فصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال اول، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۲
صص ۳۵-۲۷

بررسی بیماری‌زایی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* عامل پوسیدگی طوقه و ریشه کدوئیان در ایران

سید مهیار میرمجلسی*[۱]، ناصر صفائی [۲]، حسین اهری مصطفوی [۳]، سید باقر محمودی [۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۹/۲۶

چکیده

یکی از بیماری های مهمی که در سراسر دنیا خسارت زیادی به کدوئیان وارد می سازد، مرگ گیاهچه و پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از *Rhizoctonia solani* می باشد. در بازدید از مزارع و گلخانه ها در طی فصول زراعی ۱۳۸۵-۱۳۸۴، نمونه های گیاهی مشکوک به آلودگی ریزوکتونیایی از مناطق مختلف استان های تهران، مازندران، خوزستان و اصفهان، از میزبان های خیار، کدو، هندوانه و خربزه جمع آوری، جداسازی و خالص سازی گردید. در این مطالعه ۵۹ جدایه *R. solani* از خاک، طوقه و ریشه گیاهان مذکور مورد بررسی قرار گرفت. قطر ریسه جدایه ها از ۴/۴۶ تا ۶/۸۶ میکرومتر متغیر بود و تمامی جدایه ها، چند هسته ای بودند. بررسی گروه آناستوموزی جدایه ها نشان داد که ۸۱ درصد جدایه ها متعلق به AG4 می باشند. سایر جدایه ها با هیچ یک از گروه های آناستوموزی استاندارد مورد مطالعه (AG2 و AG7) آناستوموز ندادند. نتایج حاصل از آزمون بیماری زایی نشان داد که نهایتا از مجموع ۵۹ جدایه بدست آمده، ۹۷ درصد جدایه ها بیماری زا بودند، که این جدایه ها بر اساس درصد بیماری زایی 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 هیچ گونه علائمی را بر روی طوقه یا ریشه میزبان های خودشان ایجاد نکردند، این احتمال می رود که جزو جدایه های غیربیماری زا باشند. در این مطالعه گروه آناسنوموزی چهار، برای اولین بار در ایران از روی میزبان کدو گزارش گردید.

واژه های کلیدی: پوسیدگی طوقه و ریشه، آزمون بیماری زایی، کدوئیان، AG4، *Rhizoctonia solani*.

۱- پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، پژوهشکده تحقیقات کشاورزی، پزشکی و صنعتی، کرج.
۲- گروه بیماری شناسی 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 قارچ ها می باشد که توسط دکاندول، قارچ شناس بزرگ فرانسوی در سال ۱۸۱۵ معرفی گردید(Ogoshi 1996). گونه‌های بسیاری از این جنس با مشخصات بیماری زایی، ریخت شناسی و فیزیولوژیکی متفاوت، از گیاهان مختلف و خاک جدا شده اند(Carling and Sumner 1992). به دلیل اهمیت قارچ ریزوکتونیا به عنوان یک بیمارگر گیاهی، روش های دقیق و مناسبی برای شناسایی گروه های موجود در *Rhizoctonia* spp. توسعه یافته است که از آن جمله می توان به اطلاعات مربوط به رفتار آناستوموزی و زیست‌شناسی مولکولی این قارچ اشاره کرد (Vilgalys and Gonzalez 1990). به دلیل پیچیدگی تاکسونومیکی و تنوع فنوتیپی بالا، جدایه های این قارچ از جنبه های 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 جدایه های *Rhizoctonia* spp. بر اساس واکنش های ریسه ای، معیاری بسیار مفید در مطالعه گونه های ریزوکتونیا برای بیماری شناسان گیاهی بوده که از سال ۱۹۶۵ آغاز شد (Anderson 1982). گروه های آناستوموزی به منزله گروه های ژنتیکی *R. solani* J.G. Kühn 1858 محسوب شده و هر گروه آناستوموزی قادر است میزبان های خاصی را آلوده کند (Zamani et al. 1989). وجود گروه های آناستوموزی مختلف در *R. solani* بیانگر جدایی ژنتیکی جمعیت های هر گروه است. بنابراین می توان گفت که گروه بندی آناستوموزی هنوز هم مهمترین پیشرفت در ارتباط با تنوع ژنتیکی در ریزوکتونیا می باشد (Cubeta and Vilgalys 1997). برای تشخیص گروه های آناستوموزی روش های متفاوتی وجود دارد که یکی از معمول ترین روش ها، پیوند ریسه می باشد (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، گل حنا، پنیرک، گل ناز، بادمجان، شاه پسند، کنار، ذرت و پریوش (Safaei et al.1996) گزارش شده است.

