گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia solani* از سیب‌زمینی و بررسی گروه‌های سازگار رویشی آنها با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی و نشانگر RAPD*

ANASTOMOSIS GROUPS OF *Rhizoctonia solani* FROM POTATO AND SURVEY OF SOMATIC COMPATIBLE GROUPS BY MORPHOLOGICAL CHARACTERS AND RAPD MARKER

روشن محمدی بایتمر[۱]، محمد سالاری[۱] و دوستمراد ظفری[۲]**

(تاریخ دریافت: ۸۷/۱۲/۲۷؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۵)

چکیده

با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی و نشانگر RAPD، ۵۸ جدایه *Rhizoctonia solani* جداشده از غده و ساقه زیرزمینی سیب‌زمینی، از استان‌های همدان و کردستان مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی جدایه‌ها چند هسته‌ای بودند و در میان آنها ۵۶ جدایه متعلق به AG-3، یک جدایه متعلق به AG-4 و یک جدایه با هیچ‌کدام از گروه‌های آناستوموزی محک در دسترس آناستوموز نداد. در بررسی گروه‌های سازگار رویشی، ۵۶ جدایه متعلق به AG-3 روی محیط کشت PDA حاوی یک درصد زغال فعال با یکدیگر جفت شدند و ۴۳ گروه سازگار رویشی حاصل شد. در ۳۵ گروه از آنها، هر یک تنها دارای یک جدایه بودند. یک گروه که به‌عنوان بزرگ‌ترین گروه شناخته شد (EE) دارای چهار جدایه بود که همگی از مزارع قروه کردستان جداسازی شده بودند و هفت گروه باقی‌مانده دارای دو یا سه جدایه بودند. شدت بیماری‌زایی جدایه‌های متعلق به AG-3 به‌عنوان یک گروه، روی جوانه‌های سیب‌زمینی نسبت به جدایه‌ی متعلق به AG-4 بالاتر بود و جدایه نامشخص، علایمی ایجاد نکرد. در نهایت تنوع ژنتیکی چهار گروه سازگار رویشی انتخابی شامل E، F، T و EE توسط نشانگر RAPD آزمایش شد. نتایج تجزیه خوشه‌ای بر اساس روش UPGMA و ضریب جاکارد نشان داد که جدایه‌ها در سطح تشابه حداقل ۴۲ درصد به چهار گروه تقسیم شدند و نتایج بررسی‌های ریخت شناسی را تایید نمود.

واژه‌های کلیدی: *Solanum tuberosum*، Anastomosis، RAPD، همدان، کردستان

Archive of SID

* : بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی ، دانشگاه زابل

** : مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zafari_d@yahoo.com

۱.به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیماری شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زابل

۲. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

www.SID.ir

مقدمه

بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی ناشی از *R. solani* Kuhn (Tel: *Thantephorus cucumeris* Donk) یکی از بیماری‌های مهم سیب‌زمینی در مناطق خنک جهان است. این قارچ در اوایل فصل رشد باعث ایجاد شانکر روی ساقه و استولن شده و در انتهای فصل منجر به تشکیل توده‌های سیاه روی غده‌های دختری می‌شود (Stevenson *et al*. 2004, Carling *et al*. 1989). در ایران ریزوکتونیاهای دوهسته‌ای و چندهسته‌ای گزارش شده است (Poozeshi *et al.* 2006). در حال حاضر ۱۴ گروه آناستوموزی (AG-1 تا AG-13 و AG-BI) از *R. solani* گزارش شده است که بیماری‌زایی و دامنه میزبانی آنها با یکدیگر متفاوت می‌باشد (Carling *et al.* 2002).

جفت‌کردن جدایه‌های ناسازگار رویشی *R. solani* منجر به تشکیل ریسه‌های هتروکاریون در محل تلاقی میسیلیوم‌ها می‌شود که به‌صورت یک مرز در بین پرگنه‌های آنها قابل تشخیص است (Butler & Bolkan 1973). این محققین با استفاده از محیط کشت PDA اصلاح شده با یک درصد زغال فعال توانستند در کمترین زمان واکنش ناسازگاری رویشی را مشاهده کنند. هم‌چنین دسته‌های میسیلیوم هتروکاریون در جدایه‌های ناسازگار روی این محیط ضخیم‌تر بود.

