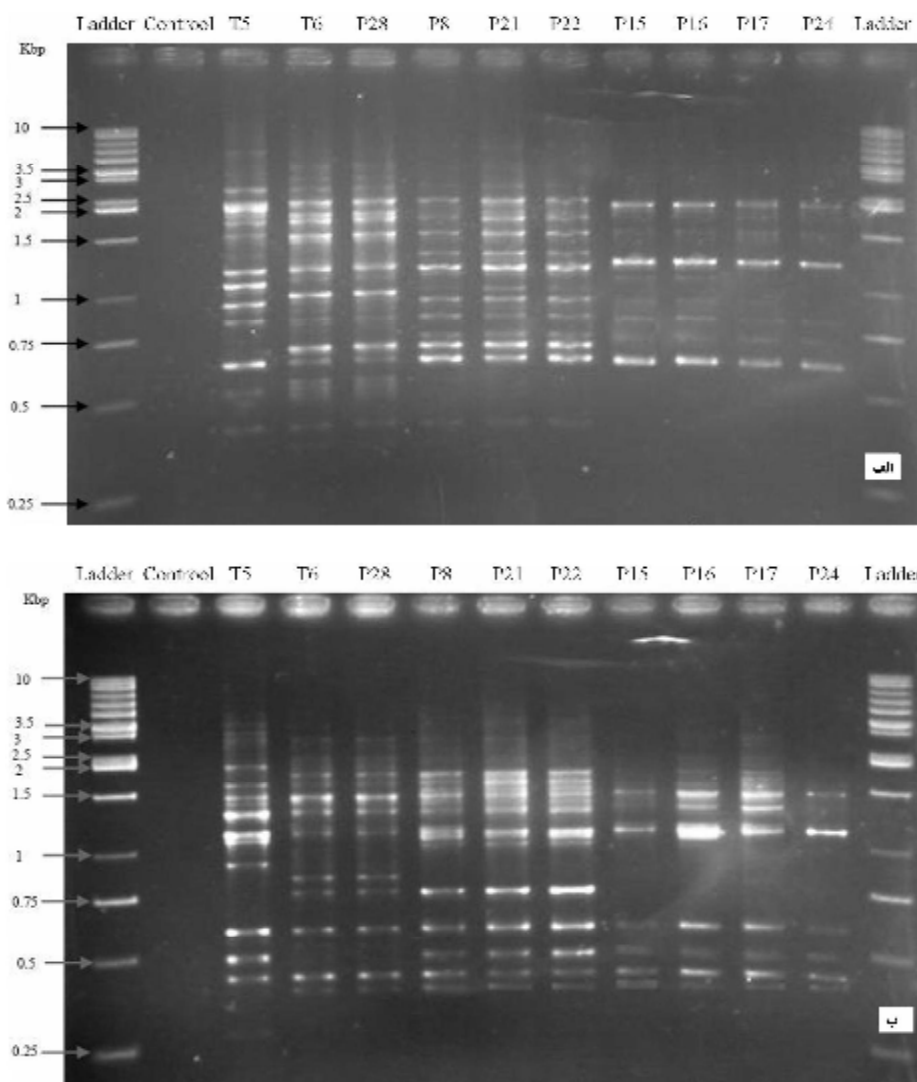
* اعداد، میانگین سه تکرار هستند. میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک نیستند بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال 99 درصد تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهند.

بررسی‌های مولکولی

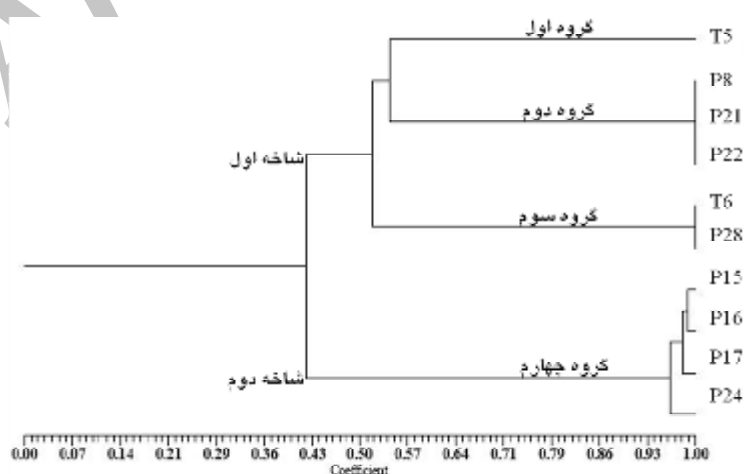
از میان 12 آغازگر تصادفی مورد استفاده (جدول 2)، 11 آغازگر بر اساس چندشکلی به دست آمده و وضوح باندها انتخاب شدند. نتایج الگوی باندهای آغازگرهای OPE 19 و OPE 20 در شکل 2 نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده از تجزیه و تحلیل 11 آغازگر تصادفی مورد استفاده با استفاده از روش¹ UPGMA و ضریب تشابه جاکارد²، جدایه‌ها مورد آزمایش با 42 درصد تشابه در دو شاخه مجزا قرار گرفتند (شکل 3). تمامی جدایه قرار گرفته در شاخه‌ی اول از استان همدان و تمامی جدایه‌های قرار گرفته در شاخه دوم از استان کردستان (شهرستان قروه) جمع‌آوری شده‌اند. تنها مورد استثناء مربوط به جدایه‌های گروه دوم می‌باشد. در این حالت جدایه‌های P21 و P22 که از استان کردستان (شهرستان دهگلان) جداسازی شده‌اند با جدایه P8 که از استان همدان (شهرستان بهار) جداسازی شده است، با 100 درصد تشابه در یک گروه قرار گرفته‌اند. این در حالی است که جدایه‌های قرار گرفته در گروه چهارم که همگی از یک مزرعه