در این بررسی، ضمن مطالعه بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه کدوئیان، جدایه بیماری زا و گروه آناستوموزی جدایه های *Rhizoctonia solani* بدست آمده از استان های اصفهان، تهران، مازندران و خوزستان بر اساس معیارهای تاکسونومیکی مطالعه گردید. همچنین، درصد شیوع بیماری این جدایه ها و برهمکنش جدایه-میزبان نیز در استان های مذکور مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها:

نمونه برداری، جداسازی و خالص سازی عامل بیماری

نمونه برداری طی فصول زراعی ۱۳۸۶-۱۳۸۴، از مناطق مختلف استان های تهران، اصفهان، مازندران و خوزستان انجام گردید. نمونه های گیاهی مشکوک به آلودگی ریزوکتونیایی پس از جمع آوری، در کیسه های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل گردیدند و بلافاصله مورد بررسی قرار گرفتند. پس از شستشوی بافت‌های آلوده گیاه در زیر جریان ملایم آب، ریشه های 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، بافت های ضدعفونی شده قطعه قطعه شده و به تشتک های پتری محتوی محیط کشت آب-آگار (WA) ۱/۵ درصد حاوی ۲۵۰ میلی گرم در لیتر کلرامفنیکل انتقال داده شدند. تشتک ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شده و پس از ۱۲ تا ۴۸ ساعت، ریسه های شبیه ریزوکتونیا شناسایی و پس از خالص سازی به روش نوک ریسه (Sneh et al. 1991)، به محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار (PDA) منتقل گردیدند.

تشخیص عامل بیماری

برای تعیین قطر ریسه، 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 لام ها در داخل تشتک های استریل حاوی آب مقطر استریل روی میله شیشه ای قرار گرفتند و بعد از رشد قارچ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، با افزودن یک قطره لاکتوفنل حاوی پنج درصد آنیلین بلو، هسته ها رنگ آمیزی شدند. برای بررسی خصوصیات مورفولوژیک (ریسه 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 ریسه ها با اندازه گیری ۳۰ ریسه از هر جدایه، به کمک میکرومتر چشمی تعیین گردید.

تعیین گروه های آناستوموزی

برای تعیین گروه های 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 لام ها در داخل تشتک های پتری محتوی مقداری آب مقطر بر روی یک جفت میله شیشه ای، به وسیله پیپت یک لایه نازک آب-آگار ۱/۵ درصد بر روی لام ها ریخته شد. پس از انعقاد لایه نازک، قرص های چهار میلی متری از حاشیه فعال پرگنه های چهار روزه جدایه های ناشناخته و جدایه های استاندارد آزمون کننده از گروه های آناستوموزی دو، چهار و هفت که به مدت چهار روز بر روی محیط PDA رشد کرده بودند، بر روی لام ها به فاصله دو سانتی متری از هم قرار گرفتند. سپس تشتک ها 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 ریسه‌های متقابل به هم رسیدند، با قرار دادن یک قطره لاکتوفنل حاوی پنج درصد آنیلین بلو در محل تلاقی، ریسه ها رنگ آمیزی شدند، و پیوند بین ریسه های متقابل با بزرگنمائی 400X میکروسکوپ نوری، مورد بررسی قرار گرفت. در روش دوم که روش اسلاید تمییز نامیده می شود، ابتدا لام ها را با الکل ۹۶ درصد تمیز کرده و سپس در داخل تشتک های پتری محتوی مقداری آب مقطر برروی یک جفت لوله شیشه ای قرار داده شدند. برای هر جدایه، یک قرص چهار میلی متری از حاشیه فعال پرگنه چهار روزه، از جدایه ناشناخته و جدایه استاندارد آزمون کننده از گروه های آناستوموزی مختلف به فاصله دو سانتی متری از هم روی لام قرار داده شدند. سپس تشتک ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ تا ۳۶ ساعت نگهداری شدند، که بعد از این مدت، مرتبا به فاصله هر دو ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. پس از رسیدن ریسه های دو قرص به همدیگر، لام را از تشتک خارج کرده و با قرار دادن یک قطره لاکتوفنول حاوی پنج درصد آنیلین بلو در محل تلاقی، ریسه ها رنگ آمیزی شدند و پیوند بین ریسه های متقابل با بزرگنمائی 400X میکروسکوپ نوری، مورد بررسی قرار گرفت. برای هر جدایه آزمایش ها 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 دانه های گندم کلونیزه شده توسط جدایه ها انجام گردید. برای خاک گلدان ها از پرلیت، خاک و خاک برگ استریل استفاده شد که به ترتیب با نسبت ۱:۱:۱ مخلوط شدند. بعداز ضدعفونی سطحی بذر ها، داخل گلدان ها قرار داده شدند و روی آنها به ضخامت یک سانتی متر از همان خاک ریخته شد. بعداز اینکه گیاهچه ها به مرحله سه تا چهار برگچه ای رسیدند، خاک پای گیاهچه ها کنار زده شد، به طوریکه ریشه نمایان گردید. سپس سه عدد از گندم های کلونیزه شده توسط قارچ در پای هر گیاهچه قرار داده و خاک مجددا 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)، برروی میزبانی که از آن جداسازی شده بود، مایه زنی شدند. تا ظهور علائم، گلدان ها در دمای ۲۵ تا ۲۷ درجه سلسیوس در گلخانه نگهداری شدند. برای بررسی شدت بیماری زایی جدایه ها از روش امتیازدهی (۵-۰) استفاده گردید، امتیاز های مذکور سپس به درصد تبدیل شد (Mathew and Gupta 1996). پس

