وقوع *Rhizoctonia solani* AG2-2 عامل بوته میری آویشن دنایی

Rhizoctonia solani AG2-2, THE CAUSAL AGENT OF *Thymus daenensis* ROOT ROT

سیده مریم حسینی[۱]، محسن فرزانه[۲*]، کیوان بهبودی[۱] و محمد جوان‌نیکخواه[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۰/۷)

چکیده

طی بازدیدهای به عمل آمده از گلخانه و مزارع کشت شده گیاه دارویی آویشن دنایی در استان لرستان علائمی از قبیل بوته میری، مرگ گیاهچه، پژمردگی و پوسیدگی در ناحیه طوقه و ریشه دیده شد. نمونه‌های دارای علائم بیماری جمع آوری و پس از شستشو و ضدعفونی، در محیط PDAکشت شدند. از نمونه‌های بیمار شش جدایه قارچی جداسازی شد که بر اساس اصول کخ، جدایه Ka2 قادر به ایجاد پوسیدگی طوقه و ریشه گیاهچه‌های آویشن در شرایط آزمایشگاه و گلخانه و در نهایت مرگ گیاهچه شد. نتایج به‌دست آمده از ویژگی‌های ریخت‌شناسی بیمارگر رشد یافته روی محیط کشت نشان داد که جدایه بیمارگر با قارچ *Rhizoctonia solani* Kuehn مطابقت داشته و براساس جفت شدن با جدایه‌های مرجع آناستوموزی، به گروه آناستوموزی AG 2-2 تعلق دارد. در نهایت با تعیین توالی ناحیه ITS جدایه مذکور و ترسیم درخت فیلوژنتیکی با توالی ITS جدایه های مشابه موجود در بانک ژن، مطابقت این بیمارگر به *R. solani* (AG 2-2) تأیید شد. این بیمارگر برای اولین بار می‌باشد که از گیاه آویشن دنایی در ایران گزارش می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *Rhizoctonia solani* AG 2-2، آویشن دنایی، پوسیدگی ریشه

*: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: m_farzaneh @sbu.ac.ir

۱. به ترتیب دانش آموخته کارشناسی ارشد، دانشیار و استاد بیماری شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۲. استادیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران

مقدمه

گیاه دارویی آویشن دنایی (*Thymus daenensis*) از گونه‌های دارویی بومی ایران می‌باشد که به دلیل داشتن کارواکرول و تیمول بالا در اسانس و اسیدهای فنولی آزاد به ویژه رزمارینیک اسید در عصاره، فعالیت بیولوژیک بالا داشته و در صنایع دارویی و غذایی استفاده از آن رو به گسترش است (Jamzad 2009). بنابر اهمیت این گیاه در ایران، فعالیت‌های تحقیقاتی در جهت زراعی کردن آن در پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی شروع شده که نشان از پتانسیل بالای آن در راستای زراعی شدن می‌باشد.

این گیاه نیز مانند سایر گیاهان، میزبان آفات و بیماری‌های خسارت‌زا بوده به طوری‌که طی بازدیدهای به عمل آمده از مزارع کشت شده در تابستان ۱۳۹۰ مواردی از پژمردگی و بوته میری دیده شد. اغلب عوامل ایجاد کننده مرگ گیاهچه، بیمارگر های قارچی‌اندکه می‌توانند گیاه را در هر مرحله‌ای از رشد مورد حمله قرار دهند و باعث کاهش تعداد بوته و محصول شوند (Agrios 2005). طبق تحقیقات صورت گرفته تاکنون، عوامل مسبب بوته‌میری و مرگ گیاهچه گیاهان دارویی عمدتاً قارچ‌هایی از جمله *Fusarium solani*، *Phytophthora cryptogea*، *Ph. drechsleri*، *Rhizoctonia solani* و *Pythium* sp. معرفی شده‌اند (Shafizadeh *et al*. 2010). تاکنون روی بیماری‌های این گیاه خصوصاً بیماری‌های ریشه و طوقه تحقیقات کمی در ایران صورت گرفته است و در دنیا نیز گزارش جامعی در دسترس نیست. لذا در تحقیق حاضر یکی از قارچ‌های مهم عامل بوته میری و پژمردگی گیاهچه آویشن در استان لرستان مشخص و معرفی شده تا ضمن غنی‌تر شدن دانش ما از قارچ‌های بیمارگر گیاهان دارویی، بتوان به اقدامات لازم برای کنترل غیر شیمیایی بیماری دست یافت.