تودا و همکاران (Toda *et al.* 1999) با استفاده از نشانگر RAPD توانستند جدایه‌های AG-D را به دو زیر گروه AG-D (I) و AG-D (II) تقسیم نمایند. هر چند که نشانگر RAPD برای تفکیک جدایه‌های متعلق به گروه‌های آناستوموزی مختلف نیز استفاده شده است (Momeni *et al.* 2005). *محمودی و مصباح* (Mahmoudi & Mesbah 2005) با استفاده از نشانگر RAPD، جدایه‌های متعلق به گروه‌های آناستوموزی مختلف به‌دست آمده از چغندرقند را از یکدیگر تفکیک نمودند. *سرزینی و همکاران* (Ceresini *et al.* 2002) نشان دادند که جدایه‌های *R. solani* AG-3 با الگوهای AFLP یکسان، از لحاظ رویشی با یکدیگر سازگار هستند. هم‌چنین *بلالی و همکاران* (Balali *et al.* 2007) با استفاده از نشانگرهای مولکولی و مطالعات بیوشیمیایی، تنوع میان جدایه‌های *R. solani* AG-3 به‌دست آمده از سیب‌زمینی در مناطق مرکزی ایران و جنوب استرالیا را به اثبات رسانده‌اند. هر چند که تاکنون گروه‌های آناستوموزی به‌عنوان یک مشخصه مهم در طبقه‌بندی *R. solani* به‌کار گرفته شده است، ولی محققین اعتقاد دارند که می‌توان از واکنش‌های رویشی جهت تفکیک جدایه‌های با خصوصیات ژنتیکی متفاوت یا نزدیک به یکدیگر استفاده کرد (Cubeta & Vilgalys 1997). هدف این تحقیق، شناسایی ریزوکتونیاهای مرتبط با سیب‌زمینی در استان‌های همدان و کردستان و بررسی گروه‌های سازگار رویشی آنها با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی و بررسی مولکولی و مقایسه نتایج آنها می‌باشد.

روش بررسی

در بهار و تابستان سال ۱۳۸۵، از مزارع و انبارهای سیب‌زمینی در مناطق مختلف استان‌های همدان و کردستان نمونه‌برداری به‌عمل آمد. جداسازی بیمارگر از اسکلروت‌های سطح غده‌ها و اندام‌های آلوده سیب‌زمینی و هم‌چنین شناسایی آنها بر اساس روش *کارلینگ و سامنر* (Carling & Sumner 1993) انجام شد. خالص‌سازی به روش نوک ریسه (Hyphal Tip) انجام شد.

جهت تعیین وضعیت هسته و گروه‌های آناستوموزی جدایه‌های به‌دست آمده، از گروه‌های آناستوموزی محک در دسترس شامل AG-1-IB، AG-2-2-B، AG-3، AG-4،

Archive of SID

www.SID.ir

AG-5، AG-6، AG-8، AG-9، AG-10، AG-11 و AG-13 و از تکنیک اسلاید تمیز توصیف شده توسط *کرونلاند و استانگلینی* استفاده شد (Kronland & Stanghellini 1988).

جهت تعیین گروه‌های سازگار رویشی، جدایه‌های متعلق به AG-3 بر اساس روش *سرزینی و همکاران* (Ceresini *et al.* 2002) روی محیط کشت PDA حاوی یک درصد زغال فعال با یکدیگر جفت شدند. محل تلاقی پرگنه‌های دو جدایه، بعد از چهار روز نگه‌داری در دمای ۲۵°C، به‌صورت ماکروسکوپی بررسی شد (شکل ۱).

آزمایش بیماری‌زایی روی ۲۵ جدایه انتخابی شامل ۲۳ جدایه متعلق به AG-3، جدایه AG-4 و جدایه نامشخص، بر اساس روش *کارلینگ و لینر* (Carling & Leiner 1990) روی جوانه‌های سیب‌زمینی انجام گرفت. شدت بیماری روی ساقه‌های جوان گیاهان سیب‌زمینی طبق روش *کارلینگ و لینر* (Carling & Leiner 1990) ارزیابی شد و داده‌های به‌دست آمده با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل گردید.

