بررسی خصوصیات جدایه‌های ریزوکتونیای چغندرقند در ایران

Characterization of sugar beet Rhizoctonia isolates in Iran

سامان سلطانی نژاد[1]، سید باقر محمودی[2] و رضا فرخی نژاد[3]

تاریخ دریافت: ۸۶/۲/۱۶ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۶/۱۰/۲۴

س. سلطانی نژاد، س. ب. محمودی و ر. فرخی نژاد . ۱۳۸٦ بررسی خصوصیات جدایه‌های ریزوکتونیای چغندرقند در ایران. **چغندرقند ۲۳(۲): ۱۵۰-۱۳۵**

چکیده

درفاصله سال‌های ۱۳۸۰ تا ۱۳۸٤، از پوسیدگی بذر، مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه و شانکر پوسیدگی خشک ریشه چغندرقند ۷۹ جدایه با خصوصیات جنس ریزوکتونیا جداسازی شد. مطالعات ریخت‌شناسی، شمارش تعداد هسته در هر سلول هیف و اندازه‌گیری قطر هیف، چهار جدایه را درگروه دو هسته‌ای و ۷۵جدایه را در گروه چند هسته‌ای‌ها دسته‌بندی کرد. از تعداد ۷٤جدایه چند هسته‌ای، ۲۷جدایه متعلق به AG4، ۲۸جدایه AG2، دو جدایه متعلق‌به AG3، یک جدایه AG5 و بقیه (۱۷ جدایه) با هیچ گروهی آناستوموز ندادند. اغلب جدایه‌های AG2 از پوسیدگی ریشه جداسازی شدند. جدایه‌های AG4 از مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه جداسازی شدند. از علائم شانکر پوسیدگی خشک و چوب پنبه‌ای با دوایر متحدالمرکز روی ریشه، پنج جدایه جمع‌آوری شد که این جدایه‌ها با هیچ گروهی آناستوموز ندادند. دمای بهینه رشد اکثر جدایه‌ها ۲۵درجه سانتی‌گراد به‌دست آمد. جدایه‌های شانکر پوسیدگی خشک در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین رشد را داشتند. آزمون بیماریزایی در شرایط درون شیشه انجام شد. نتایج این آزمون تنوع در بیماریزایی جدایه‌ها را نمایان ساخت. جدایه‌های متعلق به AG4 بیشترین میزان بیماری را روی گیاهچه‌ها نشان دادند و جدایه‌های AG2 نسبت به AG4 از بیماریزایی کمتری برخوردار بودند. جدایه‌های AG3 و AG 5 تغییر رنگ مختصری روی گیاهچه‌ها نشان دادند. از بین جدایه‌ها دو هسته‌ای، دو جدایه غیربیماریزا ولی دو جدایه دیگر روی گیاهچه‌ها علائم قهوه‌ای شدن ریشه‌چه را نشان دادند. جدایه‌های شانکر پوسیدگی خشک نیز روی گیاهچه‌ها بیماریزا بودند. تنوع بیماریزایی جدایه‌های منتخب گروه‌های آناستوموزی در شرایط گلخانه و روی گیاهان بالغ چغندرقند نیز بررسی شد. نتایج نشان داد جدایه‌های هر دو گروه آناستوموزی دو و چهار قادر به ایجاد پوسیدگی ریشه می‌باشند، اما قدرت بیماریزایی جدایه Rh114 (AG-2) روی گیاهان بالغ بیشتر بود.

واژه‌های کلیدی: ایران، بیماریزایی، چغندرقند، ریزوکتونیا، شانکر پوسیدگی خشک، گروه آناستوموزی، مرگ گیاهچه

۱ـ دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران – اهواز.

۲ـ استادیار مؤسسه تحقیقات چغندر قند – کرج. Bagher_m@yahoo.com *- نویسنده مسئول

۳ـ استاد دانشکده کشاورزی دانشگاه شهید چمران – اهواز.

مقدمه

ریزوکتونیا از نظر تاکسونومیکی، تنوع ژنتیکی، بیماریزایی و اکولوژیکی یک مجموعه بسیار متنوع (Mordue et al. 1989) و گونه معروف آن *Rhizoctonia solani* می‌باشد. این گونه عامل مرگ گیاهچه، پوسیدگی ریشه و طوقه و بلایت برگی چغندرقند بوده و تنوع ژنتیکی بسیار بالایی از جمعیت آن گزارش گردیده است، لذا به آن گونه مرکب اطلاق شده است (Vi1ga1ys and Cubeta 1994). شبه جنس ریزوکتونیا براساس تعداد هسته‌های موجود در هر سلول هیف، به سه دسته ریزوکتونیاهای تک هسته‌ای، دو هسته‌ای و چند هسته‌ای گروه‌بندی شده است(Moore 1996). دو گروه اخیر به نوبه خود و براساس مفهوم گروه‌بندی آناستوموزی به چندین گروه که از لحاظ ژنتیکی مجزا هستند تقسیم‌بندی می‌شوند (Car1ing et al. 2002). درحقیقت استفاده از روش‌های بیوشیمیایی و مولکولی در مطالعه تنوع ژنتیکی جدایه‌های ریزوکتونیا، تأییدکننده نتایج حاصل بر مبنای واکنش آناستوموز است.

بررسی خصوصیات و بیماریزایی گروه‌های آناستوموزی *R.solani* جدا شده از چغندرقند در یک تحقیق جامع در آمریکا نشان داده است که AG-4 گروه آناستوموزی غالب مرگ گیاهچه می باشد در حالی که ۲۷/۱۲درصد مرگ گیاهچه مربوط به AG-5 و ۱۹/۷۸درصد مربوط به AG-2-1، ۰/۳درصد مربوط به AG-3 و ۶/۵درصد با هیچ گروهی آناستوموز ندادند. آزمایش‌های اثبات بیماری‌زایی در گلخانه نشان داد که جدایه‌های متعلق به AG-1، AG-2-2 وAG-4 مرگ گیاهچه ایجاد نمودند اما جدایه‌های متعلق به AG-2-1، AG-3 و AG-5 قدرت بیماری‌زایی کمتری داشتند و بیشتر جدایه‌های *R.solani* جدا شده از مرگ گیاهچه چغندرقند در گروه آناستوموزی۴ (AG-4) قرار گرفتند(Windels and Nabben 1989). در ژاپن از گیاهچه‌های کشت‌شده در گلدان‌های کاغذی جدایه‌هایی از ریزوکتونیای دو هسته‌ای متعلق به گروه‌های آناستوموزی AG-E, AG-C, AG-K و AG-I جداسازی شده است. در بین جدایه‌های متعلق به ریزوکتونیاهای چند هسته‌ای جدایه‌های AG-4 و AG-2-2 از جدایه های AG-1,AG-2-1 وAG-5 بیماریزاتر بودند (Uchino et al.1983). گروه‌های آناستوموزی مختلفی از پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند جدا شدند (Sneh et al.1991). تاکنون گروه‌های آناستوموزی AG-2-2، AG-4، AG-2-1، AG-5 وAG-3 به ترتیب اهمیت به عنوان عوامل پوسیدگی ریشه و طوقه چغندرقند گزارش شده‌اند(Windels and Nabben 1989; Rush et al,1994).