روش بررسی

نمونه‌های گیاهی بیمار از گلخانه‌های تهیه نشای شرکت داروسازی خرمان و مزارع کشت شده در حومه خرم‌آباد (منطقه کشکان)، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. بعد از شستن ریشه‌ها در زیر جریان آب، خاک روی آنها جدا شد. ناحیه طوقه و ریشه که دارای علائم مشکوک به بیماری بود، در زیر جریان ملایم آب به مدت ۱۵-۱۰ دقیقه کاملاً شسته شدند. ریشه‌های آلوده در هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد به مدت سه دقیقه قرار گرفته و سه مرتبه با آب مقطر سترون شسته و روی کاغذ صافی سترون خشک شدند. سپس قطعات کوچکی به اندازه حدود ۵×۵ میلی‌متر با کمک اسکالپل از مرز ناحیه آلوده و سالم جدا و روی محیط‌های کشت PDA و آب- آگار ۲% کشت داده شدند. تشتک‌های پتری کشت شده به مدت ۷-۵ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور خالص‌سازی جدایه قارچی از روش نوک ریسه روی محیط آب- آگار ۲% استفاده شد و سپس با انتقال به محیط PDA کشت خالص تهیه گردید.

برای تهیه زادمایه قارچ از بذر ارزن و طبق روش *مارهوفر و همکاران* (Maurhofer *et al*. 1994) استفاده شد. چند عدد بذر ارزن پوشیده از ریسه قارچ درون تشتک پتری حاوی کاغذ صافی مرطوب در کنار ریشه سه گرم گیاهچه زنده (حدود ۱۰ عدد گیاهچه) قرار داده شدند. همچنین زادمایه قارچ به خاک سترون اطراف

بوته‌های آویشن کاشته شده اضافه شد و گلدان‌ها به مدت سه هفته در شرایط گلخانه نگهداری شدند (Sneh *et al.* 1991). آزمایش بیماری‌زایی با سه تکرار در قالب طرح بلوک کامل تصادفی انجام شد. شدت بیماری روی هر یک از گیاهچه ها بر اساس مقیاس *کارلینگ* و *همکاران* (Carling *et al.* 2002) با کمی تغییر یادداشت برداری شد: فاقد علایم، نمره صفر ؛ قهوه‌ای شدن ریشه چه، نمره ۱؛ قهوه‌ای شدن هیپوکوتیل، نمره ۲؛ قهوه‌ای شدن ریشه چه و هیپوکوتیل، نمره ۳؛ مرگ کامل گیاهچه، نمره ۴.

جهت شناسایی بیمارگر و انجام بررسی‌های میکروسکوپی، به کمک دست برش‌های نازکی از نمونه قارچی تهیه شد و با استفاده از محلول‌های مختلف نظیر لاکتوفنول، کاتن بلو- لاکتوفنول و سافرانین اُ (Safranin-O) اسلاید نمونه آماده شد. نمونه‌های حاصل به وسیله میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. به طورکلی جهت تعیین نام جدایه قارچی بیمارگر، خصوصیاتی نظیر ویژگی‌های ریسه، وجود اندام‌های باردهی و مورفولوژی پرگنه روی محیط غذایی PDA مورد مطالعه قرار گرفت. برای شناسایی کامل‌تر قارچ از روش *پارامتر و ویتنی* (Parameter & Whitney 1970) استفاده گردید. در تعیین تعداد هسته بر اساس روش *باندونی* (Bandoni 1979)، لایه نازکی از محیط کشت حاوی میسلیوم‌های قارچ روی لام قرار داده شد و سپس یک قطره محلول قلیایی سافرانین اُ و یک قطره محلول پتاس ۳ درصد به آن اضافه شد. تعداد هسته‌های ریسه رویشی توسط میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی X ۴۰۰ محاسبه گردید.

