شناسایی گروههای آناستوموزی قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری شانکر ساقه سیب زمینی در استان خراسان

منصور صلاتی، ماهرخ فلاحتی رستگار و بهروز جعفرپور
به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد دانشکده کشاورزی
دانشگاه فردوسی مشهد

تاریخ پذیرش مقاله ۷۷/۱۱/۲۸

خلاصه

طی سال زراعی ۱۳۷۶ از مجموع ۲۱ مزرعه سیب‌زمینی انتخاب شده در سطح استان خراسان، تعداد ۲۵۶ نمونه گیاه آلوده جمع آوری گردید و پس از کشت قسمتهایی از ساقه، استولن، ریشه و غده، کلاً ۱۰۵ جدایه که مشخصات مرفولوژیکی آنها مشابه قارچ *Rhizoctonia* بود، شناسایی گردید، که پس از رنگ آمیزی هسته‌ها و بررسی واکنش آناستوموز ریسه‌ها، به روش آگار فیلم[1] با جدایه‌های استاندارد (AG (1 - 11, BI بجز AG8 و AG10 نتایج به دست آمده بدین شرح می‌باشند: ۷۱/۵٪ جدایه‌ها متعلق به گروه آناستوموزی AG3 با بیشترین فراوانی و شدت بیماریزایی، به عنوان مهمترین گروه ایجاد شانکر طوقه و ریشه در گیاه سیب‌زمینی شناسایی گردید و پس از آن گروه AG4 با ۱۰/۵٪ و AG 2-1 با ۴/۷٪ فراوانی نسبی در بین ریزوکتونیاهای چند هسته‌ای بیشترین فراوانی را دارا بودند، همچنین ۱۲/۳٪ جدایه‌های بدست آمده در هر یک از سلولهای ریسهٔ خود تنها دارای ۲ هسته بودند. تلاش برای تولید مرحله تلوموروف جدایه‌های مختلف علیرغم استفاده از روشهای گوناگون موفقیت آمیز نبود. الکتروفورز پروتئین‌های محلول جدایه‌های شناسایی شده به روش SDS - PAGE انجام گرفت و الگوی پروتئینی گروهها با یکدیگر تفاوت بارزی را نشان دادند. جدایه‌های متعلق به یک گروه آناستوموزی دارای الگوی یکسانی بوده و تنها در بین جدایه‌های متعلق به گروه آناستوموزی AG4 همسانی لازم مشاهده نگردید.

واژه‌های کلیدی: گروههای آناستوموزی و شانکر ساقه.

مقدمه

شانکر ساقه سیب‌زمینی از بیماریهای مهم سیب زمینی به حساب می‌آید که انتشار جهانی داشته و در بسیاری از مزارع مشاهده می‌شود (۱۲). غده‌های سیب زمینی آلوده به اسکلروت، دارای محصول نهایی کمتر و کوچکتری می‌باشند و این بیماری علاوه بر خسارات کمّی، از نظر کیفی نیز محصول را تحت تأثیر قرار داده و ارزش بازار پسندی غده‌ها را کاهش می‌دهد (۳). عامل این بیماری *Rhizoctonia solani Kuehn (Thanatephorus cucumeris (Frank) Donk)* است. این قارچ از نظر دامنه میزبانی، خصوصیات رویشی و قدرت بیماریزایی دارای تنوع زیادی است (۱۴). *R. solani* به صورت مجموعه‌ای از گروههای درون‌گونه‌ای می‌باشد که بوسیله واکنش آناستوموز ریسه‌ای بین جدایه‌ها به گروههای همگن‌تری به نام «پیوند ریسه‌ای» یا Anastomosis Groups (AGs) تقسیم می‌شوند. هر گروه

1 - Agar film

آناستوموزی قابلیت آناستوموز با هم‌گروه خود را دارا می‌باشد. تا امروز ۱۲ گروه آناستوموزی برای *R. solani* از میزبانهای مختلف و مناطق جغرافیایی متفاوت شناسایی شده است که بقرار زیر می‌باشند:
AGBI- AG11- AG10- AG9- AG8- AG7- AG6- AG5- AG4- AG3- AG2- AG1 (۱۳)

درون AGs، زیرگروههایی (ISGs)[1] که از نظر فراوانی آناستوموز - دامنه میزبانی - نیاز غذایی - خصوصیات مولکولی و بیوشیمیایی با یکدیگر تفاوت دارند، شناسایی شده است (۱۴).

بر اساس تحقیقات انجام شده توسط محققین مختلف گروههای آناستوموزی زیادی از گیاه سیب‌زمینی گزارش شده است، از جمله:
AG1 -AG2-1 (۱۴ - ۴ - ۳) AG2 - 2 - AG3 - AG4 - AG5 - AG8 - AG9

از مجموعه گروههای ذکر شدهٔ بالا معمولاً تعداد خاصی که بستگی به ناحیه جغرافیایی و شرایط آب و هوایی منطقه و نوع گیاهانی که در تناوب زراعی قرار می‌گیرند در مزرعه ظهور می‌کنند. با توجه به تحقیقات انجام شده، مهمترین گروه آناستوموزی *R. solani* که در مزارع سیب‌زمینی دیده می‌شود، AG3 می‌باشد (۱۶ - ۴ - ۳). امتی و حمدالله‌زاده گروههای AG3 و AG1 و AG5 را از استان سمنان گزارش کرده‌اند و AG3 را مهمترین گروه دانستند (۱).

علاوه بر گروههای چند هسته‌ای ریزوکتونیا، جدایه‌هایی از شبه ریزوکتونیا (ریزوکتونیاهای دو هسته‌ای)[2] نیز از مزارع و اندامهای زیرزمینی این گیاه بدست آمده، که برخی بیماریزا و برخی غیر بیماریزا می‌باشند (۳).

غالباً اسکلروتهای موجود در سطوح غده متعلق به گروه AG3 بوده ولی گروه AG5 نیز قادر به تولید اسکلروت بر روی غده می‌باشند (۳).

