مقاله کوتاه

شناسایی گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia* sp. از خاک و موادآلی گیاهان زینتی در شهرستان شیراز*

فاطمه صباحی** و ضیاءالدین بنی‌هاشمی[۱]

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۹/۲۴؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۵)

چکیده

نمونه‌برداری طی اردیبهشت ۱۳۹۰ تا شهریور ۱۳۹۱از خاک نواحی گل‌کاری شده شهر شیراز انجام شد.نمونه‌های خاک پس از خشک شدن کامل از الک ۲ میلیمتری عبور داده شدند. سپس با روش طعمه‌گذاری‌با بذر چغندر قند ۲۷ جدایه *Rhizoctonia* از خاک جداسازی شد که ۲۰ جدایه مربوط به *Rhizoctonia solani* و هفت جدایه مربوط به *Rhizoctonia* sp. دو هسته‌ای بود. گروه آناستوموزی جدایه‌های *R. solani* جداسازی شده از خاک AG2 (شش جدایه)، AG4 (هفت جدایه)، AG2.2، AG7 و AG13(هر کدام یک جدایه) شناسایی شد و گروه آناستوموزی چهار جدایه از *R. solani* ناشناخته باقی ماند. همچنین گروه آناستوموزیهفت جدایه *Rhizoctonia* sp. دو هسته‌ای نیز بدلیل در دسترس نبودن AG های استاندارد، مشخص نشد. در جداسازی گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia* از مواد آلی، تنها ۱۱ جدایه *Rhizoctonia* چند هسته‌ای جداسازی شد که همگی مربوط به گونه *R.solani* بودند. گروه‌های آناستوموزی شناسایی شده در این آزمون AG2 (سه جدایه)، AG4 (چهار جدایه) و AG7 (یک جدایه) شناسایی شد و گروه آناستوموزی سه جدایه نامشخص ماند.

کلیدواژه: ***Rhizoctonia* spp.**، **گروه‌های آناستوموزی، خاک، مواد آلی**

---

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: fsabahi2007@gmail.com

۱. به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استاد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز.

Identification of anastomosis groups of *Rhizoctonia* sp. from soil and organic materials in ornamental landscapes in Shiraz*

F. Sabahi and Z. Banihashemi[1]**

(Received: 15.12.2014; Accepted: 27.9.2015)

Abstract

During May 2011 to September 2012 soil samples from Shiraz landscape were collected,air dried and passed through a 2-mm sieve and baited with sugarbeet seeds. Twenty seven isolates of *Rhizoctonia* were isolated from soil, which 20 isolates belonged to *Rhizoctonia solani* AG2 (6 isolates), AG4 (7 isolates), AG2.2, AG7 and AG13 (each one isolate) and 7 isolates of binucleate *Rhizoctonia* (BNR). Also eleven isolates of*R. solani* were isolated from organic matter contained of AG2 (3 isolates), AG4 (4), and AG7 (1). Anastomosis group of some isolates of *R. solani* and all isolates of BNR due to unavailability of tester isolates could not be identified.

Keywords: *Rhizoctonia* spp. , anastomosis group, soil, organic matter

---

* A Part of MSc. Thesis of the First Author Submitted to College of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran.

** Corresponding author's E-mail: fsabahi2007@gmail.com

1. Former MSc. Student and Prof. of Plant Pathology, College of Agriculture, Shiraz University. Shiraz, Iran.

مقدمه

گونه‌های *Rhizoctonia* بر اساس تعداد هسته در سلول‌های ریسه به گروه‌های دو هسته‌ای وچند هسته‌ای تقسیم می‌شوند. مهم‌ترین پیشرفتی که در جهت درک تنوع موجود در اعضای این مجموعه پیچیده صورت گرفته، گروه‌بندی بر اساس وقوع آناستوموز ریسه‌ای بوده است (Ogoshi, 1987). بر این اساس شکل‌های غیر جنسی *Ceratobasidium* spp.، *Thanatephorus cucumeris* و *Waitea circinata* به ترتیب در ۱۹ (AG-A تا AG-S)، ۱۴ (AG1 تا AG13 و AGBI) و دو گروه آناستوموزی (WAG-O و WAG-Z) قرار می‌گیرند (Carling *et al.*, 2002, Naitu & Kanematuso, 1994). گونه‌های *Rhizoctonia* به عنوان بیمارگر خاکزاد و با تولید اسکلروت به طور نامحدودی در خاک زنده می‌مانند. این قارچ‌ها قادرند به صدها نوع مختلف گیاهان حمله و بیماری ایجادنمایند. جدایه‌های این قارچ از بیش از ۱۵۰ گونه مختلف گیاهی از جمله گل‌های زینتی جداسازی شده‌اند (Boysen*et al.*, 1996).

