



بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* عامل پوسیدگی طوقه

و ریشه کدوئیان در ایران

سیدمهییار میرمجلسی*^۱، ناصر صفائی^۲، حسین اهری مصطفوی^۳، سیدباقر محمودی^۴

چکیده

یکی از بیماری‌های مهمی که در سراسر دنیا خسارت زیادی به کدوئیان وارد می‌سازد، مرگ گیاهچه و پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از *Rhizoctonia solani* می‌باشد. در بازدید از مزارع و گلخانه‌ها در طی فصول زراعی ۱۳۸۵-۱۳۸۴، نمونه‌های گیاهی مشکوک به آلودگی ریزوکتونیایی از مناطق مختلف استان‌های تهران، مازندران، خوزستان و اصفهان، از میزبان‌های خیار، کدو، هندوانه و خربزه جمع‌آوری، جداسازی و خالص‌سازی گردید. در این مطالعه ۵۹ جدایه *R. solani* از خاک، طوقه و ریشه گیاهان مذکور مورد بررسی قرار گرفت. قطر ریشه جدایه‌ها از ۴/۴۶ تا ۶/۸۶ میکرومتر متغیر بود و تمامی جدایه‌ها، چند هسته‌ای بودند. بررسی گروه آناستوموزی جدایه‌ها نشان داد که ۸۱ درصد جدایه‌ها متعلق به AG4 می‌باشند. سایر جدایه‌ها با هیچ یک از گروه‌های آناستوموزی استاندارد مورد مطالعه (AG2 و AG7) آناستوموز ندادند. نتایج حاصل از آزمون بیماری‌زایی نشان داد که نهایتاً از مجموع ۵۹ جدایه بدست آمده، ۹۷ درصد جدایه‌ها بیماری‌زا بودند، که این جدایه‌ها بر اساس درصد بیماری‌زایی در ۱۰ گروه مجزا قرار گرفتند. در این آزمایش دو جدایه کدو و خیار جدا شده از استان اصفهان، از آنجائیکه متعلق به گروه آناستوموزی چهار بودند و هیچ‌گونه علائمی را بر روی طوقه یا ریشه میزبان‌های خودشان ایجاد نکردند، این احتمال می‌رود که جزو جدایه‌های غیربیماری‌زا باشند. در این مطالعه گروه آناستوموزی چهار، برای اولین بار در ایران از روی میزبان کدو گزارش گردید.

واژه‌های کلیدی: پوسیدگی طوقه و ریشه، آزمون بیماری‌زایی، کدوئیان، AG4، *Rhizoctonia solani*

۱- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، کرج.

۲- گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس.

۳- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، کرج.

۴- موسسه تحقیقات چغندر قند کشور.

*نویسنده مسئول مقاله: m.mirmajlessi@gmail.com

مقدمه:

شبه جنس *Rhizoctonia*، یک گروه بسیار بزرگ و پیچیده از قارچ‌ها می‌باشد که توسط دکاندول، قارچ‌شناس بزرگ فرانسوی در سال ۱۸۱۵ معرفی گردید (Ogoshi 1996). گونه‌های بسیاری از این جنس با مشخصات بیماری‌زایی، ریخت‌شناسی و فیزیولوژیکی متفاوت، از گیاهان مختلف و خاک جدا شده‌اند (Carling and Sumner 1992). به دلیل اهمیت قارچ ریزوکتونیا به عنوان یک بیمارگر گیاهی، روش‌های دقیق و مناسبی برای شناسایی گروه‌های موجود در *Rhizoctonia* spp. توسعه یافته است که از آن جمله می‌توان به اطلاعات مربوط به رفتار آناستوموزی و زیست‌شناسی مولکولی این قارچ اشاره کرد (Vilgalys and Gonzalez 1990). به دلیل پیچیدگی تاکسونومیک و تنوع فنوتیپی بالا، جدایه‌های این قارچ از جنبه‌های مراحل جنسی و غیرجنسی و خصوصیات دیگر با یکدیگر فرق دارند. مطالعاتی تحت عناوین گروه بندی آناستوموزی، همولوژی توالی بازی DNA و خصوصیات بیوشیمیایی در مورد *R. solani* انجام گرفته است (Sneh et al. 1991). گروه بندی جدایه‌های *Rhizoctonia* spp. بر اساس واکنش‌های ریشه‌ای، معیاری بسیار مفید در مطالعه گونه‌های ریزوکتونیا برای بیماری‌شناسان گیاهی بوده که از سال ۱۹۶۵ آغاز شد (Anderson 1982). گروه‌های آناستوموزی به منزله گروه‌های ژنتیکی *R. solani* J.G. Kühn 1858 محسوب شده و هر گروه آناستوموزی قادر است میزبان‌های خاصی را آلوده کند (Zamani et al. 1989). وجود گروه‌های آناستوموزی مختلف در *R. solani* بیانگر جدایی ژنتیکی جمعیت‌های هر گروه است. بنابراین می‌توان گفت که گروه بندی آناستوموزی هنوز هم مهمترین پیشرفت در ارتباط با تنوع ژنتیکی در ریزوکتونیا می‌باشد (Cubeta and Vilgalys 1997). برای تشخیص گروه‌های آناستوموزی روش‌های متفاوتی وجود دارد که یکی از معمول‌ترین روش‌ها، پیوند ریشه می‌باشد (Sneh et al. 1991). در ایران کار تعیین گروه آناستوموزی با جداسازی AG4 از میوه پوسیده گوجه فرنگی توسط رحیمیان آغاز شد (Rahimian 1986). گروه آناستوموزی چهار از روی محصولاتی نظیر خیار، خربزه، لوبیا، گوجه فرنگی، یونجه، سویا، پنبه (Hamdollah-zadeh and Rahimian 1989)، اسپرس (Zamani et al. 1989)، پسته (Ashkan et al. 1995)، چغندر، گندم، هندوانه، نخود ایرانی، نارنج، اویار سلام، گل‌حنا، پنیرک، گل‌ناز، بادمجان، شاه‌پسند، کنار، ذرت و پیروش (Safaei et al. 1996) گزارش شده است.