با توجه به دامنه میزبانی هر یک از گروههای آناستوموزی در گیاهان زراعی، لازم دانسته شد که به منظور کاهش خسارت حاصله توسط این قارچ در گیاه سیب زمینی، ابتدا گروههای آناستوموزی ایجاد کننده خسارت در گیاه، شناسایی گردند تا در مراحل بعدی طی یک سلسله تحقیقات تکمیلی، تناوب زراعی مناسب جهت کنترل این قارچ توصیه گردد.

مواد و روشها

۱ - جداسازی و خالص‌سازی عامل بیماری: پس از جمع آوری بوته‌های آلوده از ۲۱ مزرعه انتخاب شده در ۹ شهرستان استان خراسان و حمل نمونه‌ها به آزمایشگاه، قطعاتی از ریشه و طوقه گیاهان که حاوی شانکر بودند، به صورت مجزا در شیشه‌های ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میلی‌لیتر آب، شستشو داده شدند، این عمل ۱۰ - ۷ تکرار شد تا کاملا" خاک از ریشه‌ها جدا شود. در مرحله آخر با آب مقطر، ریشه‌ها را شستشو داده و قطعاتی از استولن و طوقه که دارای شانکرهای قهوه‌ای تیره بودند. در ابعاد ۵×۳ میلی‌متر و از ریشه قطعاتی به طول یک سانتی‌متر از ناحیه آلوده قطع کرده و به طور مجزا در محلول هیپوکلریت سدیم ۱٪ به مدت دو دقیقه برای طوقه و به مدت یک دقیقه برای ریشه‌ها، ضدعفونی شدند، سپس این قطعات را دو مرحله با آب مقطر سترون شستشو داده و بعد بین دو کاغذ صافی سترون آبگیری نموده و در نهایت قطعات مربوطه را در پتری حاوی سیب زمینی - دکستروز - آگار + کلرامفنیکل[3] (۵۰ ppm) کشت داده شدند. پس از نگهداری در دمای ۲۵±۲° C به مدت ۴۸ تا ۷۲ ساعت، از حاشیه کلنی یک قطعه به قطر ۵ میلیمتر برداشته و به محیط آب آگار ۲٪ منتقل گردید. بعد از گذشت یک روز در دمای ۲۵±۲° C و تاریکی. از حاشیه پرگنه، اقدام به تهیه نوک ریسه گردید. نوک ریسه تهیه شده را به لوله آزمایش PDA با سطح شیب‌دار منتقل گردید پس از اینکه قارچ در لوله‌ها رشد کرد، در دمای ۴C نگهداری گردیدند.

۲ - شناسایی عامل بیماری: جدایه‌های طوقه، استولن، ریشه و غده که از نظر مرفولوژی به جنس ریزوکتونیا تعلق داشتند، پس از تهیه نوک ریسه، ابتدا با کمک معرف رنگی سافرانین‌اُ[4] بر اساس روش باندونی[5] (۱۹۷۹) رنگ‌آمیزی شدند (۱۴). تعداد هسته در سلولهای انتهایی ریسه مشخص گردید. به منظور شناسایی گروه آناستوموزی این جدایه‌ها، به طور همزمان جدایه‌های نامعلوم ریزوکتونیای چند هسته‌ای را به همراه گروهها استاندارد تهیه شده از

1 - Intra specific groups
2 - Binucleate rhizoctonia
3 - Chloramphenychol
4 - Safranin O
5 - Bandoni 1979

دانشکده کشاورزی کرج که شامل (AG (1 - 11, BI بجز AG10, AG8 به محیط PDA منتقل شدند پس از گذشت دو روز در دمای C° ۲۵ از حاشیه پرگنه در حال رشد جدایه‌های استاندارد، یک قرص[1] قطر ۵ میلی‌متر را در روی لام حاوی لایه نازکی از آب آگار، ۱/۵٪ قرار داده سپس از حاشیه پرگنه جدایه‌های نامعلوم نیز دو قرص قطر ۵ میلی‌متر در طرفین قطعه استاندارد به فاصله ۲ - ۱ سانتی‌متر از آن قرار داده و در شرایط سترون داخل تشتک پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب جای گرفت و در شرایط تاریکی و دمای C° ۲۵ نگهداری گردید. بعد از ۸ تا ۲۴ ساعت به محض اینکه، ریسه‌ها به هم رسیدند، نوع واکنش ریسه‌ای بررسی شدند و معیار آناستوموز، مشاهده بیش از ۵ آناستوموز در یک تکرار بود (۴). از کشت سه روزه روی محیط آب آگار، برای اندازه‌گیری قطر ریسه استفاده گردید و پس از ۵ روز ابعاد (طول و قطر) سلولهای مونیلیوئید اندازه‌گیری شد.

از هر یک از گروههای آناستوموزی شناخته شده تعداد ۴ نماینده به صورت تصادفی انتخاب شد ابتدا در محیط کشت PDA برای ۷ روز کشت داده شدند. سپس از حاشیه پرگنه‌ها یک قرص ۵ میلی‌متری به مرکز تشتک پتری ۹ سانتیمتری حاوی PDA منتقل کرده و پتریها را در دماهای ۱۰ - ۱۵ - ۲۰ - ۲۵ - ۳۰ درجه سانتیگراد در تاریکی نگهداری شدند. هر ۲۴ ساعت تا ۱۰ روز قطر پرگنه اندازه‌گیری گردید. چهار تکرار در هر رژیم حرارتی برای هر جدایه در نظر گرفته شد.

۳ - بررسی امکان تشکیل فرم جنسی: به منظور تحریک قارچ به تولید فرم جنسی از روشهای زیر استفاده گردید:

۱ - ۳ - انتقال از محیط غذایی غنی به محیط غذایی فقیر (۱۵).

الف - انتقال از محیط سیب‌زمینی - دکستروز - آگار (PDA) به محیط آب - آگار (WA): ابتدا قارچ را در محیط PDA که از نظر کربوهیدرات غنی می‌باشد کشت داده و بعد از گذشت دو هفته مقداری از آن به محیط WA منتقل و در تاریکی C° ۲۵ نگهداری گردید.