شانکر پوسیدگی خشک (Dry rot canker) نمونه‌ای از پوسیدگی ریشه است که توسط ریچارد در سال ۱۹۲۱ در آمریکا گزارش شده است (به نقل از Herr 1996). در این بیماری تعداد زیادی زخم‌های قهوه‌ای تیره، موضعی و مدور به صورت دوایر متحدالمرکز به اندازه‌های متفاوت (به قطر ۲ تا ۲۵ میلی‌متر) در قسمت بالای ریشه ایجاد می‌شوند. در زیر

این زخم‌ها شانکرهای عمیقی ایجاد می‌گردد که حاوی ریسه‌های قارچ می‌باشند. در این حالت بافت میزبان خشک‌شده و به طور مشخصی از بافت‌های سالم مجاور متمایز می‌گردد. درباره این نوع پوسیدگی ریشه اطلاعات کمی وجود دارد(Cooke and Scott 1993; Herr 1996).

در ایران گروه‌های آناستوموزی یک تا پنج از مناطق مختلف کشور جدا و گزارش شده است. در مطالعات انجام شده توسط صفایی و میناسیان (۱۳۷۵) مشخص گردید که بالغ بر ده درصد از مرگ و میر گیاهچه‌های چغندرقند در استان خوزستان مربوط به *R.solani* AG-4 می‌باشد. عباسی مقدم و همکاران (۱۳۷۷) گروه‌های آناستوموزی AG-4 وAG-2-2 را از مزارع چغندرقند خراسان گزارش کردند. تنوع در بیماری‌زایی جدایه‌های *R.solani* چغندرقند مربوط به گروه‌های آناستوموزی چهار و دو مطالعه شده است (محمودی و همکاران ۱۳۸۳). بیماری‌های ریزوکتونیایی چغندرقند، در مراحل مختلف رشد، خسارت‌های جبران‌ناپذیری وارد می‌کنند. پوسیدگی بذر(Seed decay) و مرگ گیاهچه(Damping-off) ازجمله بیماری‌های مراحل اولیه رشد محصول (Herr 1996) و بلایت برگی (Naito 1984) در مراحل بعدی رشد است. پوسیدگی‌های ریشه ناشی از بیمارگر ریزوکتونیا نیز شامل پوسیدگی ریشه و طوقه، شانکر پوسیدگی خشک (Dry rot canker) و پوسیدگی بنفش ریشه می‌باشند که توسط گونه‌های مختلف ریزوکتونیا ایجاد می‌شود (Whitney and Duffus 1986). پوسیدگی ریشه ناشی از این بیمارگر، در دهه هفتاد از مهم‌ترین بیماری‌های چغندرقند در آمریکا به حساب آورده شده و میزان خسارت آن را بالغ بر هفت درصد برآورد کرده‌اند (Hecker and Ruppel 1977). باتوجه به اهمیت اقتصادی چغندرقند و پتانسیل بالای بیماری‌زایی گونه‌های ریزوکتونیا در مراحل مختلف رشد این گیاه، اتخاذ تصمیمات مؤثر در مدیریت این عامل بیماری‌زا مستلزم شناخت هرچه بیشتر خصوصیات کلیدی و مهم گونه‌های مختلف آن است. این تحقیق بر آن شد تا با جمع‌آوری و بررسی جدایه‌های ریزوکتونیا از مناطق مختلف چغندرکاری کشور و تعیین گروه آناستوموزی آن‌ها، تنوع گروه‌های آناستوموزی و اهمیت آن‌ها را در ارتباط با محصول چغندرقند و منطقه جغرافیایی مورد بررسی قرار دهد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌های بیمارگر

ازنمونه‌های آلوده و مشکوک پس از ضدعفونی با اتانول ۷۵درصد و با هیپوکلریت سدیم نیم درصد روی محیط کشت آب – آگار (WA) و یا سیب‌زمینی – دکستروز – آگار (PDA) اسیدی جدایه‌های متعلق به شبه جنس ریزوکتونیا جداسازی و کشت گردید. تشتک‌های پتری کشت داده شده در دمای ۲۵-۲۲ درجه سانتی‌گراد قرارداده شدند و پس از یک تا دو روز قارچ رشد یافته با مشخصات ریزوکتونیا با روش کشت نوک ریسه خالص‌سازی شد. جدایه‌های ریزوکتونیا روی

بذر سترون شده جو درون شیشه‌های مک‌کارتنی به مدت ۱۴ تا ۲۱ روز رشد داده پس از خشک‌کردن آن‌ها در دمای اتاق به مدت دو تا سه روز در دمای چهار تا هشت درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

بررسی خصوصیات جدایه‌ها

جدایه‌های قارچ از نظر مرفولوژی ،تولید یا عدم تولید اسکلروت مورد بررسی قرار گرفتند. جهت این بررسی از کشت خالص جدایه‌های منتخب دیسک‌های هشت میلی‌متری به محیط کشت PDA در تشتک‌های پتری نه سانتی‌متری منتقل و تشتک‌ها در دمای ۲۷- ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگه‌داری شدند (Kim et al.1994).

تعیین وضعیت هسته و قطر ریسه

جهت تشخیص جدایه‌های دو هسته‌ای از چند هسته‌ای، تعداد هسته در هر سلول درجدایه‌های مورد نظر بررسی شد. جهت شمارش تعداد هسته، ابتدا جدایه‌ها روی لام‌های استریل آغشته با WA دو درصد رشد داده شدند و پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت ریسه‌های رشد یافته با سافرانین قلیایی رنگ‌آمیزی شدند.

برای اندازه‌گیری قطر ریسه از کشت‌های جوان دو تا سه روزه که روی لام‌های استریل آغشته با WA دو درصد رشد کرده بودند، استفاده شد. پس از رنگ‌آمیزی لام با محلول رنگی اسید فوشین در بزرگنمایی ۴۰۰ برابر با استفاده از عدسی چشمی خط‌کش‌دار، قطر ۵۰ ریسه اندازه‌گیری شد و میانگین آن‌ها به عنوان قطر ریسه در نظر گرفته شد (Sneh et al.1991).

تعیین گروه‌های آناستوموزی

در تعیین گروه آناستوموزی، از روش جفت کردن هیف‌ها درون تشتک پتری حاوی WDA (Water Dextrose Agar) و تلاقی هیف‌های جدایه‌ها با گروه‌های آناستوموزی شاخص (tester) روی لام شیشه‌ای (Sneh et al. 1991) با استفاده‌از میکروسکوپ نوری اینورت استفاده شد. پیوند بین ریسه‌های متقابل با بزرگنمایی X ۴۰ و X۱۰۰ بررسی شد. برای یک واکنش مثبت، چهار تا پنج پیوند در نظر گرفته شد.

