

جداسازی و شناسایی گونه‌های *Rhizoctonia* از خاک‌های زراعی استان مازندران*

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *Rhizoctonia* spp. FROM CULTIVATED SOIL IN MAZANDARAN PROVINCE

سارا محسنی چمazکتی^۱، محمد علی تاجیک قنبری^۲ و مهرداد عباسی^۳

(تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۷/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۰/۶/۲۱)

چکیده

طی سال‌های ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷ از خاک مزارع و باغ‌های استان مازندران نمونه‌برداری به عمل آمد. نمونه‌های خاک از عمق ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متری تهیه گردید. سپس با روش طعمه‌گذاری با بذر چغندر قند و خلال دندان ضدغونی شده، ۱۲۱ جدایه رایزوکتونیا به دست آمد. شناسایی گونه و گروه آناستوموزی جدایه‌های جمع‌آوری شده از طریق بررسی خصوصیات مرفلوژیک و ویژگی‌های آنها در محیط کشت، آزمون آناستوموز و با استفاده از کلیدهای معتبر انجام گردید. ۱۰۱ جدایه چند هسته‌ای و ۲۰ جدایه دو هسته‌ای شناسایی شدند. از بین جدایه‌های چند هسته‌ای، ۷ جدایه به گروه آناستوموزی AG1، ۲۸ جدایه به AG2، ۵ جدایه به AG4، ۳ جدایه به AG5، ۱۳ جدایه به AG6، ۱۱ جدایه به AG9، ۳ جدایه به AG11 از *R. solani* و ۲۱ جدایه به WAG-Z (*R. zea*) واز بین جدایه‌های دو هسته‌ای، ۱۵ جدایه به گروه آناستوموزی AG-K و دو جدایه دیگر به گروه آناستوموزی نامشخص تحت عنوان ۱-BNR-1 و ۲-BNR-2 نسبت داده شدند.

واژه‌های کلیدی: *Rhizoctonia*، گروه آناستوموزی، قارچ‌های خاک، تنوع زیستی

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول ارائه شده به دانشکده علوم زراعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sara@mohseni.me

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

۲. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳. دانشیار بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، تهران

مقدمه

(Cubeta & Vilgalys 1997). رایزوکتونیاها براساس

تعداد متوسط هسته در هر یاخته و ریسه‌های جوان به دو گروه دو هسته‌ای و چند هسته‌ای تقسیم می‌شوند (Sneh et al 1991) در ایران هم رایزوکتونیای دو هسته‌ای و هم رایزوکتونیای چند هسته‌ای گزارش شده است (ارشاد ۲۰۰۹، عباسی و علی‌آبادی ۲۰۰۹). اولین بار رایزوکتونیای دو هسته‌ای *R. oryzae-sativae* با گروه آناستوموزی AG-Bb توسط رحیمیان (۱۹۸۶) از ایران گزارش شد. در سال ۱۹۸۹ نیز عامل بیماری لکه چشمی (AG-D) *Rhizoctonia cerealis* توسط نامبرده گزارش گردید (رحیمیان ۱۹۸۹).

از بین رایزوکتونیاها چند هسته‌ای دو گونه *R. solani* و *R. zaeae* در ایران گزارش شده‌اند. برای اولین بار در ایران با جداسازی گروه آناستوموزی AG4 از میوه‌های پوسیده گوجه‌فرنگی (Soil rot) گزارش شد (Rahimian 1986) و *R. zaeae* برای اولین بار از روی نیشکر در مزارع مازندران گزارش گردید (Aghajani et al. 2006). در این تحقیق با هدف شناسایی گونه‌های رایزوکتونیای موجود در خاک‌های زراعی استان مازندران، تعیین خصوصیات مرغولوژیک جدایه‌ها، ویژگی‌های آنها در محیط کشت و آزمون آناستوموز روی جدایه‌های جمع‌آوری شده، جداسازی این قارچ از خاک با روش طعمه‌گذاری انجام شد.