از ظهور علائم، بافت های آلوده برروی محیط کشت آب-آگار کشت داده شدند و عامل بیماری مجدداً جداسازی و شناسایی گردید. آزمایش در قالب طرح کاملا 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 جدایه های بدست آمده از مناطق و میزبان های مختلف از لحاظ بیماری زایی، از نرم افزار MVSP 32، روش UPGMA با ضریب اقلیدسی استفاده شد.

بررسی برهمکنش جدایه-میزبان

به منظور بررسی اثر بیماری زایی جدایه های بیماری زای *R. solani* AG4 بر روی سایر میزبان های 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، برروی هر پنج میزبان مایه زنی گردید. لازم به ذکر می باشد که نحوه آماده سازی مایه تلقیح، کشت گیاهان میزبان، مایه زنی و شرایط نگهداری در گلخانه مشابه آزمایشات گلخانه ای 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.

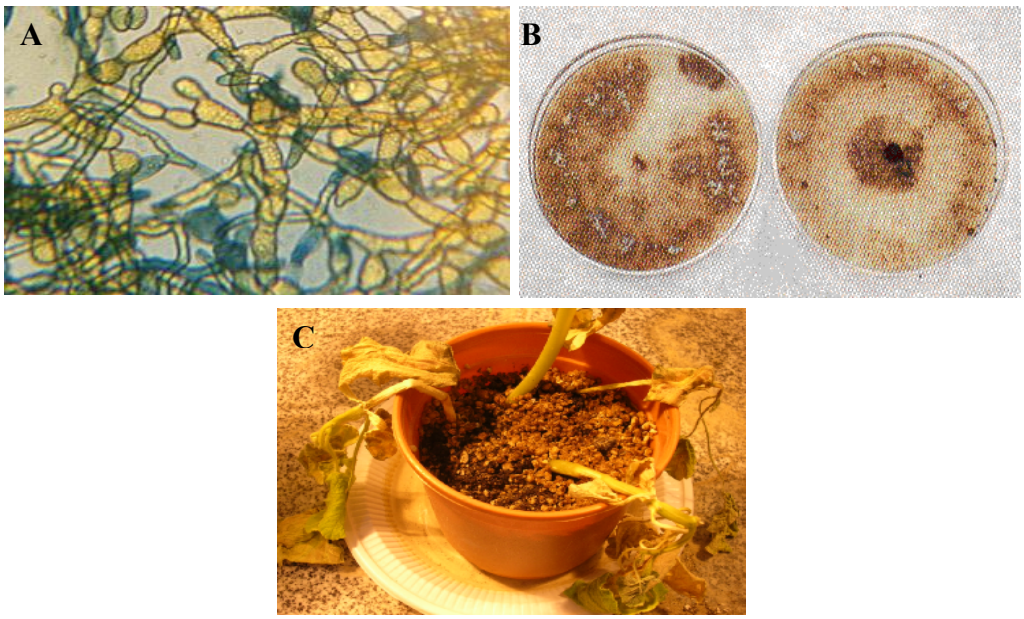
نتیجه

از ۵۹ نمونه مشکوک به آلودگی ریزوکتونیایی، در تمام موارد قارچی با مشخصات ریسه *Rhizoctonia* جداسازی گردید. مشخصات ریسه شامل انشعابات عمودی، فرو رفتگی در محل انشعاب و دیواره عرضی بشکه ای 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 جدایه ها 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 ریسه ها، برای مشخص شدن تعداد هسته در سلول ریسه، نشان داد که تمامی جدایه ها متعلق به گروه ریزوکتونیا های چند هسته ای می باشند. همچنین، بعضی از جدایه ها تولید سلول های تسبیحی (ناشی از تورم سلول‌های ریسه) نمودند و از اجتماع این سلول‌ها اسکلروت تشکیل شد. اسکلروت‌ها به رنگ قهوه‌ای نسبتاً تیره بودند که در زیر در تشتک یا سطح محیط کشت تشکیل شدند (شکل ۱-A,B). همچنین قطر متوسط ریسه جدایه ها از ۴/۴۶ تا ۶/۸۶ میکرومتر متغیر بود (جدول ۱). بر این اساس تمام جدایه های به دست آمده متعلق به *R. solani* بود. نتایج حاصل از آزمون تعیین گروه آناستوموزی در روش کشت متقابل جدایه های نامعلوم با جدایه های استاندارد نشان داد که ۸۱ درصد جدایه ها به گروه آناستوموزی چهار تعلق دارند. جدایه هایی که با AG4 آناستوموز ندادند، با سایر گروه های آناستوموزی مورد بررسی در این مطالعه نیز پیوند ریسه برقرار نکردند. بدین ترتیب گروه آناستوموزی چهار به عنوان گروه آناستوموزی *R. solani* عامل پوسیدگی طوقه و ریشه کدوئیان در استان های ذکر شده معرفی می گردد. پرگنه *R. solani* AG4 در سطح محیط کشت نمدی بوده و ریسه ها هم به صورت متراکم و هم به صورت هوایی رشد نمودند. جدایه ها طی سه روز تمام تشتک نه سانتی متری را پر نمودند. رنگ پرگنه ابتدا سفید و بعد به رنگ کرم، قهوه ای روشن تا تیره تغییر کرد.

در بررسی بیماری زایی، ۱۴ روز بعد از مایه زنی علائم بیماری ظاهر و مورد بررسی قرار گرفت. علائم بیماری به صورت پوسیدگی ریشه ها، مخصوصا ریشه های فرعی و تارهای کشنده و ایجاد شانکرهایی در ناحیه طوقه بود. قسمت های پوسیده، قهوه ای تیره تا سیاه رنگ بودند و به راحتی از ریشه اصلی جدا می شدند، علائم در قسمت های هوایی شامل زردی و پژمردگی برگ ها، تولید میوه های نارس، ضعف عمومی بوته ها دیده شدند و در مراحل پیشرفته به مرگ گیاهچه می انجامد (شکل ۱-C). علائم این بیماری زمانی که نمونه برداری در مزرعه انجام می شد به وضوح قابل رویت بود. یادداشت برداری هر دو روز و تا دو هفته