تعیین دمای بهینه رشد

برای این منظور از حاشیه کلنی‌های سه تا پنج روزه بلوک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر انتخاب و به محیط کشت PDA منتقل گردید. سپس ۲۴ ساعت قارچ در دمای اتاق نگه‌داری شد تا شروع به رشد نماید. بعداز ۲۴ ساعت به دمای موردنظر انتقال یافت تا در این فاصله زمانی قارچ در آن دما به حالت سازگاری برسد. پس از این مدت در حاشیه کلنی‌ها خط کشیده شد و مجدداً پس از ۲۴ ساعت فاصله این خط تا حاشیه جدید کلنی اندازه‌گیری شد. این اندازه‌گیری تا زمان

رسیدن حاشیه کلنی به دیواره تشتک پتری ادامه یافت. دماهای اصلی مورد استفاده در این مطالعه عبارت از: ۱۵، ۲۵،۲۰، ۳۰، ۳۷ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشند. اندازه‌گیری برای هر جدایه در هر دما چهار تکرار در نظر گرفته شد. در این آزمایش هشت جدایه به تصادف به عنوان جدایه‌های نماینده از بین گروه‌های آناستوموزی مختلف انتخاب شدند.

مطالعه تنوع بیماریزایی جدایه‌های بیمارگر در شرایط درون شیشه

قدرت بیماری‌زایی ۲۷ جدایه از *R.solani* AG-4، ۲۸ جدایه از *R.solani* AG -2 ، ۱۷ جدایه با گروه نامشخص (با گروه‌های استاندارد تعامل نکردند)، دو جدایه *R.solani* AG-3 و یک جدایه *R.solani* AG-5 در تشتک‌های پتری مطالعه شد. بیماری‌زایی جدایه‌های متعلق به گروه آناستوموزی دو، چهار و همچنین جدایه‌های با گروه آناستوموزی نامشخص هر کدام در یک آزمایش جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار مورد بررسی قرار گرفت. برای این کار، ابتدا جدایه‌ها روی میحط کشت PDA در دمای ۲۷–۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد یافته و از حاشیه فعال پرگنه قارچ قرص‌های هشت میلی‌متری به محیط WA منتقل شدند. دوازده ساعت پس از انتقال جدایه‌ها به محیط کشت WA، ده عدد بذر جوانه‌زده رقم رسول پیرامون دایره‌ای به شعاع سه سانتی‌متر اطراف پرگنه فعال قارچ در تشتک‌های پتری ده سانتی‌متری چیده و در دمای ۲۷–۲۵ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد. تعامل جدایه با گیاهچه‌های در حال رشد سه، پنج و هفت روز بعد از مایه‌زنی، مورد ارزیابی قرار گرفت. شدت بیماری روی هریک از گیاهچه‌ها براساس مقیاس کارلینگ و همکاران (Carling et al. 2002) با اصلاحات جزئی یادداشت‌برداری شد.

تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های نماینده حاصل‌از آزمایش درون شیشه

در این آزمایش، بیماریزایی سه جدایه *R.solani* AG-4 دو جدایه *R.solani* AG -2 و پنج جدایه با گروه آناستوموزی نامشخص (دو جدایه عامل شانکر پوسیدگی خشک و سه جدایه دو هسته‌ای) به عنوان نماینده کلاسترهای حاصل آزمایش‌های درون شیشه، در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با پنج تکرار تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی با یکدیگر مقایسه شد.

مطالعه تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های بیمارگر در شرایط گلخانه

تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب *R.solani* روی گیاهچه‌های چغندرقند

در این آزمایش ۱۱ جدایه *R.solani* شامل جدایه‌هایی با قدرت بیماری‌زایی بسیار بالا و پایین از گروه‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت، که چهار جدایه متعلق به گروه دو هسته‌ای‌ها (جدایه‌های ۱۲۰، ۱۴۱، ۲۴۴، ۱۹۹)، دو جدایه مربوط به گروه آناستوموزی چهار (جدایه‌های ۲۰۴ و ۲۱۸)، سه جدایه

از عوامل ایجاد شانکر پوسیدگی خشک (جدایه‌های ۱۳۵، ۱۳۲، ۱۲۷)، یک جدایه از گروه آناستوموزی دو (۱۱۴) و یـک جدایه هم از گروه آناستوموزی سه (۱۸۲) به همراه یک شاهد به عنوان ۱۲ تیمار آزمایش در نظر گرفته شدند. انتخاب جدایه‌ها براساس نتایج حاصل‌از آزمایش‌های درون شیشه صورت گرفت. در این آزمایش از روش لایه مایه قارچ جهت مایه‌زنی جدایه‌ها روی گیاه‌چه‌های چغندرقند استفاده شد. (Windels et al.1997) به گلدان‌های شاهد لایه آگار سترون اضافه شد. آزمایش با پنج تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. درصد مرگ و میر گیاهچه‌ها تا هفته چهارم بعد از کاشت یادداشت‌برداری شد.

مطالعه تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب *R.solani* روی گیاهان بالغ

جهت انجام این آزمایش از گیاهان بالغ (بیش از ۱۴ هفته) استفاده شد. نشاءها به گلدان‌های بزرگ پنج کیلویی منتقل و چند هفته پس از انتقال با چهار عدد بذر ذرت آلوده به جدایه‌های موردنظر، مایه‌زنی شدند. جهت تهیه مایه قارچ، ابتدا بذر ذرت دو مرتبه متـوالی به فـاصله ۲۴ سـاعت سترون شـد و جدایه مـوردنظر روی آن به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۷–۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد داده شد. بذرهای آلوده ذرت در عمـق سـه سـانتی‌متری خاک کنار ریشه قرار گرفتند. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار اجرا شد. میزان پوسیدگی ریشه هر بوته سه هفتـه بعداز مایه‌زنی با استفاده از مقیاس باتنر (Buttner et al. 2004) یادداشت‌برداری شد. در این مقیاس به بوته‌های سالم نمره یک و بوته‌های کاملاً پوسیده نمره ۹ داده شد.

نتایج

نحوه رشد جدایه‌ها درون تشتک‌های پتری حاوی PDA بیان‌گر تنوع مورفولوژیکی آن‌ها بود. با وجود این که اکثر جدایه‌ها در دمای محیط پس‌از چند روز تا چند ماه اسکلروت تولید کردند. اما برخی هم در این شرایط اسکلروتی تولید نکردند. در بین تمام جدایه‌های مورد مطالعه، چهار جدایه ۱۴۱، ۱۲۰، ۱۹۹، ۲۴۴ دو هسته‌ای و بقیه متعلق به گروه چند هسته‌ای‌ها بودند. رنگ این جدایه‌ها در مقایسه با جدایه‌های چند هسته‌ای روشنتر و ظاهر پنبه‌ای شکل داشتند. جدایه‌هایی که به عنوان نماینده از گروه چند هسته‌ای‌ها برای تعیین قطر ریسه مورد مطالعه قرار گرفتند در مقایسه با جدایه‌های دو هسته‌ای هیف‌های ضخیم‌تر و تیره‌تر داشتند. از تعداد ۷۹ جدایه مورد مطالعه، ۷۵ جدایه متعلق به گروه ریزوکتونیاهای چند هسته‌ای بودند که جهت تعیین گروه‌های آناستوموزی در تعامل با گروه‌های آناستوموزی استاندارد ۱۳ –۱ (جدایه‌های کلکسیون بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مؤسسه تحقیقات چغندر قند کرج) قرار گرفتند. نتایج به دست آمده در این بخش تعداد ۲۷ جدایه را در گروه آناستوموزی چهار (AG 4)، ۲۸ جدایه در گروه آناستوموزی دو (AG2)، دو جدایه را در گروه آناستوموزی سه (AG 3) و یک جدایه را در گروه آناستوموزی پنج (AG5) طبقه‌بندی کرد. سایر جدایه‌ها هم با هیچ‌یک از جدایه‌های شاخص (Tester) تعامل