در این بررسی، ضمن مطالعه بیماری‌پوسیدگی طوقه و ریشه کدوئیان، جدایه بیماری‌زا و گروه آناستوموزی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* بدست آمده از استان‌های اصفهان، تهران، مازندران و خوزستان بر اساس معیارهای تاکسونومیک مطالعه گردید. همچنین، درصد شیوع بیماری این جدایه‌ها و برهمکنش جدایه-میزبان نیز در استان‌های مذکور مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

نمونه برداری، جداسازی و خالص‌سازی عامل بیماری

نمونه برداری طی فصول زراعی ۱۳۸۶-۱۳۸۴، از مناطق مختلف استان‌های تهران، اصفهان، مازندران و خوزستان انجام گردید. نمونه‌های گیاهی مشکوک به آلودگی ریزوکتونیایی پس از جمع‌آوری، در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل گردیدند و بلافاصله مورد بررسی قرار گرفتند. پس از شستشوی بافت‌های آلوده گیاه در زیر جریان ملایم آب، ریشه‌های تیره رنگ و پوسیده و قطعاتی از حاشیه بین بافت آلوده و سالم ناحیه طوقه توسط اسکالپل استریل جدا گردید. پس از ضدعفونی سطحی توسط اتانول ۷۰ درصد، بافت‌های ضدعفونی شده قطعه‌قطعه شده و به تشک‌های پتری محتوی محیط کشت آب-آگار (WA) ۱/۵ درصد حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر کلرامفنیکل انتقال داده شدند. تشک‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شده و پس از ۱۲ تا ۴۸ ساعت، ریشه‌های شبیه ریزوکتونیا شناسایی و پس از خالص‌سازی به روش نوک ریشه (Sneh et al. 1991)، به محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) منتقل گردیدند.

تشخیص عامل بیماری

برای تعیین قطر ریشه، تعداد هسته و بررسی گروه آناستوموزی از روش رنگ آمیزی با آنیلین بلو استفاده گردید (Burpee et al. 1980). در رنگ آمیزی هسته، هر جدایه روی لام استریل کشت داده شد، سپس لام‌ها در داخل تشتک‌های استریل حاوی آب مقطر استریل روی میله شیشه‌ای قرار گرفتند و بعد از رشد قارچ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، با افزودن یک قطره لاکتوفنل حاوی پنج درصد آنیلین بلو، هسته‌ها رنگ آمیزی شدند. برای بررسی خصوصیات مورفولوژیک (ریشه و پرگنه)، تشتک‌های محیط کشت PDA حاوی کشت تازه قارچ در تاریکی و دمای اتاق به مدت سه هفته نگهداری شدند، که این تشتک‌ها در روزهای دوم، هفتم، چهاردهم و بیست و یکم بازدید شدند. همچنین قطر ریشه‌ها با اندازه‌گیری ۳۰ ریشه از هر جدایه، به کمک میکرومتر چشمی تعیین گردید.