جمع‌آوری شده‌اند، به لحاظ ژنتیکی کاملاً مشابه نیستند که بیانگر وجود تنوع ژنتیکی وسیع در جدایه‌های *R. solani* AG-3 می‌باشد. این موضوع توسط محققین مختلف از جمله بلالی و همکاران (5 و 6) نیز به اثبات رسیده است. بنابراین تشابه ژنتیکی کامل جدایه‌های به دست آمده از دو منطقه جغرافیایی مختلف در دو استان همجوار نشان می‌دهد که جدایه‌های مذکور احتمالاً از یک کلن بوده و از آنجا که سختینه و میسیلیوم‌های سطح غده‌های بذری به عنوان معمول‌ترین راه پراکنش این بیمارگر شناخته شده است (6 و 12)، به نظر می‌رسد که انتقال بیمارگر توسط غده‌های بذری صورت گرفته باشد. این در حالی است که کشاورزان شهرستان بهار در استان همدان سالانه به طور وسیعی اقدام به اجاره مزارع مناسب جهت کشت سیب‌زمینی در استان کردستان می‌نمایند و بذر مورد نیاز را معمولاً از شهرستان بهار تهیه می‌نمایند. همچنین بر اساس شکل 3، با وجود اینکه جدایه‌های T6 و P28 به ترتیب از سختینه‌های سطح غده‌های بذری در انبار و اندام‌های زیرزمینی سیب‌زمینی در مزرعه جداسازی شده‌اند، دارای تشابه ژنتیکی 100 درصدی هستند. در نتیجه، عدم نظارت دقیق بر جابجایی محموله‌های بذری در پست‌های قرنطینه‌ای بین استان‌های مذکور و برنامه‌های صدور

1- Unweighted pair group method using arithmetic mean
2- Jaccard



شکل 2- الگوی باندهای جدایه‌های *Rhizoctonia solani* AG-3 با استفاده از آغازگرهای الف (الف) OPE 19 و ب (ب) OPE 20



شکل 3- دندروگرام حاصل از بررسی نتایج RAPD مربوط به 11 پرایمر با استفاده از روش UPGMA و ضریب جاکارد که بیانگر ارتباط ژنتیکی جدایه‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف می‌باشد

بقاء منجر به استقرار آلل‌ها یا ژنوتیپ‌های جدید در آن منطقه شود (13) و همچنین استان‌های همدان و کردستان به عنوان یکی از قطب‌های تولید این محصول در کشور مورد توجه هستند، لزوم انجام اقدامات لازم جهت اجرای برنامه‌های دقیق صدور گواهی بذر و همچنین جلوگیری از جابجایی محموله‌های بذری آلوده به منظور ممانعت از پراکنش عامل بیماری ریزوکتونیای سیب‌زمینی و سایر بیمارگرهای بذرزاد پیشنهاد می‌گردد.

گواهی بذر می‌تواند علاوه بر انتقال بیماری ریزوکتونیای سیب‌زمینی، خطر پراکنش نماتد سیست سیب‌زمینی (*Globodera rostochiensis*) را نیز که اخیراً از استان همدان گزارش شده است (1)، بالا ببرد زیرا این نماتد نیز از طریق سیست‌های روی غده‌های بذری و خاک باقیمانده در ته محموله‌ها انتقال می‌یابد (23). در نهایت، با توجه به اینکه ورود یک بیمارگر گیاهی به منطقه جدید می‌تواند ضمن استقرار، تولید مثل و