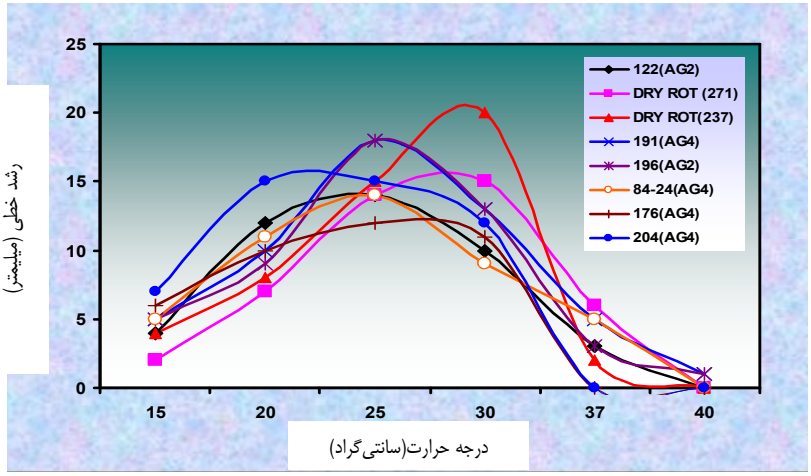
نداشتند. بیشترین فراوانی در بین گروه‌های آناستوموزی مربوط به گروه آناستوموزی دو بود. اکثر جدایه‌ها در دمای ۲۷–۲۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین میزان رشد را داشتند، در حالی‌که پنج جدایه عامل شانکر پوسیدگی خشک (Dry Rot Canker) بیشترین میزان رشد را در دمای ۳۰درجه سانتی‌گراد نشان دادند (شکل۱). با مطالعه بیماری‌زایی جدایه‌ها در شرایط درون شیشه مشخص شد که جدایه‌ها از نظر بیماری‌زایی با یکدیگر اختلاف فراوان دارند. تجزیه آماری داده‌ها توسط آزمون دانکن بر مبنای میزان بیماری‌زایی روی بذور جوانه‌زده چغندرقند در سه، پنج و هفت روز پس از مایه‌زنی صورت پذیرفت. نتایج حاصل از تجزیه مراحل مختلف یادداشت‌برداری نشان داد که جدایه‌های متعلق به AG-4 بر مبنای یادداشت‌برداری اول (سه روز بعداز مایه‌زنی) به ۱۰ گروه اما براساس یادداشت‌برداری دوم (پنج روز بعداز مایه‌زنی) در هفت گروه دسته‌بندی شدند(شکل ۲). در یادداشت‌برداری سوم (هفت روز بعد از مایه‌زنی) اکثر جدایه‌ها از نقطه‌نظر شدت بیماری مشابه هم بوده و در چهار سطح قرار گرفتند. تجزیه خوشه‌ای جدایه‌ها بر مبنای سه متغیر (میزان شدت بیماری در روز سوم، پنجم و هفتم بعداز مایه‌زنی) با استفاده‌از متوسط پیوستگی بین گروه‌ها(Average Linkage between groups) جدایه‌ها را به سه گروه بیماری‌زا، نسبتاً بیماری‌زا، بیماریزایی نسبتاً ضعیف دسته‌بندی کرد(شکل ۳) تجزیه میانگین شدت بیماری‌زایی با استفاده‌از آزمون دانکن در مراحل مختلف یادداشت‌بردرای، جدایه‌های AG-2 و AG-3 و AG-5 را در یادداشت‌برداری اول و دوم به چهار گروه و در یادداشت‌برداری سوم به شش گروه تقسیم کرد (شکل ۴). تجربه خوشه‌ای این جدایه‌ها را بر مبنای سه متغیر (میزان شدت بیماری در روز سوم، پنجم و هفتم بعداز مایه‌زنی) به چهار گروه تقسیم کرد (شکل ۵). جدایه‌های AG-3 و AG-5 (۲۳۴،۱۸۲،۱۸۰) به عنوان گروه با بیماری‌زایی خیلی ضعیف نیز در یک رده قرار گرفتند (شکل ۵).

آزمون دانکن جدایه‌هایی که گروه آناستوموزی آن‌ها مشخص نبود را، به همراه جدایه‌های دو هسته‌ای بر مبنای سه متغیر در هفت گروه دسته‌بندی کرد. جدایه ۲۵۶ بیماری‌زاترین آن‌ها و جدایه ۱۹۹ Rh به عنوان جدایه غیربیماری‌زای این جدایه‌ها مشخص گردید. تجزیه خوشه‌ای این گروه از جدایه‌ها را به چهار دسته، جدایه‌های شدیداً بیماری‌زا، با بیماری‌زایی متوسط، بیماری‌زایی ضعیف و غیربیماری‌زا تقسیم‌بندی کرد (شکل ۶). اکثر جدایه‌های این گروه قدرت بیماری‌زایی پایینی داشتند.

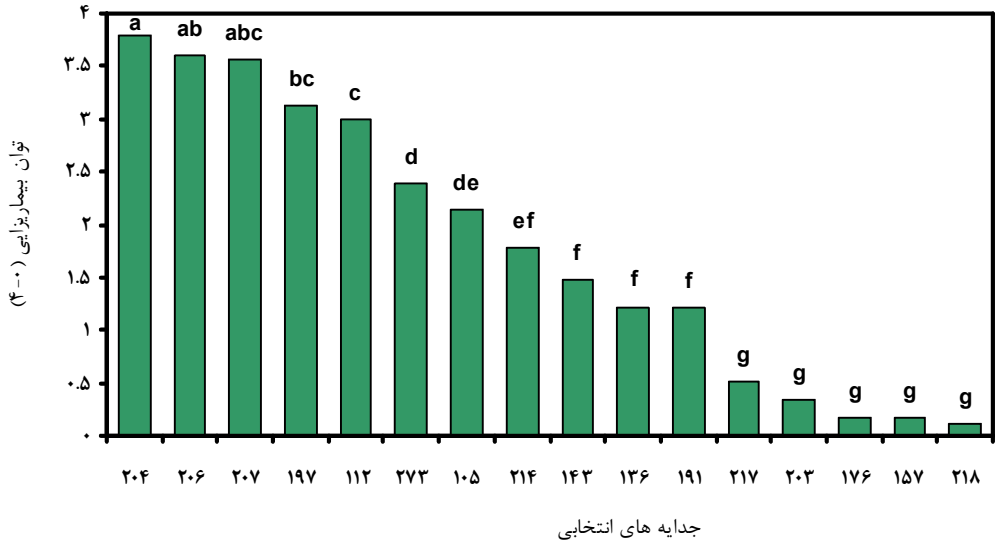
مقایسه قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های نماینده از گروه آناستوموزی دو، چهار و جدایه‌های با گروه آناستوموزی نامشخص و همچنین جدایه‌های دو هسته‌ای در شرایط درون شیشه مبین تشابه نتایج با آزمون گروه‌های آناستوموزی که به‌صورت جداگانه انجام شده بود، می‌باشد. تجزیه خوشه‌ای نتایج بیماری‌زایی، این جدایه‌ها را در پنج گروه دسته‌بندی کرد. (شکل ۷) جدایه ۲۰۴ که در آزمایشات قبل هم بیماری‌زایی بالایی داشت، در این آزمایش نیز در روز چهارم پس از مایه‌زنی به بالاترین میزان خود، یعنی چهار رسید درحالی که جدایه ۱۷۶ که از گروه جدایه‌های با بیماری‌زایی خیلی کم انتخاب شده بود، در همین روز به میزان ۰/۳ (سه دهم) بود.