روش بررسی

نمونه‌برداری از خاک مزارع، باغات و مراتع استان مازندران طی اردیبهشت ۱۳۸۶ تا مرداد ۱۳۸۷ انجام شد. نمونه‌های خاک از عمق ۱۰-۱۵ سانتی‌متری تهیه شدند. برای جداسازی قارچ رایزوکتونیا از خاک، از روش طعمه‌گذاری

تحقیقات اخیر نشان داده است اعضای جنس *Rhizoctonia* از نظر بیولوژیکی و ژنتیکی گروهی متنوع هستند. گونه *Rhizoctonia solani* Kühn از لحاظ تاکsonومیکی مجموعه‌ای از گونه‌ها یا گونه‌ای تجمعی (Collective species) می‌باشد و شامل گروه‌ها یا سویه‌های غیروابسته به یکدیگر است که از لحاظ ژنتیکی جدا هستند. امروزه از گونه *R. solani* به عنوان یک گونه بزرگ کمپلکس یاد می‌شود (Cubeta & Vilgalis 1997). گونه‌های رایزوکتونیا به عنوان بیمارگر خاکزد و با تولید اسکلرلت به طور نامحدودی در خاک زنده می‌مانند. این قارچ‌ها قادرند به صدها نوع مختلف گیاهان حمله و طیف وسیعی از بیماری‌ها را ایجاد نمایند.

جدایه‌های این قارچ‌ها از روی بیش از ۱۵۰ گونه مختلف گیاهی جدا شده‌اند (Boysen et al. 1996). گونه‌های *Rhizoctonia* در مناطق مختلف ایران از روی بسیاری از گیاهان از جمله آفتابگردان، برنج، توت فرنگی، خربزه، خیار، گندم، نیشکر، ذرت، کلزا، مركبات، سیب‌زمینی، پنبه، بادام‌زمینی، لوبيا، نخود، ماش، عدس، لوبيا چشم بلبلی، چغندر قند، فلفل، یونجه، کنف، کنجد، سویا، گلرنگ، گوجه فرنگی، کیوی، باقلاء، توت، پسته، گلابی، زیتون، زردآلو و بسیاری از گیاهان زیستی و گیاهان خودرو گزارش شده است (ارشاد ۲۰۰۹ و عباسی و علی‌آبادی ۲۰۰۹). پدیده آناستوموز وجود تنوع و تفاوت درون گونه‌ای در *R. solani* را بیان می‌کند. آناستوموز ریسه‌های به عنوان یک ظهور سازگاری سوماتیک بین جدایه‌ها تعریف می‌شود و برای توضیح شباهت یا تفاوت ژنتیکی در رایزوکتونیا استفاده می‌گردد. گروه‌بندی آناستوموزی همچنان بزرگ‌ترین و تنها پیشرفت در شناخت تنوع ژنتیکی در داخل جنس رایزوکتونیاست

به کناره تستک اندازه‌گیری شد (Kim *et al.* 1994). برای تعیین گروه‌های آناستوموزی، از روش تو و همکاران (Sneh *et al.* 1991) و سنه و همکاران (Tu *et al.* 1969) که در واقع روش جفت کردن جدایه‌های استاندارد با جدایه‌های نامعلوم می‌باشد، استفاده شد. جهت مشخص نمودن بیماری‌زا بودن یا نبودن جدایه‌ها از روش اثبات بیماری‌زا بودی جوانه‌های تازه خارج شده از بذرهاست لوبیا، عدس، چغندرقند، خیار، کدو، گوجه‌فرنگی، هندوانه و جعفری استفاده شد. جوانه‌ها پس از تلقیح با جدایه‌های قارچی، به صورت روزانه بررسی شدند و شماره جدایه‌هایی که موجب بروز علائم بیماری گردیدند، یادداشت شد. سپس برای حصول اطمینان از اینکه عامل بیماری روی گیاه‌چه‌ها رایزوکتونیا است و همچنین برای رعایت اصول کخ، قطعه‌ای از بافت آلوده برداشته و به محیط کشت PDA منتقل شد. پس از بررسی‌های اولیه و اطلاعات حاصله، جدایه‌های به دست آمده براساس خصوصیات محیط کشتی، مرغولوژیک و بیماری‌زا بی و همچنین تست آناستوموز گروه‌بندی شدند. رایزوکتونیاهای دو هسته‌ای نیز براساس کلید شناسایی اوگوشی (Ogoshi 1985) و بررسی منابع دیگر شناسایی گردیدند.