پس از شروع علائم ادامه داشت. زمانی که ریشه ها 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 نهایتا ۹۷ درصد جدایه ها بیماری زا بودند. طول شانکر ایجاد شده نیز همانطور که در جدول ۱ ذکر شد، در جدایه های مختلف بسیار متغیر است. نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده های مربوط به آزمون بیماری زایی ۵۹ جدایه مورد بررسی نشان داد که این جدایه ها در ۱۰ گروه آماری مجزا قرار می گیرند (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 میزبان های خودشان ایجاد نکردند و جزو جدایه های غیربیماری زا بر روی میزبان های خود می باشند.

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 بیماری زایی (۹۷/۲ درصد) می باشد. نتایج به دست آمده نشان داد، که این جدایه ها شدت های بیماری زایی متفاوتی بر روی میزبان های متفاوت ایجاد می کنند. همچنین اثر متقابل جدایه-میزبان در سطح پنج درصد معنی دار بود که نشان دهنده آن است که میزبان های مختلف دارای حساسیت های متفاوتی نسبت به بیمارگر می باشند. با توجه به سطوح آماری به دست آمده، جدایه کدو دارای بالاترین میانگین درصد بیماری زایی(۹۷/۲ درصد) و میزبان هندوانه دارای بالاترین درصد حساسیت (۸۰/۱۷ درصد) نسبت به جدایه ها می باشد (جدول ۲).



شکل ۱- سلول های تسبیحی (A)، سختینه ها (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.

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

RR: root rot; RCR: 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 شده ند.

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 بیمارگر ها 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 ریسه در اعضای گروه AG4 مطابق با نتایج اوگوشی (Ogoshi 1987)، باریکترین ریسه را (کمتر از هفت میکرومتر) در بین گروه های *R. solani* دارد، که در این تحقیق بین ۴/۴۶ تا ۶/۸۶ میکرومتر اندازه‌گیری 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 بیماری‌زایی 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 آناسنوموزی 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 خاطرنقطه نظرات ارزنده ایشان در انجام هرچه بهتر این مطالعه سپاسگزاری می شود.

Reference:

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*. Proc. 12th Plant Protection Congress, 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: Methods for Research on Soilborn Phytopathogenic Fungi. By Singleton, L. L., Mihail, j. d., and Rush, C. M. (Editors).
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. Proc. 9th Plant Protection Congress, 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 Mycological. 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: *Rhizoctonia* Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. By Sneh, B., Jabaji-Hare, S., Neate, S., and Dijist, G. (Editors).
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. Proc. 8th Plant Protection Congress, Esfahan, 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. 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. Proc. 4th Plant Protection Congress, Mashhad, Iran.