باتوجه به میزان مرگ و میر گیاهچه روی رقم حساس رسول ناشی‌از مایه‌زنی با ۱۱ جدایه مورد بررسی که به روش دانکن تجربه گردیده بود، مشخص شد که جدایه ۲۰۴ (گروه AG-4) با بیشترین درصد مرگ گیاهچه در یک گروه و جدایه ۱۲۰ (ازگروه ناشناخته‌ها) و جدایه ۱۹۹ (دوهسته‌ای) به عنوان ضعیف‌ترین جدایه‌ها در گروه به شاهد قرار گرفتند (شکل ۸).

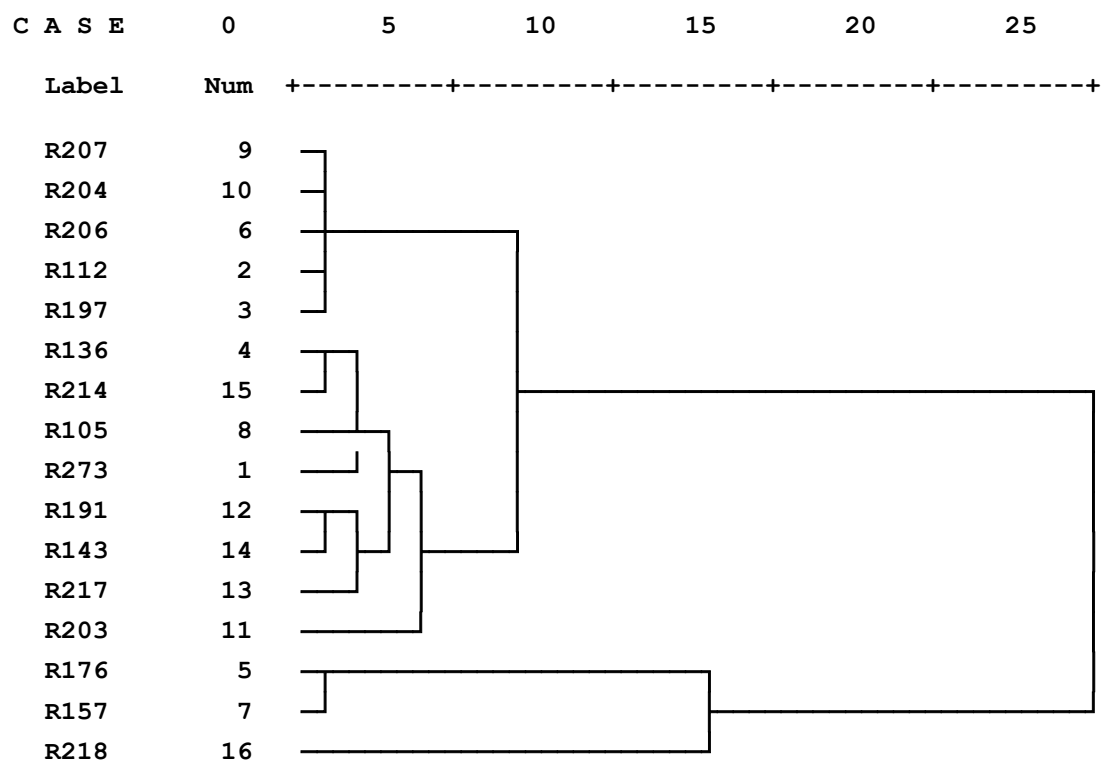
تنوع در بیماری‌زایی ۱۱ جدایه منتخب روی گیاهان بالغ چغندرقند در شرایط گلخانه، که به روش دانکن تجزیه شده، جدایه‌ها را در شش سطح مجزا دسته‌بندی کرد. جدایه (Rh114) گروه AG-2 به عنوان قوی‌ترین جدایه با میانگین شدت بیماری ۷/۳۷۵ در مقیاس ۹-۱ در یک سطح و جدایه Rh141 در سطح دوم قرار گرفت. جدایه‌های دو هسته‌ای Rh244, 120, 199 به عنوان غیربیماری‌زا در گروه دیگر قرار گرفتند. در بین جدایه‌های چند هسته‌ای جدایه Rh182 (گروه AG-3) با شدت بیماری‌زایی ۱/۳ کم‌ترین قدرت بیماری‌زایی را از خود نشان داد (شکل ۹).



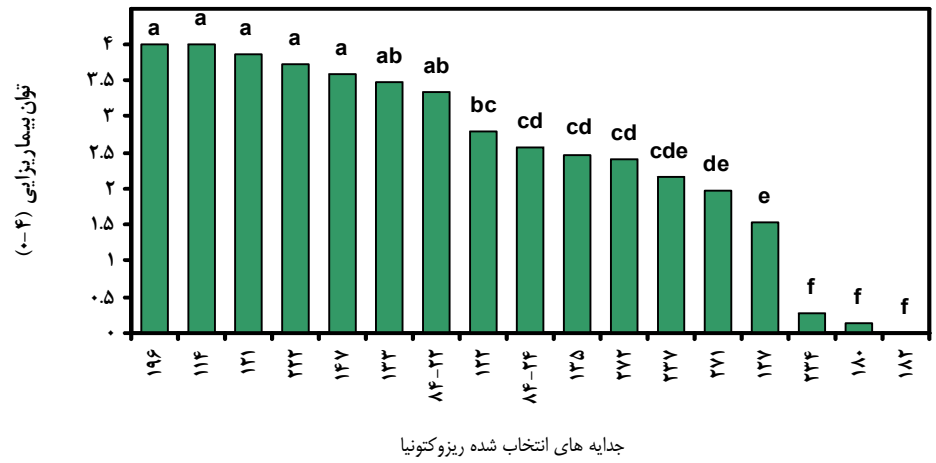
شکل ۱ میزان رشد خطی جدایه‌های ریزوکتونیا در دماهای مختلف