چهار گروه سازگار رویشی E، F، T و EE (جدول ۱) که شامل ۱۰ جدایه *R. solani* AG-3 بودند، جهت انجام آزمایش RAPD مورد استفاده قرار گرفتند. ابتدا این جدایه‌ها درون فلاسک‌های حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع سترون شده MYP کشت شدند و در داخل دستگاه شیکر انکوباتور در دمای ۲۵°C و شرایط تاریکی، با سرعت ۱۲۰دور در دقیقه قرار گرفتند. پس از ۱۵ روز توده‌ی میسیلیومی صاف شد. DNA با استفاده از روش هگزا-دسیل-تری‌متیل آمونیوم بروماید (Hexa-Decyl-Tri Methyl Ammonium Bromide, CTAB, Sigma Chemical Co.) استخراج شد (Murray & Thompson 1980).

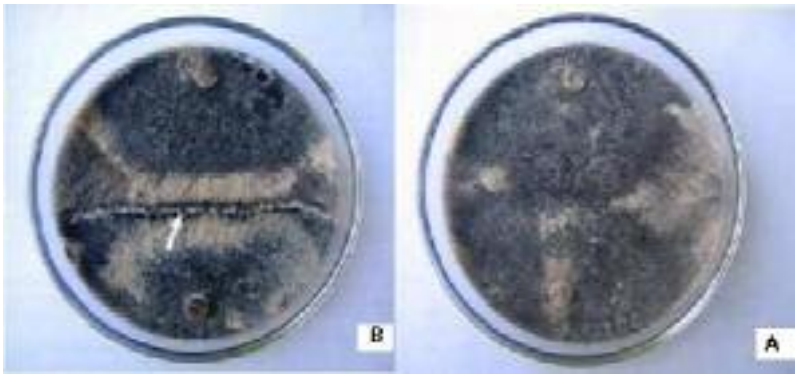
در بررسی تنوع ژنتیکی توسط نشانگر RAPD، از دوازده آغازگر تصادفی ۱۰ نوکلئوتیدی شامل OPE 01، OPE 02، OPE 03، OPE 04، OPE 07، OPE 14، OPE 15، OPE 16، OPE 19، OPE 20، OPA 02 و R 20 استفاده شد. تکثیر DNA در حجمی معادل ۵۰ میکرولیتر از مخلوط واکنش PCR شامل پنج میکرولیتر بافر PCR (10 X)، ۲/۵ میکرولیتر Mg CL2 (50mM)، یک میکرولیتر dNTPs (10 mM)، پنج میکرولیتر آغازگر (10 Pmol/µl)، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (5u/µl) و ۳۰/۹ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه به همراه پنج میکرولیتر DNA (10ng/µl) انجام شد. محصول PCR در ولتاژ ۸۰ به مدت ۲/۵ ساعت روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شد. بعد از رنگ آمیزی ژل با اتیدیوم بروماید، نتایج با استفاده از نرم‌افزار NTSYS V.2.2 روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد تجزیه و تحلیل انجام شد.

نتایج و بحث

از میان نمونه‌های جمع‌آوری شده، در مجموع هشت جدایه ریزوکتونیا از غده‌های انباری و ۵۰ جدایه از اندام‌های زیرزمینی سیب‌زمینی به‌دست آمد. از ۵۸ جدایه به‌دست آمده، ۵۶ جدایه متعلق به AG-3، یک جدایه متعلق به AG-4 و یک جدایه با هیچ‌کدام از گروه‌های آناستوموزی محک در دسترس در این بررسی واکنش نداد. جدایه‌ی قرار گرفته در AG-4 از اسکلروت‌های سطح غده بذری جداسازی شد ولی جدایه نامشخص از ساقه آلوده به‌دست آمد. در غالب موارد واکنش آناستوموز صورت گرفته بین جدایه‌های مجهول و جدایه محک از نوع آناستوموز ناقص (C۲) بود. در این حالت سلول‌های آناستوموز دهنده و گاهی سلول‌های مجاور آنها از بین می‌روند. واکنش آناستوموزی C۲ نشان‌دهنده وجود