ب - انتقال از محیط سیب زمینی - دکستروز - عصاره مخمر - آگار (PYDA) به محیط عصاره خاک - آگار: جدایه‌های ریزوکتونیا روی محیط PYDA که همان PDA می‌باشد که بوسیله افزودن یک گرم در لیتر عصاره مخمر تکمیل شده بود به مدت ۶ روز در C° ۲۵ کشت گردید سپس مقداری از آن به محیط کشت عصاره خاک - آگار[2] (Flentje, 1956) منتقل و در C° ۲۵ نگهداری گردید.

۲ - ۳ - آگار حاوی عصاره مخمر مارمایت[3] (۸): ابتدا جدایه‌های ریزوکتونیا را در محیط سیب زمینی - دکستروز - عصاره مخمر مارمایت - آگار (OPDMA) منتقل کرده پس از ۳ روز قطعه‌ای از قارچ را به محیط WA منتقل کرده و تحت نور کم دمای C° ۲۵ نگهداری می‌کنیم.

۳ - ۳ - کشت در محیط آگار حاوی قارچکش (۷): سوسپانسیونی از قارچکش مانکوزب به غلظت ۵٪ تهیه گردید و کاغذهای صافی به قطر یک سانتی‌متر را به آن آغشته نموده و پس از خشک شدن در مجاورت هوا، آنها را به فاصله ۳ - ۲ سانتی‌متری از دیواره تشتک پتری حاوی محیط WA قرار داده و در نقطه مقابل آن، از حاشیه جدایه در حال رشد قارچ ریزوکتونیا به قطر ۵ میلی‌متر قرار داده و تشتک‌های پتری را در دمای C° ۲۵ نگهداری می‌کنیم انشعابهای ریسه و امکان تشکیل بازیدیوم پس از ۱۰ روز بررسی گردید.

۴ - ۳ - کشت در محیط دانه یولاف پوست کنده و آگار[4] (OA) (۱۴): ۲۵ گرم دانه یولاف پوست کنده را در نیم لیتر آب مقطر ریخته، pH آنرا ۷/۲ تنظیم نموده و سترون می‌کنیم. سپس محیط را در تشتک پتری ریخته و از حاشیه پرگنه ۱۰ روزهٔ جدایه‌های ریزوکتونیای رویانده شده روی محیط OPDMA به این محیط منتقل کرده و پس از ۱۰ روز مورد بررسی قرار می‌دهیم.

۵ - ۳ - روش پوشاندن محیط با خاک (۱۴):

الف - کشت در محیط OPDMA و پوشاندن محیط ۷ روزه با خاک: پس از کشت قارچ در محیط OPDMA به مدت یک هفته، سطح محیط را تا لبه تشتک پتری با خاکی که شامل یک حجم، شن و یک حجم خاک سترون شده در دمای C° ۷۱ به مدت نیم ساعت بوده پوشانده و پس از نگهداری در دمای C° ۲۵ و آبیاری توسط آب مقطر طی ۳ مرحله در روز، به حدی که آب آزاد در ظرف تشکیل نشود، پس از ۱۴ - ۱۲ روز سطح خاک جهت تشکیل فرم جنسی قارچ بررسی گردید.

1 - Block
2 - soil - Extract Agar
3 - Marmite
4 - Oat Agar

ب - کشت در محیط PYDA و پوشاندن محیط با خاک: محیط پایه مورد استفاده شامل عصاره سیب زمینی - عصاره مخمر - دکستروز - آگار باکتریولوژی (PYDA) با pH معادل ۴/۵ بود که ابتدا جدایه‌ها را در این محیط در دمای ۲۷°C کشت داده پس از اینکه ریسه‌هابه حاشیه تشتک پتری رسیدند، سطح محیط را تا لبهٔ ظرف با خاکی با بافت سیلتی - رسی به دانه‌بندی ۵-۳ میلی‌متر ریخته و ظروف را در محیط آزمایشگاه نگهداری می‌کنیم. برای تأمین رطوبت خاک، آبیاری توسط آب مقطر طی ۳ مرحله در روز انجام گرفت.

۴ - اثبات بیماریزایی: تهیه مایه جدایه‌های مواد بررسی به ۲ روش استفاده از محیط PDA و استفاده از دانه گندم صورت گرفت. خاک مورد استفاده شامل: $\frac{۱}{۳}$ ماسه، $\frac{۱}{۳}$ خاک برگ، $\frac{۱}{۳}$ رس بوده که به مدت ۲ ساعت در فشار ۱/۵ اتمسفر و دمای ۱۲۱°C سترون گردید.

در روش اول از حاشیه پرگنه ۵ روزه قارچ در محیط PDA تعداد ۵ قرص به قطر ۵ میلی‌متر تهیه و در فاصله ۲ سانتی‌متری بالای غده‌های سیب‌زمینی در گلدان قرار داده و روی آن ۲ سانتی‌متر از خاک گلدان اضافه شد. در گیاهان شاهد، ۵ قرص PDA بدون مایه استفاده گردید.

در روش دوم پس از مایه زنی شیشه‌های حاوی دانه گندم سترون شده، آنها را برای ۳ هفته در شرایط آزمایشگاه نگهداری نموده تا کلیه بذور پوشیده از کلنی قارچ شوند. سپس به میزان ۱۰ گرم از بذور حامل قارچ را با یک کیلو خاک بالا مخلوط کرده و غده‌های سیب‌زمینی در آن کشت گردید و در گیاهان شاهد، از دانه گندم بدون مایه قارچ استفاده شد. کلیه گلدانها در شرایط گلخانه در دمای ۲۳°C نگهداری شدند آبیاری در حد نیاز انجام گرفت و پس از ۵۰ روز گیاهچه‌ها برداشت شدند. ریشه‌ها و جوانه‌ها به آرامی از ۲ گلدان در آورده شده و در آب شسته و بر اساس روش کارلینگ و نیز خسارت وارده به طوقه و ریشه‌ها محاسبه گردید (۴). آزمایشها در قالب طرح کاملاً تصادفی نامتعادل پیاده گردید و میانگین‌ها به وسیله آزمون دانکن در سطح ۵٪ با یکدیگر مقایسه شدند. از زخم و شانکرهای ایجاد شده روی طوقه و ریشه یک نمونه از هر جدایه به آزمایشگاه منتقل و پس از ضد عفونی سطحی و کشت در PDA با جدایه استاندارد خود آناستوموز داده وبیماری‌زایی قارچ ثابت گردید.