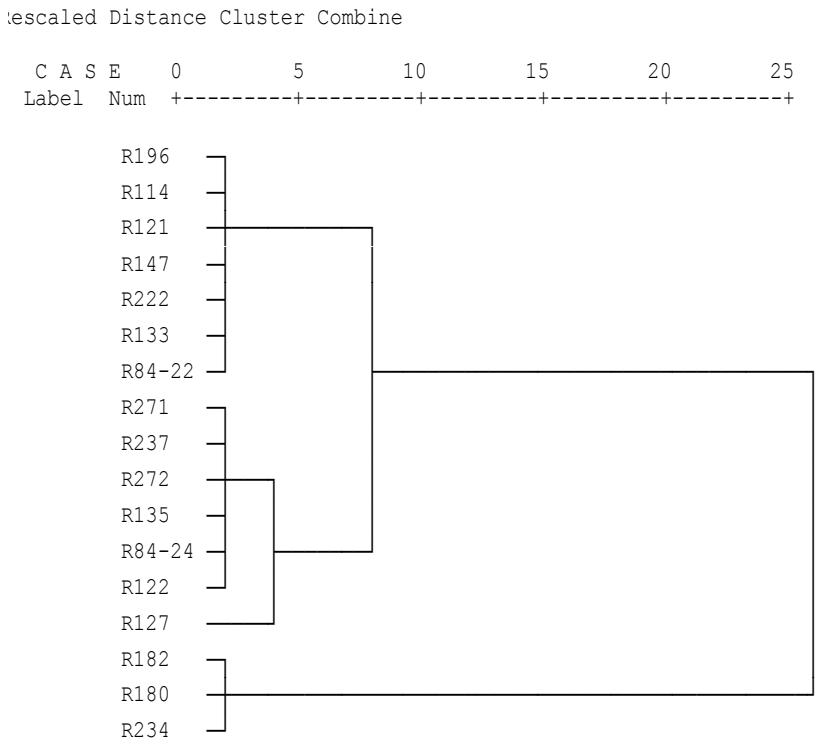
شکل ۲ شدت بیماریزایی جدایه‌های AG-4 روی رقم رسول در شرایط درون شیشه (میانگین‌های دارای حروف مختلف با هم اختلاف معنی‌دار آماری دارند)



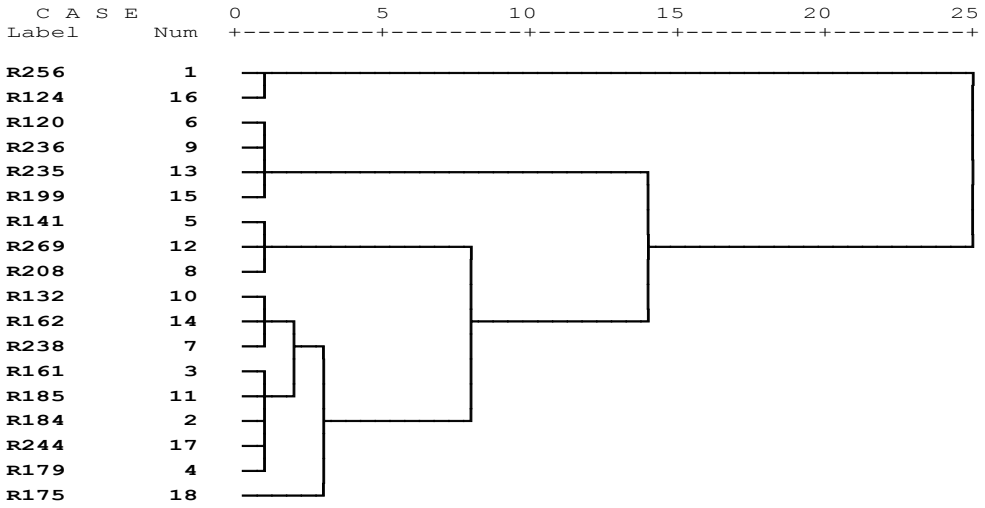
شکل۳ تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های*Rhizoctonia solani* AG-4 بر مبنای شدت بیماری ۳، ۵ و ۷ روز بعد از مایه‌زنی (مقیاس ۰–۴) روی چغندرقند رقم رسول در شرایط درون شیشه



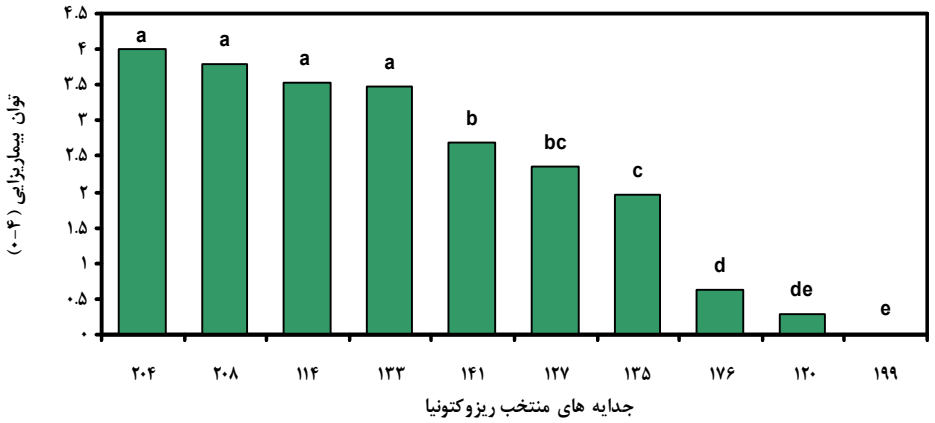
شکل ٤ شدت بیماری‌زایی جدایه‌های AG-2- 3-5 روی رقم رسول در شرایط درون شیشه



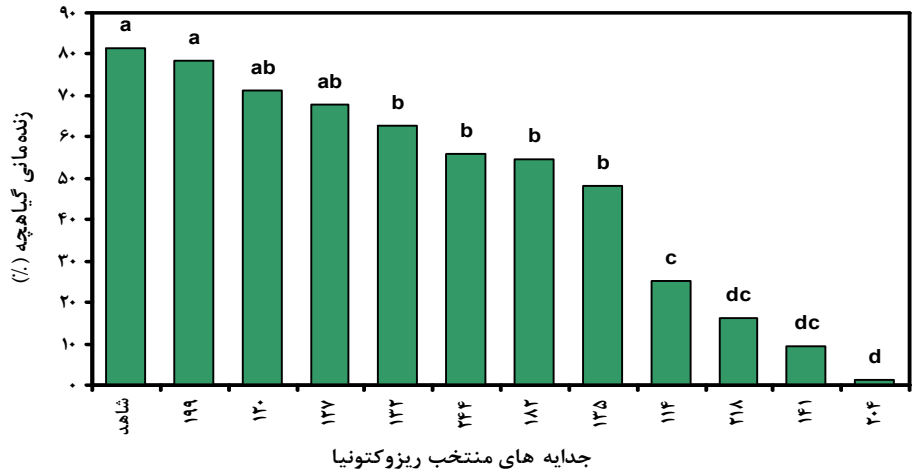
شکل۵ تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های(AG-2, 3, 5) *R. solani* برمنبای شدت بیماری ۳ و ۵ و ۷ روز بعد از مایه‌زنی (مقیاس ۰-۴) روی چغندرقند رقم رسول در شرایط درون شیشه