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. بررسی سازگاری رویشی بین جدایه‌های *Rhizoctonia solani* به‌دست آمده از سیب‌زمینی. واکنش صورت گرفته بین دو جدایه سازگار رویشی (A) و دو جدایه ناسازگار رویشی (B). پیکان، مرز تشکیل شده ناشی از تشکیل ریسه‌های هتروکاریون را نشان می‌دهد.

Fig. 1. Somatic compatible examination among *Rhizoctonia solani* isolates obtained from potato. Accomplished interaction between two somatic compatible isolates (A) and two somatic incompatible isolates (B). Arrow, shown the reaction line caused by formation of heterocarions hypha.

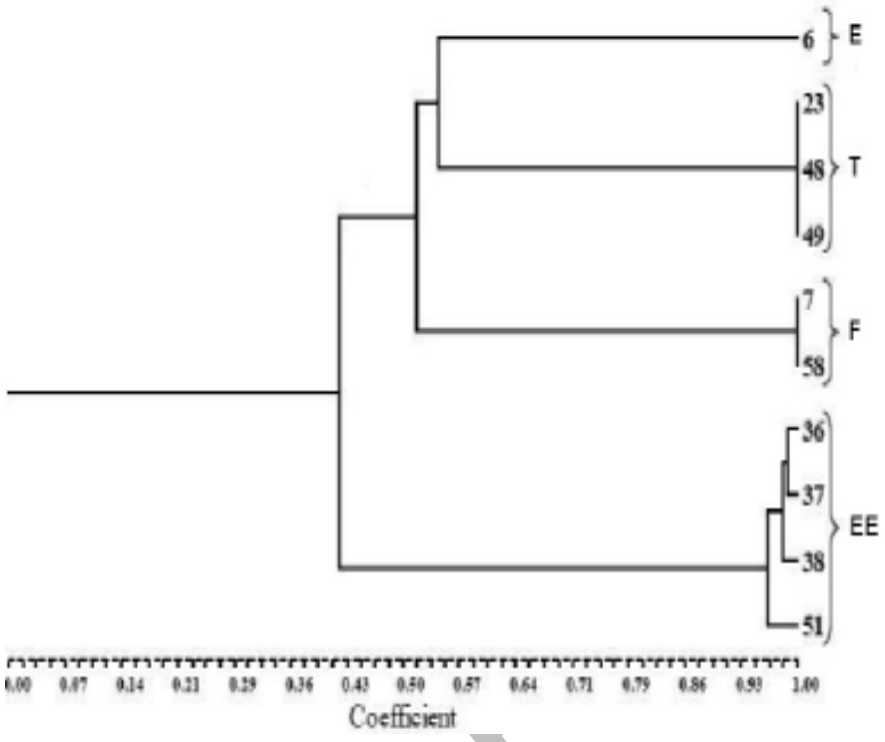
جدول ۱. نتایج بررسی گروه‌های سازگار رویشی جدایه‌های متعلق به *Rhizoctonia solani* AG-3.

Table 1. Results of somatic compatible group test in isolates of *Rhizoctonia solani* AG-3.

ردیف Row	نام گروه Group	شماره جدایه(ها) Isolate(s)	ردیف Row	نام گروه Group	شماره جدایه(ها) Isolate(s)	ردیف Row	نام گروه Group	شماره جدایه(ها) Isolate(s)
1	A	2	16	P	18	31	EE	36، 37، 38 و 51
2	B	3	17	Q	20	32	FF	39
3	C	4 و 47	18	R	21	33	GG	40
4	D	5	19	S	22	34	HH	41
5	E	6	20	T	23، 48 و 49	35	II	42
6	F	7 و 58	21	U	24	36	JJ	43
7	G	8	22	V	25	37	KK	44
8	H	9	23	W	26	38	LL	45
9	I	10	24	X	27	39	MM	50
10	J	11 و 59	25	Y	28	40	NN	52
11	K	12، 13 و 33	26	Z	29، 34 و 54	41	OO	53
12	L	14	27	AA	30	42	PP	55 و 57
13	M	15	28	BB	31	43	QQ	56
14	N	16	29	CC	32			
15	O	17	30	DD	35			

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۲. دندروگرام به‌دست آمده از بررسی نتایج RAPD با استفاده از روش UPGMA و ضریب جاکارد که بیانگر ارتباط ژنتیکی جدایه‌های قرار گرفته در هر کدام از گروه‌های سازگار رویشی می‌باشد.