نتایج و بحث

در این تحقیق از ۱۹۲ منطقه در استان مازندران نمونه‌برداری به عمل آمد که پس از جداسازی و خالص‌سازی قارچ رایزوکتونیا از خاک، در مجموع ۱۲۱ جدایه به دست آمد (جدول ۱). این جدایه‌ها شامل ۱۰۱ جدایه چند هسته‌ای (شامل *R. zae* و *R. solani*) و ۲۰ جدایه دو هسته‌ای بودند (جدول ۲). در این تحقیق جداسازی قارچ رایزوکتونیا با روش طعمه‌گذاری در خاک

توسط بذر چغندرقند و خلال دندان ضدغوفونی شده، استفاده گردید. پس از ۴۸ ساعت، بذرها و یا خلال دندان‌ها به محیط کشت آب-آگار ۱/۵ درصد منتقل شدند و بعد از گذشت حداقل ۲۴ ساعت، نوک هیف رایزوکتونیاهای رشد کرده بر روی محیط کشت مذکور در زیر بینوکولر توسط سوزن استریل برداشته و به تستک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA (عصاره ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۱۵ گرم دکستروز و ۱۵ گرم آگار در ۱ لیتر آب مقطر) منتقل شد. پس از رشد قارچ بر روی PDA در طی دو هفته، در دمای ۲۵-۲۹ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی، مشخصات جدایه‌ها از قبیل شکل ظاهری و رنگ پرگنه، تولید ریسه‌های هوایی و اسکلت‌ت (رنگ، شکل و الگوی پراکنش) بررسی گردید.

جهت تعیین تعداد هسته‌ها در جدایه‌های مورد بررسی از روش باندونی (Bandoni 1979) بهره گرفته شد. در این روش هسته ریسه‌های جدایه‌های مورد بررسی با استفاده از محلول سافرانین- او قلیائی (Safranin O) و یک قطره از KOH ۳ درصد رنگ‌آمیزی شد. در این روش هسته‌ها به رنگ نارنجی تا قرمز دیده می‌شود. جهت اندازه‌گیری قطر ریسه‌ها از روش کشت روی لام میکروسکوپی استفاده شد. بعد از گذشت ۲ تا ۳ روز که میسلیوم قارچ روی لام رشد کرد، با ریختن یک قطره لاکتوفنل، قطر ریسه‌ها توسط میکروسکوپ مدرج و با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر اندازه‌گیری شد. جهت تعیین دماهای اصلی رشد، کشت‌های جدایه‌های مورد بررسی روی محیط کشت PDA در دماهای ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۳۶، ۳۷ و ۴۰°C نگهداری شدند. پس از علامت‌گذاری حاشیه پرگنه‌ها بعد از ۱۲ یا ۲۴ ساعت به عنوان دوره خوگیری، میزان افزایش طولی پرگنه‌ها در دو جهت عمود بر هم، بعد از دوره‌های ۲۴ ساعته تا رسیدن اولین پرگنه

جدول ۱. جدایه‌های Rhizoctonia بررسی شده در این تحقیق، گروه‌های آناستوموزی و مناطق انتشار آنها در استان مازندران.

Tab. 1. Rhizoctonia isolates studied in this research, their anastomosis group and distribution in Mazandaran province

Location	Anastomosis group	Isolates number
Tirtash-Kiasar- Zyar kola- Berenjestanak- Amol- Ahmad chale pey- Nezam abad	AG1-IB	3-22-48-68-97-100-105
Tirtash- Darzi kola- Neka- Behshahr- Khazar abad- Panbeh chooleh- Kiasar- Rostam kola- Kutena- Arateh- Reykandeh- Ghadikola- Gharakheyl- Deh kola- Zyar kola- Fenderi-		1-5-7-12-15-21-28-31-33-36-38-
Khorma kola- Larim- Seyed aboo saleh- Sangtab- Rekabdar kola- Shirgah- Zirab- Seyed mahaleh- Myan rood- Babol- Babol- Bandpeye sharghi- Amol- Amol- Ahmad chale pey- Ahangar kola- Noshahr- Soleymān abad- Ramsar	AG2-2-IIIB	41-44-45-50-53-54-56-58-60-63- 66-75-79-84-85-88-95-98-101- 104-111-116-118
Gharakheyl- Rekabdar kola- Zarrin kola- Ramsar	AG2-2-IV	42-61-106-120
Khazar abad- Kutena- Gharakheyl- Bahnamir- Noshahr	AG-4	11-30-40-72-113
Kiasar- Shirgah- Chamestan	AG-5	20-64-103
Tirtash- Neka-Behshahr- Soorak- Arateh- Zyar kola- Larim- Veresk- Myan rood- Amol- Ahmad chale pey- Zarrin kola- Mohammad abad- Ramsar	AG-6	2-8-18-34-49-55-65-80-96-102- 108-115-119
Neka-Behshahr- Khazar abad- Sorkhkola- Rostam kola- Ghadikola- Zyar kola- Zirab- Myan rood- Bandpeye sharghi- Kojur- Ramsar	AG-9	6-10-14-29-39-46-67-78-89-110- 117
Berenjestanak- Amol- Noshahr	AG-11	70-94-112
Darzi kola- Firuzkandeh- Soorak- Juybar- Juybar- Juybar- Reykandeh- Zyar kola- Seyed aboo saleh- Berenjestanak- Bahnamir- Hatke posht- Babol- Babol- Bandpeye sharghi- Kya kola- Amir kola- Amol- Kojur- Mohammad abad- Ramsar	WAG-Z	4-13-17-24-26-27-35-47-57-69- 73-76-81-83-87-90-91-93-109- 114-121
Khazar abad- Panbeh chooleh- Dashte naz- Kiasar- Juybar- Kutena- Deh kola- Fenderi- Shirgah- Beshel- Hatke posht- Babol- Amir kola- Ahmad chale pey- Zarrin kola	AG-K	9-16-19-23-25-32-43-51-62-71- 77-82-92-99-107
Reykandeh- Khorma kola- Seyed mahaleh	<i>R. ramicola</i>	37-52-74
Sangtab	BNR-1	59
Babol	BNR-2	86