در تعیین گروه آناستوموزی، از روش *مارتین و لوکاس* (Martin & Lucas 1984) که در حقیقت روش جفت‌کردن جدایه‌های مرجع با جدایه‌های نامعلوم می‌باشد، استفاده شد. روی لام‌های سترون یک لایه نازک از محیط کشت آب – آگار ۱/۷% قرار داده شد. دیسک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه جوان جدایه‌های مرجع آناستوموزی و جدایه نامعلوم بیمارگر تهیه و به فاصله دو سانتی‌متر از هم، روی لام مقابل هم قرارداده شد. بعداز ۴۸-۲۴ ساعت رشد، ناحیه تماس ریسه‌ها توسط محلول رنگی کاتن بلو رنگ‌آمیزی شد و زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

تأیید شناسایی گروه آناستوموزی با استفاده از توالی‌های آناستوموزی استاندارد موجود در بانک ژن (National Center for Biotechnology Information, NCBI) و از طریق بررسی درخت فیلوژنتیکی، انجام گرفت (Hsiang & Dean 2001). بدین منظور برای استخراج دی ان ای ژنومی نمونه قارچی مورد بررسی، از کیت بایونیر (AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit – Bioneer) استفاده شد. جهت تکثیر ناحیه ITS1- 5.8S- ITS2 ژنوم DNA ریبوزومی نمونه از ترکیب آغازگرهای ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG -3') به همراه ITS4 (5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم (Forward) و معکوس (Reverse) استفاده شد (White *et al.* 1990).

تکثیر ناحیه مورد نظر به کمک دستگاه ترموسایکلر (thermal cycler, Eppendorf) انجام شد که الکتروفورز محصول PCR نشانگر تکثیر بخشی از ژنوم با اندازه مورد نظر بود. قطعه مورد نظر تعیین توالی شد و با قرار دادن توالی به‌دست آمده در پایگاه اطلاعات NCBI و با استفاده از برنامه Blast (Basic Local Alignment Search Tools) شناسایی مولکولی جدایه براساس توالی‌های معتبر موجود در بانک اطلاعاتی GenBank database و بر اساس

بالاترین میزان شباهت انجام گرفت (http: //ncbi. nih.gov/BLAST; Altschul *et al.* 1990). ارتباط فیلوژنتیکی جدایه با استفاده از نرم افزار Clustal W انجام شد (Larkin *et al.* 2007). درخت فیلوژنتیکی جدایه بر اساس گروه‌های آناستوموزی استاندارد تعیین شده موجود در بانک ژن (Hsiang & Dean 2001; Sharon *et al.* 2006) به روش maximum parsimony و آزمون اعتبارسنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار به کمک نرم افزارMolecular Evolutionary Genetics Analysis ترسیم شد (Kumar *et al.* 2008).

نتایج و بحث

ده روز پس از مایه‌زنی ریشه آویشن درون پتری با شش جدایه قارچی، ریشه‌ها توسط جدایه ka2 به شدت کلنیزه شدند. علائم بیماری توسط جدایه ka2 روی گیاه آویشن به صورت پوسیدگی و زخم‌های قهوه‌ای رنگ روشن یا تیره روی ریشه گیاه دیده شدندکه این علائم با مشاهدات روی گیاهان دارویی سنبل‌طیب (Li 2000)، رزماری (Holcomb 1992; Oji-Ardebili *et al.* 2008) و بررسی‌های *شریف نبی و همکاران* (Sharifnabi *et al.*) روی گیاه اسپرس مشابه بودند. دو هفته پس از مایه‌زنی نشاها، علائم بوته میری ظاهر گردید (شکل ۱).

بر اساس آزمون دانکن بین تیمارهای آلوده و تیمار شاهد در سطح ۵% اختلاف معناداری وجود داشت. در آزمون بیماری‌زایی میانگین پوسیدگی ریشه ۸۰% محاسبه شد. بعد از انجام آزمون بیماری‌زایی، مطابق اصول کخ جدایه قارچ از ریشه‌های آلوده جداسازی گردید.