Fig. 2. Dendrogram obtained from RAPD test using UPGMA method and Jaccard coefficient explanting genetic relationship between each group isolates.

تفاوت‌های ژنتیکی بین جدایه‌ها می‌باشد (MacNish *et al.* 1995). در اکثر مناطق سیب‌زمینی‌کاری جهان به غیر از AG-3 سایر گروه‌های آناستوموزی بیماری‌زایی چندانی روی سیب‌زمینی ندارند (Rauf *et al.* 2007, Chang & Tu 1980). با این حال به غیر از AG-3، گروه‌های آناستوموزی دیگری از جمله AG-1-IA، AG-2-1، AG-2-2، AG-4، AG-5، AG-6 و AG-7 در ارتباط با غده و گیاهان سیب‌زمینی گزارش شده است (Farrokhi-Nijad *et al.* 2007). بیش از ۹۶ درصد جدایه‌های به‌دست آمده در این بررسی *R. solani* AG-3 بودند. این بدان دلیل است که کشت سیب‌زمینی در این منطقه (به‌ویژه در استان همدان) از اواسط اسفند ماه شروع می‌شود و هم‌چنین AG-3 نسبت به سایر گروه‌های آناستوموزی نسبت به دماهای پایین مقاوم‌تر است (Sneh *et al.* 1991). البته با بالا رفتن دمای خاک، سایر گروه‌های آناستوموزی نیز فعال می‌شوند ولی از آنجا که گیاه در این مرحله کاملاً توسعه می‌یابد قارچ دیگر قادر به ایجاد شانکر روی اندام‌های زیرزمینی آن نمی‌باشد و ممکن است فقط روی غده‌های دختری ایجاد اسکلروت نماید (Carling & Leiner 1990). از نظر تعداد هسته، تمام جدایه‌های جمع‌آوری شده چندهسته‌ای بودند که با مطالعات صورت گرفته در ژاپن و پاکستان روی ریزوکتونیاهای مرتبط با سیب‌زمینی مطابقت دارد (Sneh *et al.* 1991, Rauf *et al.* 2007).

از ۵۶ جدایه مورد بررسی در آزمایش گروه‌های سازگار رویشی، ۴۳ گروه سازگار رویشی به‌دست آمد (جدول ۱).

Archive of
www.SID.ir

از میان این جدایه‌ها، ۳۵ جدایه تنها با پرگنه‌های خود سازگاری نشان دادند و هر کدام از آنها به تنهایی یک گروه را تشکیل دادند و ۲۱ جدایه باقی‌مانده در قالب هشت گروه سازگار رویشی شامل C، F، J، K، T، Z، EE و PP قرار گرفتند. در این حالت جدایه‌های قرار گرفته در هر گروه علاوه بر سازگاری با پرگنه‌های خود با پرگنه سایر جدایه‌های قرار گرفته در آن گروه نیز از لحاظ رویشی سازگار بودند. نتایج به‌دست آمده، با تحقیقات *مک‌نیش و همکاران* (MacNish *et al.* 1995) مطابقت داشت. مطالعات *سرزینی و همکاران* (Ceresini *et al.* 2002) نیز نتایج این تحقیق را تایید می‌کند. آنها با انجام آزمایش گروه‌های سازگار رویشی روی ۳۲ جدایه جمع‌آوری شده از سیب‌زمینی در مناطق جغرافیایی مختلف کارولینای شمالی، ۲۸ گروه سازگار رویشی را شناسایی کردند. جدایه‌هایی که از مزارع مختلف جمع‌آوری شده بودند از لحاظ رویشی با یکدیگر ناسازگار بودند و موارد سازگار تنها محدود به چهار جفت جدایه بود که دو به دو از یک مزرعه جداسازی شده بودند. در نهایت می‌توان به این نتیجه دست یافت که جدایه‌های *R. solani* AG-3 به‌دست آمده از سیب زمینی نسبت به جدایه‌های به‌دست آمده از سایر میزبان‌ها، تنوع ژنتیکی بالاتری نشان می‌دهند (Mahmoud et al. 2007). این موضوع توسط *بلالی و همکاران* (Balali *et al.* 1995, Balali *et al.* 2007) در بررسی این قارچ روی سیب‌زمینی مزارع استرالیا و نواحی مرکزی ایران به اثبات رسیده است.