جدول ۲. چکیده‌ای از مشخصات گروه‌های آناستوموزی به دست آمده در این تحقیق

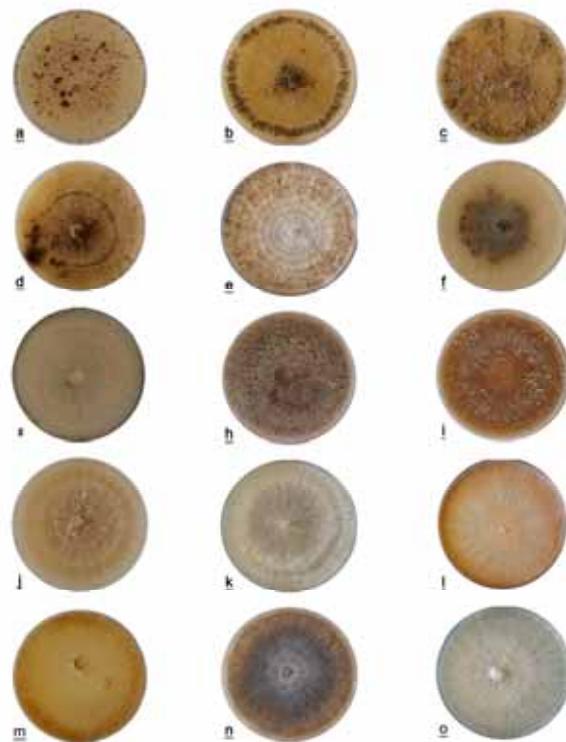
Tab. 2. Overview of the characters of anastomosis groups identified in this research

(Sneh *et al.* 1991; 1987) و سنه و همکاران (1985; 1987) بیماری خاصی را برای این گروه گزارش نکرده‌اند، در حالی که در این تحقیق AG-K شدت بیماری زایی بالایی روی جوانه لوبیا و سایر میزبان‌های بررسی شده نشان داد. گروه‌های 6 AG و 9 AG نیز توسط دیگر محققان از Carling *et al.* 1987 (Kuninaga *et al.* 1978, Homma *et al.* 1983 میان جدایه‌های چند هسته‌ای بیشترین تعداد هسته سلولی مربوط به AG-9 و کمترین تعداد هسته مطابق با نتایج محققان گذشته (Ogoshi 1996) مربوط به AG-4 (به طور متوسط ۴ عدد) بود.

اندازه قطر ریسه نیز مطابق با نتایج تحقیقات قبلی (Ogoshi 1972 a & b) بود، به طوری که قطر ریسه جدایه‌های *R. solani* به طور متوسط بین ۶ تا ۷ میکرومتر و قطر ریسه جدایه‌های *R. zaeae* نیز مطابق نتایج تحقیقات قبلی (Leiner 1991) به طور متوسط بین ۵ تا ۶ میکرومتر بود. همچنین قطر ریسه در جدایه‌های دو هسته‌ای کمتر از ۷ میکرومتر برآورد شد که با نتایج به دست آمده در سایر تحقیقات هماهنگی داشت. میانگین سرعت رشد به دست آمده برای گروه‌های مختلف نیز برای AG-2, AG-1, AG-2-IIIIB و AG-5 مطابق با نتایج کیم و همکاران (Kim *et al.* 1994) و اوگوشی (Ogoshi 1976) بود. دمای بهینه بقیه گروه‌ها نیز ۲۸ درجه سانتی‌گراد بود و در میان آنها زیر گروه AG-1-IB بیشترین سرعت رشد را در این دما داشت. دمای بهینه جدایه‌های گروه WAG-Z نیز ۳۲ درجه سانتی‌گراد برآورد شد که با نتایج محققان قبلی (Ryker & Gooch 1938) مطابقت داشت. در این تحقیق سطح بالایی از تنوع در جدایه‌های گونه‌های رایزوکتونیای جدا شده از خاک دیده شد. این تنوع حتی در یک گروه آناستوموزی نیز مشاهده گردید. احتمال