تعیین گروه‌های آناستوموزی

برای تعیین گروه‌های آناستوموزی از دو روش لام پوشیده از آگار (Martin and Lucas 1984) و لام تمیز (Kroland and Stanghellini 1988) استفاده گردید. در روش لام پوشیده از آگار، پس از قرار گرفتن لام‌ها در داخل تشتک‌های پتری محتوی مقداری آب مقطر بر روی یک جفت میله شیشه‌ای، به وسیله پیپت یک لایه نازک آب-آگار ۱/۵ درصد بر روی لام‌ها ریخته شد. پس از انعقاد لایه نازک، قرص‌های چهار میلی متری از حاشیه فعال پرگنه‌های چهار روزه جدایه‌های ناشناخته و جدایه‌های استاندارد آزمون‌کننده از گروه‌های آناستوموزی دو، چهار و هفت که به مدت چهار روز بر روی محیط PDA رشد کرده بودند، بر روی لام‌ها به فاصله دو سانتی متری از هم قرار گرفتند. سپس تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شدند و بعد از این مدت، مرتباً به فاصله هر دو ساعت بررسی شدند. هنگامی که ریشه‌های متقابل به هم رسیدند، با قرار دادن یک قطره لاکتوفنل حاوی پنج درصد آنیلین بلو در محل تلاقی، ریشه‌ها رنگ آمیزی شدند، و پیوند بین ریشه‌های متقابل با بزرگنمایی 400X میکروسکوپ نوری، مورد بررسی قرار گرفت. در روش دوم که روش اسلاید تمییز نامیده می‌شود، ابتدا لام‌ها را با الکل ۹۶ درصد تمیز کرده و سپس در داخل تشتک‌های پتری محتوی مقداری آب مقطر بر روی یک جفت لوله شیشه‌ای قرار داده شدند. برای هر جدایه، یک قرص چهار میلی متری از حاشیه فعال پرگنه چهار روزه، از جدایه ناشناخته و جدایه استاندارد آزمون‌کننده از گروه‌های آناستوموزی مختلف به فاصله دو سانتی متری از هم روی لام قرار داده شدند. سپس تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۳۶ ساعت نگهداری شدند، که بعد از این مدت، مرتباً به فاصله هر دو ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. پس از رسیدن ریشه‌های دو قرص به همدیگر، لام را از تشتک خارج کرده و با قرار دادن یک قطره لاکتوفنل حاوی پنج درصد آنیلین بلو در محل تلاقی، ریشه‌ها رنگ آمیزی شدند و پیوند بین ریشه‌های متقابل با بزرگنمایی 400X میکروسکوپ نوری، مورد بررسی قرار گرفت. برای هر جدایه آزمایش‌ها سه بار و هر بار در سه تکرار انجام شد. با مشاهده ۱۵ تا ۲۰ محل پیوند نتیجه آزمون مثبت فرض شد.

اثبات بیماری زایی

آزمون بیماری زایی با استفاده از ۵۹ جدایه بدست آمده از مناطق مختلف کشور انجام پذیرفت. مایه زنی به روش اسنه و همکاران (۱۹۹۱)، با استفاده از دانه‌های گندم کلونیزه شده توسط جدایه‌ها انجام گردید. برای خاک گلدان‌ها از پرلیت، خاک و خاک برگ استریل استفاده شد که به ترتیب با نسبت ۱:۱:۱ مخلوط شدند. بعد از ضدعفونی سطحی بذر‌ها، داخل گلدان‌ها قرار داده شدند و روی آنها به ضخامت یک سانتی متر از همان خاک ریخته شد. بعد از اینکه گیاهچه‌ها به مرحله سه تا چهار برگچه‌ای رسیدند، خاک پای گیاهچه‌ها کنار زده شد، به طوریکه ریشه نمایان گردید. سپس سه عدد از گندم‌های کلونیزه شده توسط قارچ در پای هر گیاهچه قرار داده و خاک مجدداً روی آن برگردانده شد. همچنین برای مایه زنی گیاهان شاهد از سه عدد گندم استریل در پای هر گیاهچه استفاده گردید. لازم به ذکر است که در این مرحله از آزمایش گلخانه‌ای جدایه‌های بدست آمده (اعم از ریشه و طوقه گیاه آلوده یا خاک اطراف گیاه)، بر روی میزبانی که از آن جداسازی شده بود، مایه زنی شدند. تا ظهور علائم، گلدان‌ها در دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سلسیوس در گلخانه نگهداری شدند. برای بررسی شدت بیماری زایی جدایه‌ها از روش امتیازدهی (۵-۰) استفاده گردید، امتیازهای مذکور سپس به درصد تبدیل شد (Mathew and Gupta 1996). پس

از ظهور علائم، بافت‌های آلوده بر روی محیط کشت آب-آگار کشت داده شدند و عامل بیماری مجدداً جداسازی و شناسایی گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. این آزمایش دو بار تکرار شد.

همچنین مقایسه میانگین با استفاده از نرم افزار MSTATC و روش دانکن در سطح پنج درصد انجام گردید. برای گروه بندی جدایه‌های بدست آمده از مناطق و میزبان‌های مختلف از لحاظ بیماری‌زایی، از نرم افزار 32 MVSP، روش UPGMA با ضریب اقلیدسی استفاده شد.