شناسایی بیمارگر: پرگنه قارچ روی محیط PDA ابتدا سفید رنگ بوده و بتدریج به رنگ کرم تا قهوه‌ای روشن شد. ریسه‌ها با قطرهای متفاوت با انشعابات زاویه قائمه تا حاده بودند. در قاعده انشعابات فرورفتگی مشخصی دیده شد و دیواره عرضی کمی بالاتر از محل فرورفتگی در انشعابات دیده شد. سلول‌های مونیلیوئید قارچ بشکه‌ای شکل بودند و به صورت زنجیره‌های ساده و منشعب و به رنگ شفاف تا قهوه‌ای مشاهده گردیدند. قطر ریسه ۹-۵ میکرومتر و قطر سلول‌های مونیلوئیدی ۱۱ تا ۱۳/۹میکرومتر محاسبه شد. بعد از رنگ‌آمیزی ریسه‌ها با محلول سافرانین‌اُ تعداد ۳ تا ۷ هسته در هر سلول ریسه مشاهده گردید و بر همین اساس گونه این جدایه *R. solani* تشخیص داده شد (شکل ۲).

در تعیین گروه آناستوموزی قارچ که از روش جفت کردن جدایه‌های مرجع با جدایه‌های نامعلوم استفاده شد، گونه مذکور *R. solani* با گروه آناستوموزی AG-2-2 شناسایی گردید .

برای تأیید این تشخیص، درخت فیلوژنتیکی مربوطه هم ترسیم شد. در این درخت قرابت *R. solani* بیمارگر گیاه دارویی آویشن به گروه آناستوموزی استاندارد AG 2-2 مشخص است (شکل ۳).

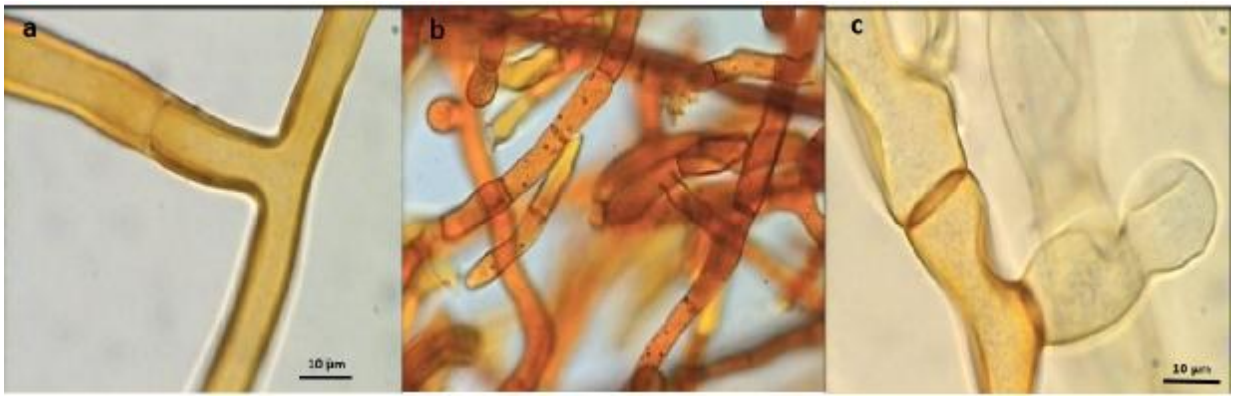
قارچ *R. solani* از قارچ‌های پلی‌فاژ بیماری‌زای گیاهی می‌باشد. داشتن دامنه میزبانی وسیع، قدرت بیماریزایی بالا در شرایط اقلیمی مناسب و همچنین مقاومت بسیار زیاد اسکلروت‌های این قارچ در شرایط نامساعد موجب گردیده است که در بسیاری از گیاهان به عنوان بیمارگری خطرناک مطرح شود. در سراسر دنیا این قارچ به عنوان یک بیمارگر خاک برد مخرب محسوب می‌شود که به بیش از ۲۳۰ گونه گیاهی از ٦٦ تیره حمله می‌کند. از لحاظ تاکسونومیکی *R. solani* یک گونه کمپلکس (*R. solani* species complex) محسوب می‌شود. برای این گونه گروه‌های آناستوموزی متعددی از AG-1 تا AG-13