۵ - الکتروفورز پروتئین گروههای شناخته شده: به منظور تهیه عصاره پروتئینی جدایه‌های قارچها، ابتدا آنها را در محیط مایع، سیب‌زمینی - دکستروز کشت داده، پس از ۵ روز در دمای ۲۷±۱°C و قبل از تشکیل اسکلروت، توده میسلیوم توسط پارچه ململ جدا گردید. طی ۲ مرحله شستشو با آب مقطر سترون توده میسلیوم بین ۲ کاغذ صافی سترون آبگیری و بمیزان یک گرم از تودهٔ ریسه در هاون چینی قرار داده شد. و آنرا در دستگاه سرما خشک[1] در دمای ۵۰°C- و در حمام ایزوپروپانول[2] قرار داده تا منجمد شود. پس از منجمد شدن تودهٔ ریسه، آن راکاملا" خرد کرده و به پودر حاصله یک میلی‌لیتر بافر تریس با مولاریته ۰/۰۶ و با pH معادل ۸ اضافه شد و کاملا" مخلوط گردید. در مرحله بعدی به آن یک میلی‌لیتر بافر نمونه (۲۰٪ گلیسرول، ۹٪ دو مرکاپتواتانل[3]، ۳/۵٪ SDS[4]، تریس ۰/۱۲۵ مولار با pH معادل ۸) اضافه شد. بعد از مخلوط کردن بافر و هم زدن محلول، آن را به مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده تا پروتئین‌های محلول با حرارت دیدن در حضور الکل با وزن مولکولی کم و وجود SDS شکسته و به واحدهای کوچکتر خود تبدیل گردد. پس از سرد شدن سوسپانسیون تا دمای اتاق، به مدت ۱۵ دقیقه در ۷۰۰۰ g سانتریفیوژ شده، لایهٔ بالایی را توسط میکروپیپت جداکرده در لولهٔ آزمایشگاه در دمای ۴°C تا زمان مصرف نگهداری گردید. ۰/۱ برم‌فنل‌بلو[5] با غلظت ۰/۰۵٪ بعنوان مارکر در نمونه‌های پروتئینی استفاده شد. الکتروفورز بر اساس روش SDS-PAGE[6] (Laemmli 1970) به اجرا در آمد (۱۰). ژل Stacking با غلظت ۵٪ و ژل Separating با غلظت ۱۰٪ تهیه شد و الکتروفورز در جریان ثابت ۲۰ mA و در سیستم بافری Tris-glycine انجام شد. ژلها توسط کومازین بلو[7] ۰/۱٪ در ۴۵ میلی‌لیتر متانول، ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۱۰ میلی‌لیتر استیک اسید رنگ‌آمیزی شدند. برای رنگ‌زدایی از چهار محلول رنگ‌زدا که به ترتیب مورد استفاده قرار گرفتند بهره گرفته شد.

نتایج و بحث

۱ - جداسازی و تشخیص عامل بیماری: ۱۰۵ جدایه که دارای مشخصات ریسهٔ جنس ریزوکتونیا بودند از ساقه، استولن، ریشه و غده

1 - Freezdraier
2 - Isopropanol
3 - Two mercaptoethanol
4 - Sodium dodecylsulfate
5 - Bromo phenol blu
6 - SDS polyacylamid gel electrophoresis
7 - Coomassie blue

گیاه سیب‌زمینی جدا شد که پس از رنگ‌آمیزی هسته، تعداد ۱۳ جدایه دو هسته‌ای (BNR) و ۹۲ جدایه در هر سلول رویشی خود بیش از دو هسته دارا بودند. جدایه‌های چند هسته‌ای در مرحله اوّل با گروه استاندارد AG3 و بعد با بقیه گروه‌ها از AG1 تا AG11 و AG-BI تلاقی داده شدند. از مجموع ۹۲ جدایه چند هسته‌ای تعداد ۷۵ جدایه متعلق به گروه AG3 که از ساقه، ریشه، غده و استولن به دست آمدند و ۱۱ جدایه متعلق به گروه AG4 که از ساقه و استولن جدا شدند ۵ جدایه متعلق به گروه AG2-1 که از ساقه و استولن گرفته شدند یک جدایه (F4) از ساقه با هیچیک از گروههای آناستوموزی استاندارد واکنش نداد (۱). از آنجایی که گروههای استاندارد دو هسته‌ای به طور کامل در دسترس نبودند و از طرفی با توجه به اهمیتی که جدایه‌های دو هسته‌ای و بخصوص جدایه‌های متعلق به گروه آناستوموزی AG-G در مبارزه بیولوژیک با شانکر سیب‌زمینی دارا می‌باشند، ابتدا کلیه جدایه‌های دو هسته‌ای با جدایه استاندارد AG-G تلاقی داده شدند ولی هیچکدام از جدایه‌ها با این گروه استاندارد واکنش آناستوموزی ندادند و در مرحله بعد کلیه ۱۳ جدایه‌ها را با همدیگر تلاقی داده تا اعضاء مشترک متعلق به یک گروه آناستوموزی مشخص گردند. کلیه ۱۳ جدایه دو هسته‌ای در شش گروه جای گرفتند که هیچیک متعلق به AG-G نبودند (جدول ۱).

اولین جدایه شناسایی شده هر گروه آناستوموزی را به عنوان جدایه تست کننده دوم با بقیه جدایه‌های همان گروه تلاقی داده شد که اطمینان بیشتری از نتایج حاصل گردد.

بیست جدایهٔ بدست آمده از اسکلرتهای روی غده‌ها همگی متعلق به گروه AG3 بودند و گروههای AG2-1 و AG4 تنها از ساقه و استولن گیاه سیب‌زمینی جدا شدند.

جدول ۱ - گروه‌بندی جدایه‌های دو هسته‌ای

گروه	شماره جدایه
I	N1-GO-BM2
II	A5-A3-F5-N11-A6
III	F7-S1
IV	EII
V	Z5
VI	EA-1

طی این بررسی ۱۰ جدایه از گروه AG3 و ۵ جدایه از گروه AG4 و ۵ جدایهٔ گروه AG2-1 را با استاندارد AG-BI تلاقی داده ولی هیچگونه آناستوموزی مشاهده نگردید.