بررسی برهمکنش جدایه-میزبان

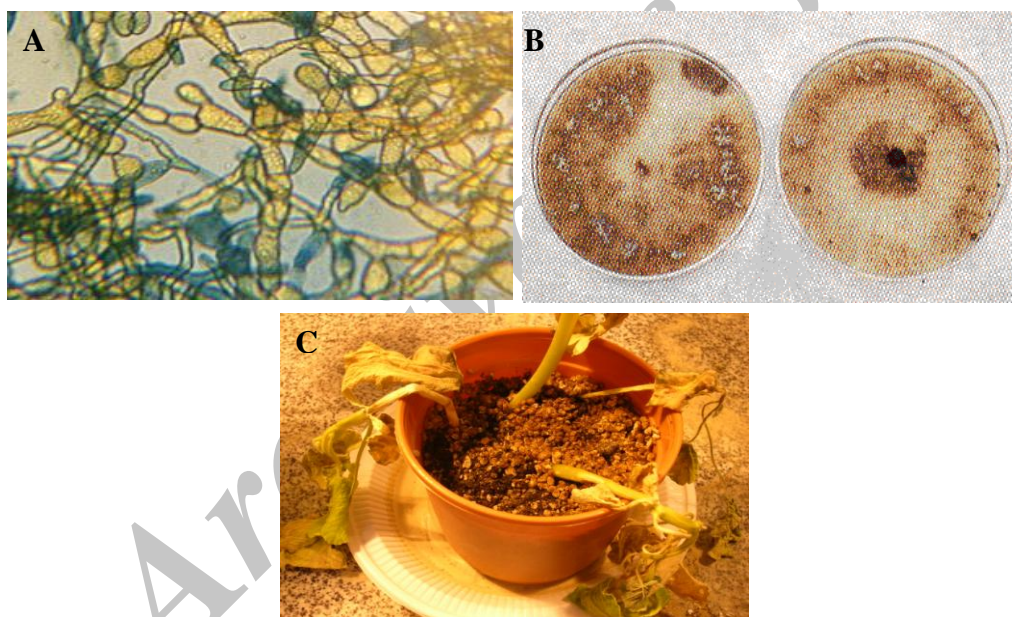
به منظور بررسی اثر بیماری‌زایی جدایه‌های بیماری‌زای *R. solani* AG4 بر روی سایر میزبان‌های کدوئیان، آزمایش برهمکنش جدایه-میزبان انجام گردید. به این منظور چهار جدایه منتخب *R. solani* AG4 مربوط به میزبان‌های خیار، خربزه، کدو و هندوانه، بر روی پنج میزبان خیار، خربزه، کدو، هندوانه و طالبی مایه زنی شدند. به نحوی که هر جدایه، بر روی هر پنج میزبان مایه زنی گردید. لازم به ذکر می‌باشد که نحوه آماده سازی مایه تلقیح، کشت گیاهان میزبان، مایه زنی و شرایط نگهداری در گلخانه مشابه آزمایشات گلخانه‌ای بوده است. در این آزمایش نیز از سه تکرار و یک شاهد استفاده گردید و درون هر گلدان چهار گیاه کاشته شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با آرایش فاکتوریل انجام گردید. این آزمایش دو بار تکرار شد.

نتایج

از ۵۹ نمونه مشکوک به آلودگی ریزوکتونیایی، در تمام موارد قارچی با مشخصات ریشه *Rhizoctonia* جداسازی گردید. مشخصات ریشه شامل انشعابات عمودی، فرو رفتگی در محل انشعاب و دیواره عرضی بشکه‌ای با توصیف اسنه و همکاران (۱۹۹۱) تطابق داشت. در هنگام جداسازی بیمارگر، ۳۳ جدایه از کشت ریشه و طوقه آلوده و ۲۶ جدایه از خاک اطراف ریشه آلوده به دست آمد، که در این میان ۵۱/۷ درصد از کل جدایه‌ها مربوط به کدو، ۳۴/۴ درصد مربوط به خیار، ۶/۸ درصد مربوط به خربزه و ۸/۶ درصد مربوط به هندوانه بودند (جدول ۱). نتایج حاصل از آزمون رنگ آمیزی ریشه‌ها، برای مشخص شدن تعداد هسته در سلول ریشه، نشان داد که تمامی جدایه‌ها متعلق به گروه ریزوکتونیا‌های چند هسته‌ای می‌باشند. همچنین، بعضی از جدایه‌ها تولید سلول‌های تسبیحی (ناشی از تورم سلول‌های ریشه) نمودند و از اجتماع این سلول‌ها اسکروت تشکیل شد. اسکروت‌ها به رنگ قهوه‌ای نسبتاً تیره بودند که در زیر در تشتک یا سطح محیط کشت تشکیل شدند (شکل ۱-A, B). همچنین قطر متوسط ریشه جدایه‌ها از ۴/۴۶ تا ۶/۸۶ میکرومتر متغیر بود (جدول ۱). بر این اساس تمام جدایه‌های به دست آمده متعلق به *R. solani* بود. نتایج حاصل از آزمون تعیین گروه آناستوموزی در روش کشت متقابل جدایه‌های نامعلوم با جدایه‌های استاندارد نشان داد که ۸۱ درصد جدایه‌ها به گروه آناستوموزی چهار تعلق دارند. جدایه‌هایی که با AG4 آناستوموز ندادند، با سایر گروه‌های آناستوموزی مورد بررسی در این مطالعه نیز پیوند ریشه برقرار نکردند. بدین ترتیب گروه آناستوموزی چهار به عنوان گروه آناستوموزی *R. solani* عامل پوسیدگی طوقه و ریشه کدوئیان در استان‌های ذکر شده معرفی می‌گردد. پرگنه *R. solani* AG4 در سطح محیط کشت نمدی بوده و ریشه‌ها هم به صورت متراکم و هم به صورت هوایی رشد نمودند. جدایه‌ها طی سه روز تمام تشتک نه سانتی متری را پر نمودند. رنگ پرگنه ابتدا سفید و بعد به رنگ کرم، قهوه‌ای روشن تا تیره تغییر کرد.