معرفی شده است، که بعضی از آنها خود دارای زیرگروه‌هایی است (Ogoshi 1987). شکل جنسی این

a b

شکل ۱. a، علائم ایجاد شده روی ریشه و طوقه گیاهچه آویشن دنایی توسط *R.solani*: گیاه بیمار، سمت راست خط نقطه چین؛ گیاه سالم، سمت چپ خط نقطه چین. b، بوته میری گیاه

Fig. 1. (a) Symptoms of *R. solani* root and crown rot in *Thymus daenensis* (right of dotted line) compared to healthy plants (left of dotted line). (b) Plant root rot.

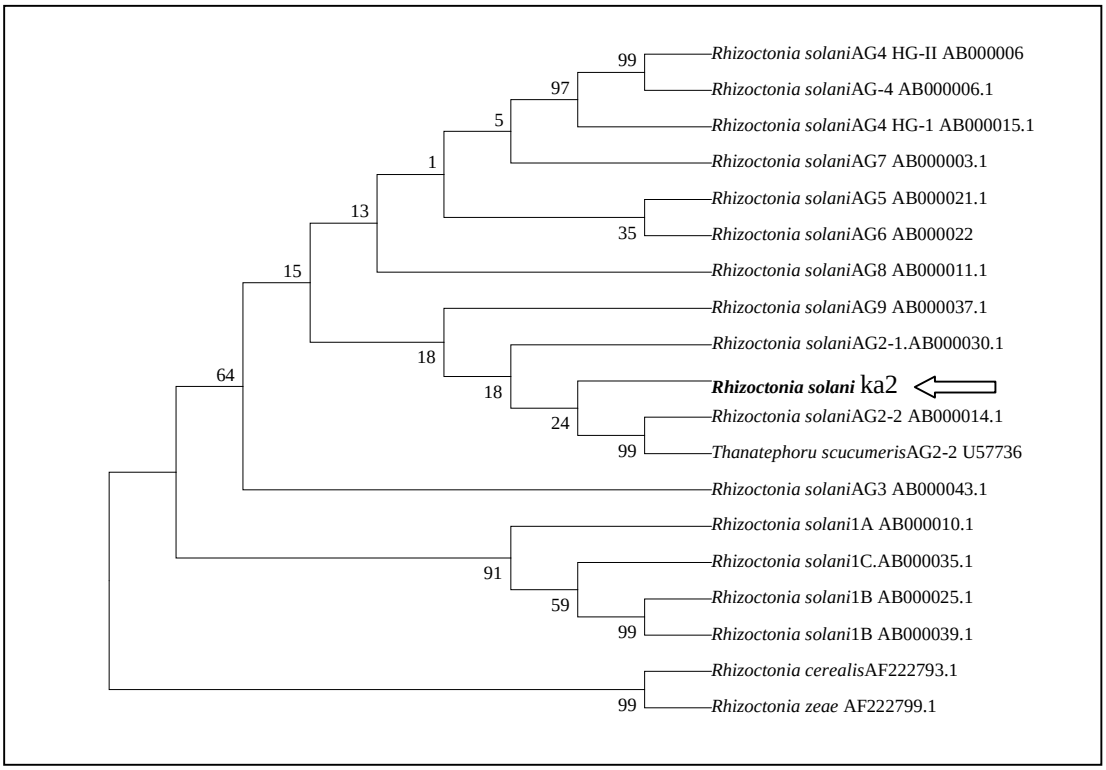


شکل ۲.a ، انشعابات ریسه؛ b، تعداد هسته و c، سلول‌های مونیلوئیدی در جدایه بیمارگر ka2

Fig. 2. (a) hyphal branching; (b) multiple nuclei; (c) monilioid cells of pathogenic isolate ka2 .