مشخصات رویشی گروههای شناسایی شده بدین شرح است:

گروه آناستوموزی AG3: ریسه رویشی در اوایل زرد سپس قهوه‌ای تیره، و کمی از سطح محیط برآمده بوده، حالت دوایر متحدالمرکز در کلنی پس از ۲ هفته ظاهر شده و تعداد هسته در هر سلول رویشی از ۱۳ - ۵ عدد شمارش گردید. متوسط قطر ریسه ۸/۷۹ میکرومتر و دمای مناسب رشد ۲۵°C - ۲۰ و میزان رشد در ۲۰° C معادل ۱۴ میلی‌متر در ۲۴ ساعت اندازه‌گیری گردید. اسکلروت پس از گذشت یک هفته ظاهر شده و پراکندگی آنها به صورت انفرادی یا مجتمع در مرکز تا حاشیهٔ پتری بوده و قطر آنها ۲ تا ۸ میلیمتر اندازه‌گیری گردید. متوسط طول سلولهای دانه تسبیحی[1] ۳۶/۸ میکرومتر و قطر آنها ۱۸/۱۴ میکرومتر و نسبت طول به قطر ۲/۰۲ بود.

گروه آناستوموزی AG4: ریسه رویشی ابتدا سفید بوده و پس از گذشت ۲ هفته به رنگ خاکستری متمایل به قهوه‌ای درآمده و حالت چرمی با دوایر متحدالمرکز به خود می‌گیرند. ریسه‌ها کاملاً چسبیده به محیط و تعداد هسته در هر سلول رویشی بین ۹ - ۴ عدد شمارش گردید. متوسط قطر ریسه ۶/۹۲ میکرومتر و دمای مناسب رشد ۳۰°C-۲۵ و در دمای ۲۰° C میزان رشد معادل ۲۰ میلیمتر در ۲۴ ساعت برآورد گردید. اسکلروتها به رنگ قهوه‌ای تا سیاه و حداکثر به قطر یک میلی‌متر حول دایره‌ای در حاشیه پتری چسبیده به محیط تشکیل می‌شوند. متوسط طول سلولهای دانه تسبیحی ۲۶/۴۶ میکرومتر و قطر آنها ۱۳/۱ میکرومتر و نسبت طول به قطر ۲/۰۱ بوده با توجه به رنگ اسکلروتها، زیر گروه جدایه‌های جمع‌آوری شده می‌توان AG4-HGI باشد.

گروه آناستوموزی AG2-1: ریسه‌های رویشی ابتدا روشن، بعد قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای مایل به قرمز می‌باشد که در سطح محیط کشت و یا بیرون از محیط، به صورت هوایی رشد می‌کند. تعداد هسته در هر سلول رویشی ۸ - ۵ عدد و متوسط قطر ۷/۲۵ میکرومتر و دمای مناسب رشد ۲۵-۲۰°C و میزان رشد ریسه در ۲۰° C

1 - Monilioid cell

معادل ۱۱ میلی‌متر در ۲۴ ساعت بود. اسکلروت‌های کوچک و گرد به قطر حداکثر ۱/۵ میلی‌متر حول دوایر متحدالمرکز به رنگ قهوه‌ای روشن تا تیره و عمدتاً در ریسه‌های هوایی و گاهی فرو رفته در محیط تولید می‌شوند. طول سلولهای دانه تسبیحی ۲۹/۷۶ میکرومتر و قطر آنها ۱۳/۲۳ میکرومتر و نسبت طول به قطر ۲/۲۵ محاسبه گردید.

مقایسه میزان رشد گروههای شناخته شده در درجات متفاوت حرارتی در شکل ۱ آمده است.

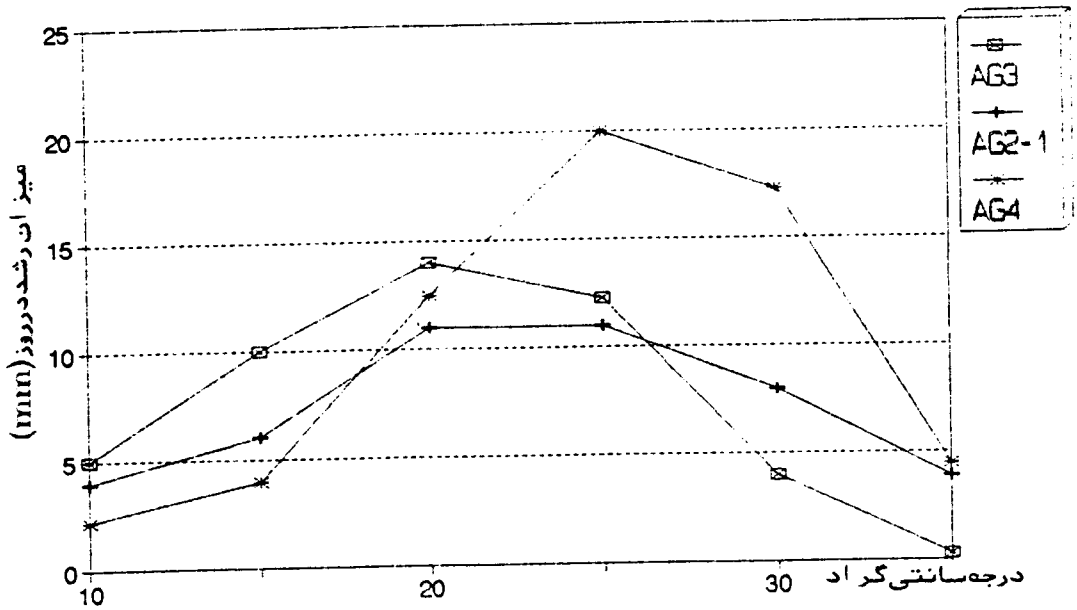
۲ - نشانه‌های بیماری: با کاشت غده در خاک و رشد جوانه‌های موجود بر روی آن، ساقه‌های تازه مورد حمله قارچ قرار گرفته و آلودگی آغاز می‌گردد، اولین نشانه ایجاد لکه‌های قهوه‌ای مایل به قرمز[1] بر روی ساقه سفید می‌باشد که به تدریج با توسعه قارچ در بافت گیاهی این لکه‌ها گسترش یافته، حاشیه آنها برجسته شده و وسط لکه‌ها چروکیدگی ایجاد می‌شود که با توجه به طرح و فرم این لکه‌ها به شانکرهای جزیره‌ای معروف‌اند.