در بررسی بیماری‌زایی، ۱۴ روز بعد از مایه زنی علائم بیماری ظاهر و مورد بررسی قرار گرفت. علائم بیماری به صورت پوسیدگی ریشه‌ها، مخصوصاً ریشه‌های فرعی و تارهای کشنده و ایجاد شانکرهایی در ناحیه طوقه بود. قسمت‌های پوسیده، قهوه‌ای تیره تا سیاه رنگ بودند و به راحتی از ریشه اصلی جدا می‌شدند، علائم در قسمت‌های هوایی شامل زردی و پژمردگی برگ‌ها، تولید میوه‌های نارس، ضعف عمومی بوته‌ها دیده شدند و در مراحل پیشرفته به مرگ گیاهچه می‌انجامد (شکل ۱-C). علائم این بیماری زمانی که نمونه برداری در مزرعه انجام می‌شد به وضوح قابل رویت بود. یادداشت برداری هر دو روز و تا دو هفته پس از شروع علائم ادامه داشت. زمانی که ریشه‌ها از خاک بیرون آمدند به شدت پوسیده و تیره رنگ

بودند. در ریشه و طوقه گیاهان شاهد هیچ گونه علائمی دیده نشد. از ریشه و طوقه گیاهان مایه زنی شده، پس از کشت مجدد قارچ *R. solani* جداسازی شد، که نهایتاً ۹۷ درصد جدایه‌ها بیماری‌زا بودند. طول شانکر ایجاد شده نیز همانطور که در جدول ۱ ذکر شد، در جدایه‌های مختلف بسیار متغیر است. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌های مربوط به آزمون بیماری‌زایی ۵۹ جدایه مورد بررسی نشان داد که این جدایه‌ها در ۱۰ گروه آماری مجزا قرار می‌گیرند (جدول ۱). در این آزمایش دو جدایه کدو (RS11) و خیار (RS26) جدا شده از استان اصفهان، متعلق به گروه آناستوموزی چهار بودند و هیچ گونه علائمی را بر روی طوقه یا ریشه میزبان‌های خودشان ایجاد نکردند و جزو جدایه‌های غیربیماری‌زا بر روی میزبان‌های خود می‌باشند. نتایج حاصل از برهمکنش جدایه-میزبان چهار جدایه *R. solani* جدا شده از خیار (RS24)، خربزه (RS51)، کدو (RS34) و هندوانه (RS56) بروی پنج میزبان خیار، خربزه، کدو، هندوانه و طالبی با آرایش فاکتوریل نشان داد که جدایه بدست آمده از کدو دارای بالاترین درصد بیماری‌زایی (۹۷/۲ درصد) می‌باشد. نتایج به دست آمده نشان داد، که این جدایه‌ها شدت‌های بیماری‌زایی متفاوتی بر روی میزبان‌های متفاوت ایجاد می‌کنند. همچنین اثر متقابل جدایه-میزبان در سطح پنج درصد معنی‌دار بود که نشان‌دهنده آن است که میزبان‌های مختلف دارای حساسیت‌های متفاوتی نسبت به بیمارگر می‌باشند. با توجه به سطوح آماری به دست آمده، جدایه کدو دارای بالاترین میانگین درصد بیماری‌زایی (۹۷/۲ درصد) و میزبان هندوانه دارای بالاترین درصد حساسیت (۸۰/۱۷ درصد) نسبت به جدایه‌ها می‌باشد (جدول ۲).