قارچ *Thanatephorus cucumeris* Donk است که به صورت ساپروفیت در خاک رشد می‌کند و از تجزیه کننده‌های قوی سلولز است. از خصوصیات مهم این گونه می‌توان به چند هسته‌ای بودن سلول‌های ریسه رویشی، منشعب بودن قسمت انتهایی ریسه جوان، وجود فرورفتگی مشخص در قاعده انشعاب، تشکیل دیواره عرضی کمی بالاتر از فرورفتگی، تشکیل اسکلروت کاذب و همچنین فاقد کنیدیوم بودن آن اشاره نمود (Ogoshi 1987). تاکنون از گیاه آویشن *T. kotschyans* سه گونه زنگ به نام‌های *Puccinia epithyum*، *P. menthae* و *P. serpylli* از ایران گزارش شده است (Ershad 2009). همچنین قارچ *Leveillula taurica* عامل سفیدک سطحی نیز از این گیاه معرفی شده است (Khodaparast *et al*. 2008). در سال ۱۳۸۸ نمونه‌های خشک شده آویشن از مزرعه گیاهان دارویی شرکت گل دارو دارای علائم قهوه‌ای رنگ در ناحیه طوقه و ریشه و

خشکیدگی شاخ و برگ بودند که هنگامی‌که پوست ناحیه طوقه و ریشه آنها کنار زده شد بافت‌های کاملا قهوه‌ای



شکل ۳. ترسیم درخت فیلوژنتیکی *Rhizoctonia solani* ka2 بیمارگر آویشن دنایی و ۱۳ گروه آناستوموزی استاندارد از این قارچ بر اساس توالی ناحیه ITS ژنوم DNA ریبوزمی به کمک روش maximum parsimony و آزمون اعتبار سنجی (bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار است. قارچ *R. cerealis* به عنوان out group در نظر گرفته شد.

Fig. 3. A maximum parsimony tree, illustrating the estimated phylogenetic relationships between *Rhizoctonia solani* ka2 of *Thymus daenensis* and 13 standard anastomosis groups, based on ITS region of rDNA sequencing. Bootstrap is tested on 1000 repeats. *R. cerealis* was used as out group.

شده و تغییر رنگ یافته نیز مشاهده گردید که طی بررسی، گونه‌های *Phythophthora cryptogea* و *Fusarium solani* جداسازی و معرفی شد (Shafizadeh *et al.* 2010). بر اساس بررسی‌های به عمل آمده و همچنین طبق فهرست *ارشاد* (Ershad 2009) تاکنون گزارشی مبنی بر وجود *R. solani* روی آویشن دنایی در ایران موجود نمی‌باشد. بنابراین نخستین گزارش از وجود این قارچ روی آویشن دنایی است.

با توجه به اینکه گیاه دارویی آویشن درکشور از اهمیت بالایی برخوردار است و عامل قارچی نام‌برده شده نیز مستقیما به ریشه و طوقه این گیاه خسارت می‌زند، ضرورت دارد که راهکاری مناسب در جهت جلوگیری از انتقال قارچ عامل بیماری توسط نشاهای آلوده به سایر نقاط کشور اندیشیده شود. با جلوگیری از آبیاری غرقابی و کشت صحیح نیز می‌توان مقداری از میزان خسارت این قارچ کاست. با توجه به عدم امکان استفاده از ترکیبات شیمیایی قارچ‌کش به خاطر مصارف دارویی این گیاه، به

کارگیری روش‌های بیولوژیک در کنترل عوامل بیماری‌زا حائز اهمیت می‌باشد. در ادامه این تحقیق نیز پژوهشی به منظور استفاده از عوامل آنتاگونیست مانند باسیلوس و سودوموناده‌ای فلورسنت (*Pseudomonads fluorescent*) که از ریزوباکتری‌های همزیست گیاه آویشن هستند، در جهت کنترل این بیمارگر در حال بررسی می‌باشد و امید است موثر واقع شود.

سپاسگزاری

بودجه و امکانات این تحقیق از محل طرح شماره ۶۰۰/۱۵۱۹ معاونت پژوهشی و فناوری دانشگاه شهید بهشتی تأمین شده که بدین‌وسیله تشکر و قدردانی می شود. نگارندگان همچنین از جناب آقای دکتر محمودی معاون موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر به‌خاطر همکاری در تهیه جدایه‌های استاندارد آناستوموزی کمال تشکر را دارند.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (109-111) متن انگلیسی مراجعه شود.