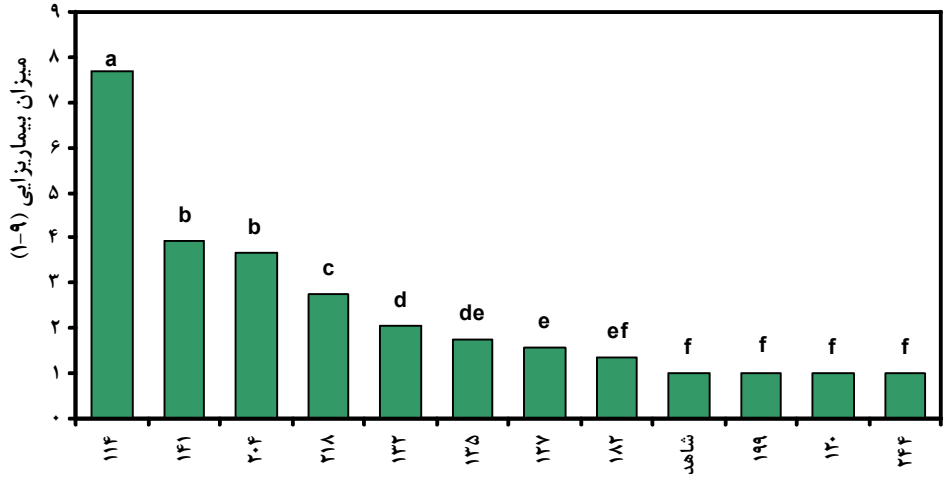
شکل٦ تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های *R. solani* با گروه آناستوموزی نامشخص و جدایه‌های دوهسته‌ای بر مبنای شدت بیماری ۳، ۵ و ۷ روز بعداز مایه‌زنی(مقیاس ۰-۴) روی چغندرقند رقم رسول در شرایط درون شیشه



شکل۷ شدت بیماری‌زایی جدایه‌های نماینده گروه‌های آناستوموزی مختلف روی رقم رسول در شرایط درون شیشه (میانگین‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار آماری دارند)



شکل ۸ درصد زنده‌مانی گیاهچه‌های چغندرقند رقم رسول ناشی‌از مایه‌زنی با جدایه‌های منتخب ربزوکتونیاهای گروه‌های آنا ستوموزی مختلف (میانگین‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار آماری دارند)



شکل ۹ شدت بیماریزایی جدایه‌های *R.solani* AG-2 روی رقم رسول در شرایط درون شیشه (میانگین‌های دارای حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار آماری دارند)

بحث

براساس نتایج به دست آمده تنوع گروه‌های آناستوموزی جدا شده از چغندرقند به گروه‌های آناستوموزی دو، سه، چهار و پنج و چند جدایه دو هسته‌ای محدود شد. در بین آن‌ها، جدایه‌های متعلق به گروه‌های آناستوموزی دو و چهار از فراوانی و قدرت بیماری‌زایی بیشتری در قیاس با سایر گروه‌های آناستوموزی جدا شده، برخوردار بودند. در سایر مناطق چغندرکاری دنیا با شرایط آب و هوایی نسبتاً مشابه ایران نیز، گروه‌های آناستوموزی دو و چهار اهمیت بیشتری داشتند (Winedls and Nabben 1989; Rush et al. 1994). در این بررسی پنج جدایه از علائم شانکر پوسیدگی خشک از استان‌های خراسان و لرستان جداسازی شد. این جدایه‌ها با هیچ‌کدام از گروه‌های آناستوموزی واکنش ندادند. دمای بهینه رشد آن‌ها قدری بیشتر (بالای ۳۰ درجه سانتی‌گراد) از جدایه‌های متعلق به گروه‌های آناستوموزی دو و چهار بود. شانکر پوسیدگی خشک (Dry rot canker) نمونه‌ای از پوسیدگی ریشه است که توسط ریچارد در سال ۱۹۲۱ در آمریکا گزارش شده است. جدایه‌های عامل شانکر پوسیدگی خشک با جدایه‌های عامل پوسیدگی ریشه و طوقه تفاوت دارند (Whitney and Duffus 1986). شانکر پوسیدگی خشک در درجه حرارت‌های بالاتر (۳۵- ۳۰ درجه سانتی‌گراد) و رطوبت کمتر خاک آلودگی بیشتری ایجاد می‌نماید (Whitney and Duffus 1986). طبق گزارشات مختلف چندین گونه از قارچ‌ها عامل بیماری‌زای ریشه و طوقه چغندرقند در کشور می‌باشند (ارشاد ۱۳۷۴؛ عباسی‌مقدم و همکاران، ۱۳۷۷). از آن‌جایی که نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش از مزارع چغندرقند مناطق عمده چغندرکاری کشور جمع‌آوری شده است احتمال این که اکثر مناطق چغندرقند کاری کشور تحت تأثیر این بیمارگر باشد شدت می‌یابد. باتوجه به این احتمال تلاش در زمینه شناخت هرچه بیشتر این بیمارگر و دستیابی به روش‌های مؤثر مدیریت آن اهمیت ویژه‌ای دارد. در این تحقیق نیز تلاش بر این بود که اطلاعات موردنیاز در مورد ساختار کلی جمعیت این بیمارگر نظیر تنوع ریخت‌شناسی و ژنتیکی و هم چنین بیماری‌زایی در مناطق مختلف زیر کشت این محصول در کشور جمع‌آوری و ارائه شود تا به کمک متخصصین اصلاح نباتات به توان در زمینه تهیه ارقام مقاوم جهت مدیریت و کنترل این بیمارگر خاکزاد گامی مؤثر برداشته شود. نتایجی که در این تحقیق به‌دست آمد تنوع بالایی در بیماری‌زایی جدایه‌ها *R. solani* جدا شده از چغندرقند را که متعلق به گروه‌های آناستوموزی مختلف بودند نشان داد. آن‌چه ازنتایج این قسمت استنباط شد این است که تنوع در بیماری‌زایی جدایه‌های گروه آناستوموزی چهار (AG-4) خیلی بیشتر از گروه آناستوموزی دو (AG-2) می‌باشد. جدایه ۲۰۴ در سه روز پس از مایه‌زنی و ۲۰۶ پنج روز بعد به حداکثر میزان بیماری‌زایی خود رسیدند، اما جدایه‌های ۲۱۸ و ۱۷۶ تا هفت روز پس از مایه‌زنی هم نتوانستند علائم بیماری را روی گیاهچه‌ها نشان دهند. جدایه‌های با