شکل ۱- سلول‌های تسبیحی (A)، سختینه‌ها (B) و علائم بیماری *Rhizoctonia solani* AG4 روی کدو (C).

جدول ۱- مشخصات جدایه های *R. solani* جمع آوری شده از استان های مختلف ایران.

AG	قطر هیف (μm)	طول زخم (cm)	درصد بیماری زایی	علائم بیماری	محل جمع آوری	کد جدایه
?	6.270	0.6	16.6 DEF *	RR	Cucumber-Tehran	RS1
4	6.20	0.8	16.6 DEF	RR	Cucumber- Tehran	RS2
4	5.10	1	16.6 DEF	RR	Pumpkin- Tehran	RS3
4	5.80	1.1	16.6 DEF	RR	Pumpkin-Tehran	RS4
4	6.20	0.3	16.6 DEF	RR	Pumpkin-Tehran	RS5
4	6.05	1.6	25 CDEF	RRC	Pumpkin-Tehran	RS6
4	6.44	1.4	25 CDEF	RRC	Pumpkin-Tehran	RS7
?	6.24	1	41.6 ABCDE	RRC	Pumpkin-Tehran	RS8
4	6.02	1.3	25 DEF	RRC	Pumpkin-Tehran	RS9
4	6.60	1.1	16.6 DEF	RR	Pumpkin-Isfahan	RS10
4	5.94	0	0 F	-	Pumpkin-Isfahan	RS11
4	6.64	1	16.6 DEF	RR	Pumpkin-Isfahan	RS12
4	5.85	0.5	8.3 EF	RR	Pumpkin-Isfahan	RS13
4	4.68	1.5	41.6 ABCD	RRC	Pumpkin-Isfahan	RS14
4	6.62	0.4	58.3 ABC	RRC	Cucumber-Isfahan	RS15
4	5.14	1.3	16.6 DEF	RR	Pumpkin(soil)-Isfahan	RS16
4	5.87	1.1	16.6 DEF	RR	Pumpkin(soil)-Isfahan	RS17
4	6.44	1.9	25 CDEF	RRC	cucumber(soil)-Isfahan	RS18
?	6.27	2.2	41.6 ABCD	RRC	Pumpkin(soil)-Isfahan	RS19
4	6.31	0.7	16.6 DEF	RR	Pumpkin(soil)-Isfahan	RS20
4	6.22	0.7	16.6 DEF	RR	Pumpkin(soil)-Isfahan	RS21
4	5.98	0.5	25 BCDEF	RRC	Pumpkin(soil)-Isfahan	RS22
4	6.20	0.5	33.3 BCDEF	RRD	Pumpkin-Isfahan	RS23
4	4.46	1.4	66.6 AB	RRD	Cucumber-Isfahan	RS24
?	6.27	0.8	25 CDEF	RRC	Cucumber-Isfahan	RS25
4	6.55	0	0 F	-	Cucumber-Isfahan	RS26
4	6.07	0.7	16.6 DEF	RR	Cucumber-Isfahan	RS27
4	5.54	0.5	25 DEF	RRC	Cucumber-Isfahan	RS28
?	6.24	0.7	8.3 EF	RR	Cucumber-Isfahan	RS29
4	6.22	2.9	75 AB	RRD	Pumpkin-Isfahan	RS30
4	6.07	0.9	41.6 ABCD	RRD	Pumpkin-Isfahan	RS31
4	4.44	0.7	58 ABC	RRD	Pumpkin-Isfahan	RS32
4	6.53	1.1	41.6 ABCD	RRC	Pumpkin-Khouzestan	RS33
4	6.64	2	75 AB	RRD	Pumpkin-Khouzestan	RS34
4	6.73	1.6	66.6 AB	RRD	Pumpkin-Khouzestan	RS35
?	6.27	1	8.3 EF	RR	Pumpkin-Khouzestan	RS36
4	6.40	1.1	8.3 EF	RR	Pumpkin-Khouzestan	RS37
?	6.73	1.2	8.3 EF	RR	Pumpkin-Khouzestan	RS38
4	6.46	1.3	66.6 AB	RRD	Pumpkin-Khouzestan	RS39
4	6.35	1	33.3 BCDEF	RRD	Pumpkin-Khouzestan	RS40
4	6.24	1.2	16.6 DEF	RRC	Cucumber(soil)-Khouzestan	RS41
4	6.33	1.3	16.6 DEF	RRC	Cucumber(soil)-Khouzestan	RS42
4	6.27	0.9	16.6 DEF	RRC	Cucumber(soil)-Khouzestan	RS43
4	6.38	0.7	16.6 DEF	RRC	Cucumber(soil)-Khouzestan	RS44
?	6.27	1.1	16.6 DEF	RRC	Cucumber(soil)-Khouzestan	RS45
4	6.46	2.9	83.3 A	RRD	Cucumber(soil)-Khouzestan	RS46
4	6.46	1.3	16.6 DEF	RRC	Cucumber(soil)-Khouzestan	RS47
?	6.27	3.1	83.3 A	RRD	Cucumber(soil)-Khouzestan	RS48
4	6.38	2.2	75 AB	RRD	Cucumber(soil)-Khouzestan	RS49
4	6.20	2.1	75 AB	RRD	Cucumber(soil)-Khouzestan	RS50
4	6.46	2.4	83.3 A	RRD	Melon(soil)-Mazandaran	RS51
4	6.51	2	83.3 A	RRD	Melon(soil)-Mazandaran	RS52
4	6.40	2.9	75 AB	RRD	Melon(soil)-Mazandaran	RS53
?	6.60	1.5	25 CDEF	RRC	Melon(soil)-Mazandaran	RS54
?	6.60	1.5	16.6 DEF	RRC	Watermelon(soil)-Mazandaran	RS55
4	6.86	2	83.3 A	RRD	Watermelon(soil)-Mazandaran	RS56
4	6.51	2	83.3 A	RRD	Watermelon(soil)-Mazandaran	RS57
4	6.44	2.5	83.3 A	RRD	Watermelon(soil)-Mazandaran	RS58
4	6.73	1	16.6 DEF	RRC	Watermelon(soil)-Mazandaran	RS59