با مورد حمله قرار گرفتن نوک جوانه در حال رشد و تخریب بافت مریستمی آن، از رشد و نمو ساقه جلوگیری شده و مرگ و کاهش جوانه‌ها رخ می‌دهد که با فعال شدن جوانه‌های در حال خواب روی ساقه زیر ناحیه آلوده، ساقه‌های ثانویه حاصل می‌شوند از این رو، خروج گیاهان آلوده از خاک به تأخیر افتاده و مزرعه از رشد ناهمگن برخوردار خواهد بود. با تشکیل شانکر روی ساقه علائمی چون زردی - خشکیدگی برگهای پائین در گیاه و پیچیدگی برگها به سمت بال بروز می‌کند. علاوه بر ساقه، این زخمها می‌توانند بر روی استولن نیز تشکیل شوند که در نتیجه آلودگی استولن‌ها، طول آنها کوتاه می‌شود. از دیگر نشانه‌های ایجاد شده توسط این قارچ تشکیل اسکلروت در روی غده می‌باشد که از نشانه‌های بارز آلودگی می‌باشد و میزان تولید اسکلروت روی غده در پایان فصل زراعی پس از ریزش اندامهای هوایی بیشتر می‌شود. این اسکلروت‌ها با شستن از غده کنده نمی‌شوند، در نتیجهٔ آلودگی غده‌ها به اسکلروت. غده‌ها بد شکل و ناصاف می‌شوند.

۳ - تولید فرم جنسی: از گروه AG3 ده نماینده و از گروه AG4، هشت نماینده و از گروه AG2-1 چهار نماینده و کلیه ۱۳ جدایه دو هسته‌ای و تنها جدایه ناشناخته چند هسته‌ای طی یک تکرار بر اساس روشهای توضیح داده شده، مورد استفاده قرار گرفتند که مدت زمان نگهداری تشتکهای پتری در جدول ۲ آمده است.

علی رغم بازدید مستمر از محیطهای کشت بالا در هیچ یک از روشهای انجام شده، فرم جنسی مشاهده نگردید.

۴ - اثبات بیماریزایی: گروه آناستوموزی AG3 دارای بیشترین شدت بیماریزایی بر روی ساقه و ریشه در هر دو روش مورد بررسی بود و میزان خسارت جدایه‌های دو هسته‌ای از کلیه گروهها



شکل ۱ - مقایسه میزان رشد پرگنه در دماهای مختلف بر حسب میلیمتر رشد در ۲۴ ساعت

sunken

کمتر و در غالب موارد با شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت. بعد از AG3دو گروه AG2-1وAG4 از نظر خسارت وارده یکسان بودند.

از گروه آناستوموزی AG3 یک جدایه و از جدایه‌های در هسته‌ای ۲ جدایه هیچگونه علائمی را روی ریشه و ساقه سیب‌زمینی ایجاد نکردند. نتایج بدست آمده در جدول ۳ خلاصه شده است.

۵ – الکتروفورز پروتئین: نتیجه الکتروفورز پروتئینی وجود ۲۳ تا ۲۵ باند در سه گروه آناستوموزی بود. که قابل تفکیک از یکدیگر بودند، که بر اساس مهاجرت نسبی، باندهای پروتئینی قابل مقایسه با یکدیگر می‌باشند. الکتروفوروگرام برای جدایه‌های متعلق به گروههای آناستوموزی AG2-1، AG3 و AG4 بدست آمد و درون جدایه‌های متعلق به گروههای AG2-1 و AG3 هماهنگی لازم برقرار بود ولی جدایه‌های AG4 با یکدیگر ناهماهنگ بودند (شکل ۲، ۳ و ۴).

در این تحقیق، گروه آناستوموزی AG3 از قارچ *R.solani* با ۷۱/۵ % فراوانی نسبی شایع‌ترین گروهی است که در مزارع استان خراسان وجود دارد و پس از آن گروههای AG4 با ۱۰/۵ % و AG2-1 با ۴/۷% به ترتیب بیشترین فراوانی رابه خود اختصاص دادند.

اهمیت گروه AG3 از آن جهت است که بر روی ساقه، استولن، ریشه و غده قادر به ایجاد شانکر بوده و همچنین در روی کلیه اندام‌های زیرزمینی قادر به تولید اسکلروت می‌باشد. از طرفی دیگر

جدول ۲ - مدت زمان نگهداری جدایه‌ها در روشهای مختلف تحریک قارچ به تولید فرم جنسی

روش	مدت نگهداری
۱ - WA ــ PDA[1]	۴۰ روز
۲ - PYDA ــ عصاره خاک آگار	۳۵ روز
۳ - WA ــ OPDMA	۴۰ روز
۴ - OA ــ OPDMA	۴۷ روز
۵ - OPDMA + خاک[2]	۲/۵ ماه
۶ - PYDA + خاک	۲/۵ ماه
۷ - WA + حلقه مانکوزب	۲ ماه

۱ - ــ بمعنی کشت قارچ در محیط اول و انتقال به محیط دوم است.

۲ - + بمعنی اضافه کردن خاک یا حلقه مانکوزب به سطح محیط است.