منابع

1. گیتی، م. و تنها معافی، ز. 1387. گزارش وجود نماتد قرنطینه‌ای سیست سیب‌زمینی در استان همدان. هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، همدان، ص 604.
2. محمدی بایتمر، ر.، ظفری، د.، سالاری، م. و ارجمندیان، ا. 1387. شناسایی گروه‌های آناستوموزی ریزوکتونیاهای مرتبط با سیب‌زمینی در استان‌های همدان و کردستان. هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران، همدان، ص 173.
3. مومنی، ح.، فلاحتی رستگار، م.، مظفری، ج. و جعفرپور، ب. 1385. تعیین گروه‌های ریشه پیوند جدایه‌های قارچ ریزوکتونیا سولانی در مزارع چغندرقد استان خراسان. مجله‌ی علوم و صنایع کشاورزی، جلد 20، شماره 1، صص 47-56.
4. Anguiz, R., and Martin, C, 1989. Anastomosis group, pathogenicity, and other characterization of *Rhizoctonia solani* isolated from potatoes in Peru. Plant Disease, 73: 199-201.
5. Balali, G.R., Neate, S.M., Kasalkheh, A.M., Stodart, B.J., Melanson, D.L., and Scott, E. S. 2007. Intraspecific variation of *Rhizoctonia solani* AG-3 isolates recovered from potato fields in central Iran and South Australia. Mycopathologia, 163: 105-115.
6. Balali, G.R., Neate, S.M., Scott, E.S., Whisson, D.L., and Wicks, T.J. 1995. Anastomosis group and pathogenicity of isolates of *Rhizoctonia solani* from crops in South Australia. Plant Pathology, 44: 1050-1057.
7. Banville, G.J., Carling, D.E., and Otrysko, B.E. 1996. *Rhizoctonia* disease on potato. In Sneh, B. Jabaji-Hare, S. Neate, S., and Dijst, G. (eds.), *Rhizoctonia* species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp: 321-330.

8. Carling, D.E., and Leiner, R.H. 1986. Isolation and characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate *R. solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology*, 76: 725-729.
9. Carling, D.E., and Leiner, R.H. 1990. Effect of temperature on virulence of *Rhizoctonia solani* and other *Rhizoctonia* on potato. *Phytopathology*, 80: 930-934.
10. Carling, D.E., Leiner, R.H., and Kebler, K.M. 1987. Characterization of a new anastomosis group (AG-9) of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 77: 1609-1612.
11. Carling, D.E., and Sumner, D.R. 1993. *Rhizoctonia*. In Singleton, L.L. Mihail, J.D., and Rush, C.M. (eds.), *Methods for Research on Soilborne Phytopathogenic Fungi*. American Phytopathological Society: St. Paul, MN. USA, pp: 157-165.
12. Ceresini, P.C., Shew, H.D., Vilgalis, R.J., and Cubeta, M.A. 2002a. Genetic diversity of *Rhizoctonia solani* AG-3 from potato and tobacco in North Carolina. *Mycologia*, 94: 437-449.
13. Ceresini, P.C., Shew, H.D., Vilgalis, R.J., Gale, L.R., and Cubeta, M.A. 2002b. Detecting migrants in populations of *Rhizoctonia solani* anastomosis group 3 from potato in North Carolina using multilocus genotype probabilities. *Phytopathology*, 93: 610-615.
14. Chang, Y.C., and Tu, C.C. 1980. Pathogenicity and different anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn to potatoes. (Abstr.). *Journal of Agriculture Research, China*, 29:1.
15. Farrokhi-Nijad, R., Cromey, M.G., and Moosawi-Jorf, S.A. 2007. Determination of the anastomosis grouping and virulence of *Rhizoctonia* spp. associated with potato tubers grown in Lincoln, New Zealand. *Pakistan Journal Biological Sciences*, 10(21): 3786-3793.
16. Forrest, W., and Nutter, J.R. 2007. The Role of plant disease epidemiology in developing successful integrated disease management programs. In Ciancio, A., and Mukerji, K.G. (eds.), *General Concepts in Integrated Pest and Disease Management*. Springer Publisher, Dordrecht, The Netherlands, pp: 45-79.
17. Kronland, W.C., and Stanghellini, M.E. 1988. Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*. *Phytopathology*, 78: 820-822.
18. MacNish, G.C., Carling, D.E., and Brainard, K.A. 1995. Relationship of microscopic and macroscopic vegetative reactions in *Rhizoctonia solani* and the occurrence of vegetatively copulations (VCPs) in AG-8. *Mycological Research*, 101: 61-68.
19. Murray, M.G., and Thompson, W.F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acid Research*, 8: 4321-4325.
20. Rauf, C.A., Ahmad, I., and Ashraf, M. 2007. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* Kühn isolates from potato in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 39(4): 1335-1340.

21. Ritchie, F., McQuilken, M.P., and Bain, R.A. 2006. Effects of water potential on mycelial growth, sclerotial production, and germination of *Rhizoctonia solani* from potato. *Mycological Research*, 110: 725-733.
22. Sneh, B. Burppe, L., and Ogoshi, A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological society. St. Paul, MN., 133 p.
23. Stevenson, W.R., Loria, R., Franc, D.G., and Weingartner, D.P. 2004. Compendium of Potato Diseases (2th ed.). American Phytopathological society. St. Paul, MN. 106 p.

Archive of SID