RR: root rot; RRC: root and crown rot; RRD: root rot and damping off

*: میانگین‌های دارای حرف غیر مشترک، در سطح ۵٪ اختلاف معنی داری دارند.

جدول ۲- شدت بیماری حاصل از برهمکنش جدایه-میزبان، میان پنج میزبان از کدوئیان و چهار جدایه *R. solani* AG4 بدست آمده از میزبان های مختلف.

Host Isolate	melon	cucumber	Honeydew	pumpkin	watermelon	average	Statistical level
RS51	7.7	64.4	0.4	66.6	40.2	35.86	A
RS24	0.4	۵۰	71.6	۵۰	82.2	50.98	B
RS56	98.8	81.5	60.2	66.6	98.8	81.18	C
RS34	90.8	98.8	98.8	98.8	98.8	97.2	D
average	49.42	73.67	57.75	70.5	80.17		
Statistical level	A	B	C	D	E		

- اعداد جدول به درصد بیان شده‌اند.

بحث

نتایج این تحقیق بیانگر وجود تنوع بالائی در بیماری زایی جدایه های *R. solani* متعلق به گروه آناستوموزی چهار، جدا شده از کدو، خیار، خربزه و هندوانه می باشد. اهمیت تنوع در بیماری زایی بیمارگرها از زوایای مختلف، مورد توجه بیماری شناسان گیاهی می باشد. بیماری شناسان به دنبال عوامل موثر بر تغییر در بیماری زایی بیمارگرها، فراوانی ژن های بیماری زا و مطالعه اپیدمیولوژی بیمارگر های حامل ژن های بیماری زا هستند (Carling et al. 2002).

قطر متوسط ریشه در اعضای گروه AG4 مطابق با نتایج اوگوشی (Ogoshi 1987)، باریکترین ریشه را (کمتر از هفت میکرومتر) در بین گروه های *R. solani* دارد، که در این تحقیق بین ۴/۴۶ تا ۶/۸۶ میکرومتر اندازه گیری شد. از بین جدایه های *R. solani* به دست آمده، ۱۱ جدایه که حدود ۱۸ درصد از کل جدایه ها را شامل می شدند، با هیچ یک از گروه های استاندارد دو، چهار و هفت آناستوموز ندادند. از تعداد مذکور، نه جدایه مربوط به میزبان های خیار و کدو جدا شده از استان های تهران، اصفهان و خوزستان و دو جدایه دیگر مربوط به میزبان های هندوانه و خربزه جدا شده از استان مازندران بودند. به دلیل عدم دسترسی به سایر گروه های آناستوموزی استاندارد، این تعداد جدایه تعیین آناستوموز نشدند. همچنین از آن جایی که بعضی از جدایه ها با جدایه های استاندارد هیچ یک از گروه های آناستوموزی، آناستوموز نمی دهند، ممکن است این جدایه ها جزو گروه های غیر آناستوموز کننده با خود باشند (Parmeter et al. 1969).