گروه آناستوموزی نامشخص در بیماری‌زایی خود تقریباً وضعیت مشابهی داشتند. اکثر این جدایه‌ها تا روز هفتم علائم ضعیفی روی گیاهچه‌ها ایجاد کردند. اکثر جدایه‌های مربوط به گروه آناستوموزی دو (AG-2) با وجود این که تا هفت روز پس از تعامل با گیاهچه‌های چغندرقند نتوانستند به حداکثر شدت بیماری‌زایی دست یابند، اما برخلاف جدایه‌های (AG-4) عملکرد متعادل‌تری نشان دادند. جدایه‌هایی که با این روش در رده‌های مختلف از لحاظ بیماری‌زایی دسته‌بندی شده بودند، در آزمایشی دیگر نیز با یکدیگر مقایسه شدند. بدین ترتیب بیماری‌زایی جدایه‌های نماینده گروه‌های مختلف آناستوموزی و جدایه‌های با گروه آناستوموزی نامشخص تا ده روز پس از تعامل بررسی شدند. در این بررسی مشخص گردید جدایه ۲۰۴ از گروه آناستوموزی چهار (AG-4) بیشترین شدت بیماری‌زایی و جدایه ۱۷۹ نیز از گروه آناستوموزی چهار کم‌ترین میزان بیماری‌زایی را داشت در حالی‌که سایر جـدایه‌های AG-2 و جدایه‌های گروه آناستوموزی نامشخص با مقداری اختلاف در رده‌های بعدی قرار گرفتند. در بررسی بیماری‌ایی جدایه‌های منتخب در مرحله گیاه‌چه و در شرایط گلخانه، نیز بیشترین میزان تلفات گیاه‌چه در تعامل با جدایه ۲۰۴ از گروه آناستوموزی (AG-4) اتفاق افتاد و جدایه‌های متعلق به AG-2 نسبت به جدایه‌های AG-4 بیماری‌زایی کمتری داشتند و ضعیف‌ترین جدایه چند هسته‌ای در این بررسی جدایه ۱۲۷ از جدایه‌های با گروه آناستوموزی نامشخص بود که عملکردی شبیه شاهد داشت. نتایج این قسمت همخوانی قابل‌ملاحظه‌ای با آزمایشات درون شیشه داشت و به عبارتی دیگر جدایه‌های AG-4 که بیشترین بیماریزایی را روی بذور جوانه‌زده چغندرقند داشتند، روی گیاهچه‌های چغندر در شرایط گلخانه نیز بیماری‌زایی بیشتری از سایر جدایه‌ها داشتند. نتایج به‌دست آمده در این بخش با نتایج مطالعات محمودی و همکاران (۱۳۸۳) نیز مطابقت داشت. در ادامه این بررسی‌ها و مطالعه تنوع بیماری‌زایی جدایه روی گیاهان بالغ چغندرقند در شرایط گلخانه جدایه Rh114 از گروه آناستوموزی دو (AG-2)، بیشترین شدت بیماری‌زایی و پس از آن جدایه Rh204 از گروه آناستوموزی چهار و در نهایت جدایه Rh127 به عنوان ضعیف ترین جدایه مشخص گردید. نتایج این قسمت ضمن تأیید نتایج آزمایش درون شیشه بیان‌گر این مسئله می‌باشد که جدایه‌های گروه آناسـتوموزی دو (AG-2) بیماری‌زایی بیشتری روی گیاهان بالغ چغندرقند داشته و خسارات بیشتری وارد می‌کنند. تنوع در بیمارزایی به لحاظ تأثیری که بر پایداری مقاومت دارد نیز مهم جلوه می‌کند و در بسیاری‌از موارد شکسته شدن مقاومت برخی از ارقام را به دلیل ایجاد تنوع در بیماری‌زایی بیمارگر می‌دانند (Peever et al. 2000). بیمارگری نظیر ریزوکتونیا و همچنین برخی بیمارگرهای دیگر که خاکزاد بوده روش‌های مدیریتی متفاوتی از سایر بیمارگرها را می‌طلبند که به دلیل ناکارآمدی روش‌های کنترل شیمیایی استفاده‌از ارقام مقاوم در تلفیق با روش‌های زراعی دیگر، شیوه مؤثر کاهش خسارت ناشی از این‌گونه بیمارگرها می‌باشد. به

همین دلیل برای دسترسی به مقاومتی پایدار باید آگاهی کافی از ژنتیک بیمارگر و تعامل آن با میزبان داشت. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق به نظر می‌رسد خسارت گروه آناستوموزی دو (AG-2) روی محصول چغندرقند بیشتر و بنابر این لازم است جهت مدیریت این بیمارگر مطالعات بر روی گروه آناستوموزی دو AG-2 *R .solani* معطوف شود.

منابع مورد استفاده: References:

ارشاد، ج. ۱۳۷۴. قارچ‌های ایران. سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ۸۶۱ صفحه.

عباسی‌مقدم، ا. فلاحتی‌رستگار، م و جعفرپور، ب. ۱۳۷۷. اتیولوژی پوسیدگی طوقه و ریشه چغندرقند در استان خراسان. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، اصفهان، صفحه ۱۲۵.

صفایی، ن و میناسیان، و. ۱۳۷۵. تعیین گروه آناستوموزی ریزوکتونیای عامل مرگ گیاهچه چغندرقند در خوزستان. مجله بیماری‌های گیاهی، ۳۲: ۴۳-۴۲

محمودی، س.ب. مصباح، م و علیزاده، ع.ا. ۱۳۸۳.تنوع در بیماری‌زایی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* چغندرقند. مجله بیماری‌های گیاهی جلد ۴۰ شماره‌های ۳ و ۴ صفحه: ۲۵۳-۲۸۰

.

Buttner G, Pfahler B, Marlande B (2004) Greenhouse and field techniques for testing sugar beet for resistance to Rhizoctonia root and crown rot. Plant Breeding, 123: 158-166

Carling DE, Kuninaga S, Brainard A (2002) Hyphal anastomosis reactions, rDNA- internal transcribed spacer sequences, and virulence levels among subsets of Rhizoctonia solani anastomosis group- 2 (AG- 2) and AG-BI. Phytopathology, 92: 43-50

Cook DA, Scott RK (1993) The Sugar Beet Crop: Science into Practice. Champan and Hall, New York. 675pp

Hecker RJ, Ruppel EG (1977) *Rhizoctonia* root rot resistance in sugar beet: breeding and related research. Journal of the American Society of Sugar Beet Technologists, 19: 246-256

Herr LJ (1996) Sugarbeet diseases incited by Rhizoctonia species. In: Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control, eds. Sneh, B.,

Jabaji-Hare, S., Neate,S. and Dijst, G., pp. 341-350. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht

Kim W, Cho W, Lee Y (1994) Anastomosis groups and cultural characteristics of *Rhizoctonia solani* from crops in Korea. The Korean Journal of Mycology, 22:309-324

Moore RT (1996) The dolipore/parenthesome septum in modern taxonomy. . In: Rhizoctonia species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control, eds. Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate,S. and Dijst, G., pp.13-35. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht

Mordue JE, Curran RS, Bridge PD (1989) An integrated approach to Rhizoctonia taxonomy: cultural, biochemical and numerical techniques. Mycological Research, 92: 78-910

Naito S (1984) Studies on foliage blight of sugar beets. Hokkaido. Nat. Agr. Exp. Sta. Res. Bul. 139: 145-188

Peever TL, Zeigler RS, Dorrance AE, Correa-Victoria FJ, Martin SS (2000) Pathogen population genetics and breeding for resistance. APSnet feature. www.apsnet.org

Rush CM, Carling DE, Harveson, RM, Mathieson JT (1994) Prevalence and pathogenicity of anastomosis groups of of Rhizoctonia solani from wheat and sugar beet in Texas. Plant Disease, 78: 349-352

Sneh B, Burpee LL, Ogosh A (1991) Identification of Rhizoctonia Species. APS Press. St. Paul.Minnesota, USA

Uchino H, Ogoshi A, Kanzawa K (1983). Anastomosis groups of binucleate Rhizoctonia isolated from diseased sugar beet seedlings and their pathogenicity. Memoris of the Faculty of Agriculture Hokkaido University, 13: 14

Vilgalys R, Cubeta MA (1994) Molecular systematics and population biology of Rhizoctonia. Ann. Rev. Phytopathol., 32: 135- 155.

Whitney ED, Duffus JE (1986) Compendium of Beet Diseases and Insects. APS Press, St. Paul. USA

Windels CE, Kuzina RA, Call J (1997). Characterization and pathogenicity of *Thanatephorus cucumeris* from sugarbeet in Minnesota. Plant Disease, 81: 245- 249.

Windels CE, Nabben DJ (1989) Characterization and pathogenicity of anastomosis groups of Rhizoctonia solani isolated from Beta vulgaris. Phytopathology, 79: 83-88