انتقال توسط غده از شایع‌ترین راههای انتشار و پراکنش این قارچ می‌باشد، لذا بدون هیچگونه محدودیتی به راحتی به مزارع عاری از آلودگی وارد شده و آنجا را آلوده می‌کند. در آزمایشهای گلخانه‌ای نیز قدرت بالای بیماریزایی این گروه ثابت گردید. از این رو گروه آناستوموزی AG3 بعنوان مخربترین گروه شایع در مزارع استان معرفی می‌گردد. جدایه‌های گروههای AG4 و AG2-1 قدر به تشکیل اسکلروت روی غده نبودند و علائم مربوط به پوسته سیاه[1] را ایجاد نکردند ولی از آنجایی که در محیط آزمایشگاه در تستک پتری قادر به تولید اسکلروت بودند، معلوم می‌شود که اسکلروت‌های

جدول ۳ - مقایسه میزان درصد خسارت وارده به ساقه و ریشه

شاهد	گروه آناستوموزی				اندام مورد بررسی	نوع مایه قارچ
	F4[2]	BNR[1]	AG4	AG3	AG2-1		
0b	۱/۸a	۰/۸۵b	۱/۶۶a	۲/۸۳a	۱/۶۱a[3]	ساقه	بذر گندم
0b	۰/۹a	۰/۱۴b	۱/۱۶a	۲/۱a	۱/۵۲a	ریشه	
0b	۱/۱a	۰/۲۵a	۱/۷۶a	۲/۹۸a	۱/۱۳a	ساقه	PDA
0b	۰/۵b	۰/۱۷b	۰/۸۶b	۱/۹۲a	۰/۷۷b	ریشه	

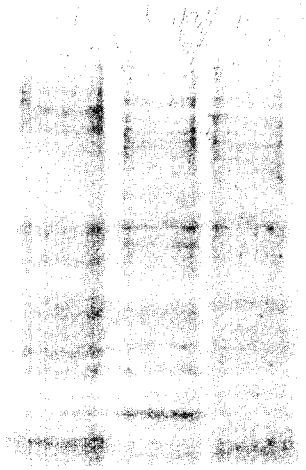
۱ - جدایه‌های ریزوکتونیای دو هسته‌ای

۲ - جدایه چند هسته‌ای از *R. solani* که گروه آناستوموزی آن نامعلوم است.

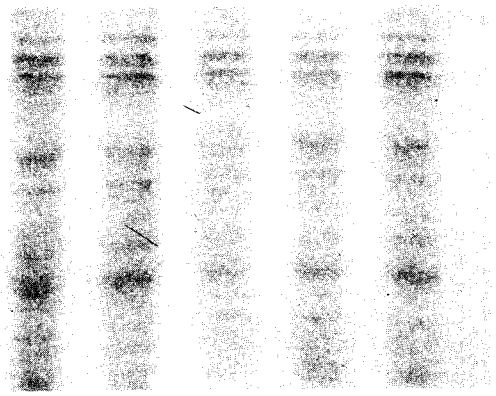
۳ - میانگین ضرایب محاسبه شده بر اساس روش کارلینگ و لینر

۴ - در هر سطر حروف یکسان بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

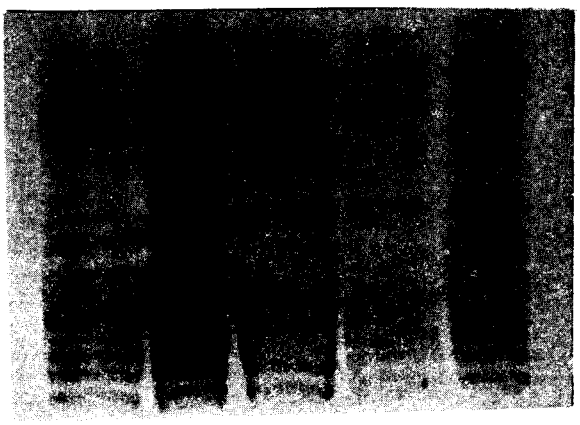
1 - black scurf



شکل ۲ - الگوی پروتئینی محلول سه جدایه استاندارد AG2-1 و AG3 و AG4 را به ترتیب از سمت چپ نشان می‌دهد. همانطور که در تصویر پیداست الگوی پروتئینی محلول در سه جدایه با یکدیگر تفاوت دارند.



شکل ۳ - الگوی پروتئینی چهار جدایه AG2-1 به همراه استاندارد AG2-1 را نشان می‌دهد.



شکل ۴ - الگوی پروتئینی چهار جدایه AG3 به همراه استاندارد AG3 را نشان می‌دهد.

این دو گروه می‌توانند در خاک یا در بقایای گیاهی مانده در خاک بعنوان منابع آلوده‌کنندهٔ محصولات زراعی مطرح باشد لذا این دو گروه علیرغم گروه AG3 که دارای اینوکلوم خاکزاد و غده‌زاد می‌باشد تنها اینوکلوم خاکزاد دارند (۳).

بررسی تأثیر درجات مختلف حرارت در رشد جدایه‌های سه گروه نشان می‌دهد که درجه حرارت بهینه برای گروه AG4، ۲۵ درجه سانتیگراد و برای گروه‌های AG3، AG2-1 حدود ۲۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. لذا با توجه به رشد بیشتر گروه آناستوموزی AG3 در دماهای پائین نسبت به سایر گروهها می‌توان نتیجه گرفت که در مزرعه طی شرایط سرد که بیشتر شامل اوایل فصل زراعی می‌باشد، اهمیت گروه AG3 بیشتر از سایر گروهها می‌باشد و با گرم شدن هوا شرایط رشد برای گروههایی مانند AG4 فراهم آمده و به گیاه خسارت وارد می‌سازند. گروه AG2-1 از نظر دمای مناسب رشد نزدیک AG3 می‌باشد ولی با توجه به فراوانی کمتر نسبت به AG3 و قدرت بیماریزایی کمتر و عدم انتقال توسط اسکلروت روی غده کلا "گروهی است که اهمیت کمتری در پیدایش بیماری دارد.

خصوصیات رویشی و بیماریزایی *R. solani* قابل تغییر است و همچنین بعضی از جدایه‌ها قابلیت تشکیل اسکلروت و یا آناستوموز ریسه را از دست می‌دهند (۶ - ۵) که علت چنین پدیده‌هایی هنوز مشخص نشده است. از این رو جدایهٔ غیر بیماریزا از گروه AG3 و جدایه ناشناخته F4 در این بررسی قابل توجیه است.