بررسی قدرت بیماری زایی جدایه ها نشان داد که دامنه تغییرات بیماری زایی در جدایه های AG4 و جدایه هایی با گروه آناستوموزی نامشخص بسیار بالاست به طوری که برخی از جدایه های AG4 و برخی از جدایه هایی با گروه آناستوموزی نامشخص دارای حداکثر شدت بیماری بودند، حال آنکه جدایه هایی با گروه آناستوموزی نامشخص و یا AG4، هیچ نوع علائم بیماری را پس از چهار هفته مایه زنی نشان ندادند. این نتایج نشان دهنده وجود تنوع بالا در بیماری زایی جدایه های مختلف از یک گروه آناستوموزی است (Carling et al. 2002). از طرفی برخلاف نظر ویندلز و نابن (Windels and Nabben 1989) مبنی بر اینکه گروه آناستوموزی چهار بیشتر ایجاد مرگ گیاهچه می کند و توان ایجاد پوسیدگی ریشه را ندارد، بعضی از جدایه های این گروه ایجاد پوسیدگی ریشه با درصد بیماری زایی بالا (۹۱/۶ درصد) و همچنین شانکر هایی با طول های متفاوت نمودند. نتایج حاصل نشان داد که ارتباط معنی داری بین شدت بیماری زایی، نوع میزبان و منطقه جغرافیایی وجود ندارد. در این مطالعه گروه آناستوموزی چهار، برای اولین بار در ایران از روی میزبان کدو گزارش گردید.

سپاسگزاری

بدین وسیله از جناب آقای دکتر واهه میناسیان استاد گروه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر نقطه نظرات ارزنده ایشان در انجام هرچه بهتر این مطالعه سپاسگزاری می شود.

References:

1. Ad Anderson N A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Annual Review of Phytopathology 20: 329-374.
2. Ashkan M, Abusaidi D and Hamdollah-zadeh A. 1995. Pre and post emergence damping-off of pistachio caused by *Rhizoctonia solani*. Paper presented at: 12th Plant Protection Congress; 2-7 September; Karaj, Iran.
3. Burpee L L, Sanders P L, Cole H Jr and Sherwood R T. 1980. Anastomosis groups among isolates of *Ceratobasidium cornigerum* and related fungi. Mycologia 72: 689-701.
4. Carling D E and Sumner D R. 1992. *Rhizoctonia* spp. pp. 157-165, In LL Singleton, JD Mihail and CM Rush (eds). Methods for Research on Soilborn Phytopathogenic Fungi. USA: American Phytopathological Society.
5. Carling D E, Kuninaga S and Brainard K A. 2002. Hyphal anastomosis reaction, DNA-internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of *Rhizoctonia solani* anastomosis group-2 (AG-2) and AG-BI. Phytopathology 92: 43-50.
6. Cubeta M A and Vilgalys R. 1997. Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. Phtopathology 87: 480-484.
7. Hamdollah-zadeh A and Rahimian H. 1989. Anastomosis group 4 is the major cause of *Rhizoctonia solani* of cotton and soybean in Gorgan. Paper presented at: 9th Plant Protection Congress; 9-14 September; Mashhad, Iran.
8. Kroland 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.
9. Martin S B. and Lucas L.T. 1984. Characterization and pathogenicity of *Rhizoctonia* spp. and binucleate *Rhizoctonia* like fungi from turfgrasses in North Carolina. Phytopathology 74: 170-175.
10. Mathew K A and Gupta S.K. 1996. Studies on web blight of French bean caused by *Rhizoctonia solani* and its management. Indian Journal of Mycological and Plant Pathology 26: 171-177.
11. Ogoshi A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Annual Review of Phytopathology 25: 125-143.
12. Ogoshi A. 1996. The genus *Rhizoctonia*. pp. 1-9. In B Sneh, S Jabaji-Hare, S Neate and G Dijist (eds). *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publisher.
13. Parmeter J R Jr, Sherwood R T and Platt W D. 1969. Anastomosis grouping among isolates of *Thanatephorus cucumeris*. Phytopathology 59: 1270-1278.
14. Rahimian H. 1986. *Rhizoctonia* soil rot of tomato. Paper presented at: 8th Plant Protection Congress; 30 August-4 September; Isfahan, Iran.
15. Safaei N, Minassian V, Rahimian H and Banihashemi Z. 1996. Isolation identification and pathogenicity of *Rhizoctonia* fungi isolated from several. Host plants in the Khuzestan province. Iranian Journal of Plant Pathology 35: 1-8.
16. Sneh B, Burpee L and Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* Species. St Paul, USA: APS Press. 133p.
17. Vilgalys R and Gonzalez D. 1990. Ribosomal DNA restriction fragment length polymorphisms in *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 78: 698-702.

18. Windels S C E and Nabben D J. 1989. Characterization and pathogenicity of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* isolated from *Beta vulgaris*. *Phytopathology* 79: 83-88.
19. Zamani M R, Balali Gh, Danesh D and Rahimian H. 1989. Anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* isolated from several hosts in Isfahan. Paper presented at: 9th Plant Protection Congress; 9-14 September; Mashhad, Iran.

Archive of SID