انجام گرفت که این روش برای اولین بار در ایران برای جداسازی رایزوکتونیا از خاک مورد استفاده قرار گرفته است. در حدود دو سوم خاک‌های جمع‌آوری شده از مناطق مختلف، رایزوکتونیا وجود داشت. براساس بررسی ۱۲۱ نمونه جدانشده از خاک در این تحقیق، جدایه غالب AG-2-IIIIB شناسایی گردید. این در حالی است که جدایه غالب بیماری‌زا در استان مازندران AG-1-IA می‌باشد که عامل سوختگی غلاف برنج (Sheath Blight) است. گفتنی است با وجود نمونه‌برداری‌های متعدد از مزارع برنج، هیچ یک از جدایه‌های رایزوکتونیای جدا شده از خاک مزارع برنج در این تحقیق AG-1-IA نبودند (به جدول ۱ مراجعه شود).

شكل ظاهری کلی در بین جدایه‌های زیر گروه AG-2-IIIIB متنوع بود و با توصیف کیم (Kim *et al.* 1994) مطابقت کامل نداشت (شکل ۱). این زیر گروه برای اولین بار توسط واتاناب و ماتسوسدا (Watanabe & Matsuda 1966) به عنوان تیپ مهاجم (Rush type) معرفی شده است. بعد از زیر گروه AG-2-IIIIB، گروه آناستوموزی WAG-Z بیشترین جمعیت را دارا بود. این گروه آناستوموزی برای اولین بار توسط آقاجانی (Aghajani 2000) از روی گندمیان و شبه گندمیان در مرکز مازندران گزارش شده است. این گروه در دنیا نیز برای اولین بار توسط وورهیس (Voorhees 1934) به عنوان عامل پوسیدگی سختینه‌ای ذرت گزارش گردید. مرفلولژی پرگنه این گروه با توصیف آقاجانی (۲۰۰۰) مطابقت داشت. از میان گروه‌های دوهسته‌ای، AG-K بیشترین جمعیت را دارا بود و بیشتر از مرکز مازندران جداسازی گردید. این جدایه‌ها از نظر شکل ظاهری شباهت زیادی با هم داشتند و با توصیف آقاجانی (Ogoshi 1976) نیز مطابق بودند. اوگوشی (Aghajani 2000)



شکل ۱. گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia solani* به دست آمده در این تحقیق روی PDA بعد از ۱۴ روز a- AG-1-IB, b, c, d- AG-2-2-IIIB, e- AG-2-2-IV, f- AG-4, g- AG-5, h,i- AG-6, j- AG-9, k- AG-11, l, m- WAG-Z, n- R. ramicola, o- AG-K.

Fig. 1. Cultural morphology of *Rhizoctonia solani* anastomosis group on PDA after 2 weeks: a- AG-1-IB, b, c, d- AG-2-2-IIIB, e- AG-2-2-IV, f- AG-4, g- AG-5, h,i- AG-6, j- AG-9, k- AG-11, l, m- WAG-Z, n- R. ramicola, o- AG-K.

تاکنون گزارش شده‌اند، متفاوت بودند و در نتیجه این دو جدایه ناشناخته باقی ماندند.

آن می‌رود که با بررسی نمونه‌های بیشتری از خاک منطقه مازندران تنوع بیشتری نیز مشاهده گردد. در میان جدایه‌های دو هسته‌ای نیز *R. ramicola* برای اولین بار در ایران گزارش شد و دو جدایه به نام‌های BNR1 و BNR2 یافت شد که از لحاظ شکل ظاهری، خصوصیات مرفو‌لوجیک و محیط کشتی با گروه‌های آناستوموزی که

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (149-150) متن انگلیسی مراجعه شود.