در بررسی آزمایش بیماری‌زایی، از میان ۲۳ جدایه انتخابی متعلق به AG-3، ۲۱ جدایه روی جوانه‌های سیب‌زمینی ایجاد بیماری کردند. جدایه‌های AG-3 نسبت به جدایه AG-4 دارای پتانسیل بیماری‌زایی بالاتری بودند که با مطالعات قبلی مطابقت داشت (Rauf *et al.* 2007, Carling & Leiner 1986) و مشخص شد که اعضای AG-3 عامل غالب بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی در استان‌های همدان و کردستان می‌باشند. جداسازی تنها یک جدایه ریزوکتونیای AG-4 و توانایی پائین آن در ایجاد بیماری نشان می‌دهد که جدایه‌های AG-4 در دماهای بالاتری فعال شده و نقش چندانی در ایجاد بیماری روی سیب‌زمینی کاشت شده در این مناطق ندارند و ممکن است تنها روی غده‌های دختری تشکیل اسکلروت دهند. ارتباط قابل توجه جدایه‌های AG-4 در ارتباط با بیماری‌زایی روی محصول سیب‌زمینی در مناطق معتدل *چین و پرو* (Chang & Tu 1980) و هم‌چنین جداسازی جدایه‌های AG-4 از سیب‌زمینی آلوده به شانکر ریزوکتونیایی در مناطق مرکزی ایران توسط *بلالی و همکاران* (Balali *et al.* 1995) نیز می‌تواند دلیل دیگری بر این مدعا باشد. جدایه نامشخص هیچ‌گونه علائمی روی جوانه‌های سیب‌زمینی ایجاد ننمود.

از میان ۱۲ آغازگر تصادفی مورد استفاده در آزمایش RAPD روی ۱۰ جدایه متعلق به AG-3 که در قالب چهار گروه سازگار رویشی شامل E، F، T و EE قرار گرفته بودند، ۱۱ آغازگر بر اساس چندشکلی به‌دست آمده انتخاب شدند. بر اساس دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل نتایج الگوی باندهی، جدایه‌های مورد آزمایش با سطح تشابه ۴۲ درصد در چهار گروه قرار گرفتند که با نتایج حاصل از بررسی‌های ریخت‌شناسی مطابقت داشت (شکل ۲). هر چند که تمامی جدایه‌های متعلق به گروه EE، از یک مزرعه در شهرستان قروه جداسازی شده بودند، اما این گروه با سطح تشابه ۹۶ درصد به دو گروه تقسیم شد. بنابراین، عدم تشابه کامل جدایه‌های *R. solani* AG-3 متعلق به یک مزرعه، از یک طرف بیانگر وجود تنوع ژنتیکی بالا در میان جدایه‌های

Archive of SID

www.SID.ir

R. solani AG-3 و از طرف دیگر بیانگر توانایی نشانگر RAPD در تشخیص تنوع موجود در میان جدایه‌ها می‌باشد. بنابراین استفاده از نشانگر RAPD می‌تواند مشکل زمان، هزینه و عدم دقت را در تعیین گروه‌های سازگار رویشی با استفاد از محیط کشت در جدایه‌های *R. solani* AG-3 مرتفع سازد.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (89-87) متن انگلیسی مراجعه شود.

Archive of SID

www.SID.ir