ایجاد فرم جنسی قارچ همانطور که اشاره شد موفقیت‌آمیز نبود که علل آن عدم تأمین شرایط محیطی لازم همچون رطوبت بالا، نور کم، تهویه مناسب می‌باشد. همچنین در روش استفاده از قارچکش احتمالاً قارچکش مانکوزب تحریک کننده نبوده و به جای آن باید از سموم دیگر یا مواد شیمیایی دیگری استفاده نمود.

نتایج حاصله از الکتروفورز پروتئین جدایه‌های متعلق به سه گروه AG2-1، AG3 و AG4 نشانگر این واقعیت است که هر سه گروه الگوی متفاوتی را دارا می‌باشند ولی در بین گروه AG4 علیرغم تکرار آزمایش نتیجه مطلوب حاصل نگردید و جدایه‌های مورد بررسی باندهای متنوعی از خود نشان دادند که این موضوع با تحقیقات انجام شده قبلی مغایرت دارد (۱۱). عدم نتیجه‌گیری مناسب به احتمال زیاد مربوط به یکسان نبودن میزان وزن ریسه

استخراج شده از محیط غذایی مایع و در نتیجه نامساوی بودن غلظت‌های پروتئینی محلول جدایه‌های مورد بررسی بوده است.

مراجع مورد استفاده

REFERENCES

۱ - امتی، ف. و ا. حمدالله‌زاده، ۱۳۷۴. معرفی گروههای آناستوموزی *R. solani* شانکر سیب‌زمینی در استان سمنان. خلاصه مقالات دوازدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. آموزشکده کشاورزی کرج.

۲ - حیدریان، ا. ۱۳۷۴. بیماری پژمردگی شاخه، زوال و مرگ درختان مرکبات ناشی از قارچ *Nattrassia mangiferae* در استان خوزستان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. ۱۱۰ صفحه.

3 - Balali, G. R., S. M. Neate., D. L. Whisson & T. J. Wicks. 1995. Anastomosis group and pathogenicity of isolates of R. solani from potato crops in south Austalia. Plant Pathology 44:1050- 1057.

4 - Carling, D. E., & R. H. Leiner. 1990. Effect of temperature on virulence of R. solani and other Rhizoctonia on Potato. Phytopathology. 80:930-934.

5 - Hyakumachi, M., & T. Ui. 1987. Non - self - anastomosing isolates of Rhizoctonia solani obtained from fields of sugarbeet monoculture. Trans. Br. Mycol. Soc. 89:155-159.

6 - Hyakumachi, M., & T. Ui. 1988. Dvelopment of the teleomorph of nn - self - Anastomosing isolates of Rhizoctonia solani by a buried slide method. Plant Phatology 37:438-440.

7 - Kangathralingam, N., & M. C. Garson. 1988. Technique to induce sporulation in T. cucumeris. Plant Dis. 72:146-148.

8 - Murray, D. I. L. 1982. A modified procedure for fruiting R. solani on agar. Trans. Br. Mycol. Soc. 79:129-135.

9 - Parmeter, J. R. 1970. Rhizoctonia solani Biology and Pathology. Berkeley. Univ. California Press. 300pp.

10 - Rahimian, H. 1989. Occurrence of aggregate sheath - spot of rice in Iran. J. Phytopathol. 125:41-46.

11 - Reynolds, M., A. R. Weinhold., & T. J. Morris. 1983. Comparison of anastomosis groups of R. solani by polyacrylamid gel electrophoresis of soluble proteins. Phytopathol. 73:903-906.

12 - Rich, A. E. 1983. Potato Diseases. Academic Press. 238p.

13 - Schneider, J. H. M., M. T. Schilder., & G. Dijst. 1997. Characterization of Rhizoctonia solani AG2 isolates causing bare patch in field grown tulips in the Nether lands. European Journal of Plant Pathology 103:265-279.

14 - Sneh, B., L. Burpee., & A. Ogoshi. 1991. Identification of Rhizoctonia Species. APS. press. St. Poul. Minnesota. 133pp.

15 - Stretton, H. M., A. R. Mckenzie., K. F. Baker., & N. T. Flentje. 1964. Formation of the basidial stage of some isolates of Rhizoctonia. Phytopathology. 54:1093-1095.

16 - Sturz, LA. V, H. W. Johnston., & C. K. Macwilliams. 1995. Weed hosts of Rhizoctonia solani in Prince Edward Island. Can Journal of Plant Pathol. 17:346-352.

17 - Whitney, H. S. 1964. Sporulation of Thanatephorus cucumeris (R. solani) in the light and in the dark. Phytopathology. 54:874-875.

Identification of Anastomosis Groups of *Rhizoctonia Solani* the Causal Stem Chancre of Potato in Khorasan

M. SALATI, M. FALAHATI-RASTEGAR AND B. JAFARPOUR

Former Graduate Student, Associate Professor and Professor, Respectively,

Department of Plant Pathology, College of Agriculture

University of Ferdosi, Mashhad, Iran

Accepted 17 Feb 1997

SUMMARY

Rhizoctonia disease, caused by *Rhizoctonia solani* is one of the most important fungal diseases of potato in Khorasan. From 105 isolates of Rhizoctonia collected from different potato fields, 75 isolates belonged to AG3, 11 to AG4, 5 to AG2-1 of R. solani and 13 to binucleate groups. One isolate did not anastomos with any of the tester cultures including (AGI (IA-IB-IC)- AG2(1-2)- AG3- AG4- AG5- AG6- AG7- AG9- AG11- AG- BI). In vitro the growth rate of AG4 isolate was significantly faster than AG3 and AG2-1 above 15°C while the growth rate of AG3 was faster than AG4 and AG2-1 below 15°C. Members of AG3, AG4 and AG2-1 were not restricted to any particular geographical region of the province. AG3 isolates were more virulent than AG4 and AG2-1 isolates. All isolates from tuberborn sclerotia were belonged to AG3. The high incidence and virulence of AG3 isolates indicate that AG3 is the major cause of rhizoctonia disease in Khorasan province, where as, AG4 and AG2-1 are of minore importance. The protein profiles for the three AGs were distinctive and could be distinguished from one another. The protein patterns from isolates belonging to AG3 and AG2-1 were uniformly distinct. Protein patterns of isolates beloging to AG4 varied in bands.

Keywords: Anastomosis & Stem chancre.