تحقیقات اخیر نشان داده است که اعضای جنس *Rhizoctonia* از نظر بیولوژیکی و ژنتیکی گروهی متنوع هستند.آناستوموز ریسه‌ای به عنوان یک گروه سازگاری سوماتیک بین جدایه‌ها تعریف می‌شود و برای توصیف شباهت یا تفاوت ژنتیکی در *Rhizoctonia* استفاده می‌گردد. گروه‌بندی آناستوموزی همچنان بزرگ‌ترین و تنها پیشرفت در شناخت تنوع ژنتیکی در داخل جنس *Rhizoctonia* است (Cubeta & Vilgalys, 1997).

پائولیتز و شوروئدر، *Rhizoctonia oryzae* و *R. solani* AG-8 را از خاک‌های مزارع گندم و جو در مناطق خشک شمال غربی اقیانوس آرام با استفاده از خلال دندان چوبی جدا کردند (Paulitz& Schroeder,2005).

گوتیئرز و همکاران در سال ۲۰۰۱، برای جداسازی *Rhizoctonia* از خاک مقداری از خاک‌های جمع‌آوری شده را روی محیط کشت نیمه انتخابی *Rhizoctonia* (۱۶ گرم آگار در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر ،۱۰۰ میلی گرم سولفات استرپتومایسین، ۱۰۰ میلی گرم پنیسیلین- جی و ۸۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم) در چند نقطه کشت دادند و کلنی رشد کرده *Rhizoctonia* را روی محیط کشت بررسی کردند(Gutierrez *et al.*, 2001).

در ایران نیز محسنی و همکاران، به منظور جداسازی *Rhizoctonia* از خاک ازروش طعمه گذاری با بذر چغندرقند وخلال دندان ضدعفونی شده استفاده کردند. در نتیجه ۱۲۱ جدایه *Rhizoctonia* از خاک جداسازی شد. ۱۰۱ جدایه چندهسته‌ای و۲۰جدایه دو هسته ای شناسایی شدند (Mohseni *et al.*, 2011).

اسنه و همکاران، برای جداسازی *Rhizoctonia* از مواد آلی، از ۱۳۵ محل درجزیره‌های شمال و جنوب نیوزیلند نمونه‌های خاک جمع‌آوری کردند و سپس با استفاده از محیط کشت TWA (Tap Water Agar) ریسه‌های رشد کرده از مواد آلی را در زیر میکروسکوپ بررسی شد (Sneh *et al.*, 2004)

روش بررسی

نمونه‌برداری طی اردیبهشت ۱۳۹۰ تا شهریور ۱۳۹۱از خاک نواحی گل‌کاری شده شهر شیراز انجام شد.به منظور جداسازی *Rhizoctonia* از خاک، از دو روش استفاده شد. در روش اول نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده پس از خشک شدن کامل، از الک دو میلیمتری عبور داده شدند. سپس مقداری از خاک روی محیط کشت نیمه انتخابی *Rhizoctonia* (۱۶ گرم آگار در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر

۱۰۰، میلی‌گرم سولفات استرپتومایسین، ۱۰۰ میلی‌گرم پنیسیلین-جی و ۸۰۰ میکرولیتر هیدروکسید سدیم) کشت داده شدند و در دمای ۲۵°C نگهداری گردیدند (Gutierrez *et al*., 2001). در روش دوم مقداری از خاک-های جمع‌آوری شده پس از خشک شدن کامل و عبور از الک ۲ میلیمتری، درون لیوان‌های پلاستیکی ریخته شد، بذرهای چغندرقندجوشیده شده و خلال دندان‌های چوبی سترون به عنوان طعمه درون خاک قرار داده شد(Mohseni *et al*., 2011, Paulitz & Schroeder, 2005). به منظور حفظ رطوبت، سطح خاک با دستمال کاغذی مرطوب پوشیده شد. پس از ۴۸ ساعت بذرهای چغندر و خلال دندان‌ها از درون خاک بیرون آورده و تعدادی از آن‌ها با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ ضدعفونی سطحی و سپس در آب مقطر سترون شستشو داده شدند و تعدادی دیگر بدون ضدعفونی سطحی، چندین بار با آب مقطر سترون شسته ، با دستمال کاغذی خشک و روی محیط کشت نیمه انتخابی *Rhizoctonia*، با روش شرودر با اندکی تغییرات (۱۶ گرم آگار در ۱۰۰۰میلی‌لیتر آب مقطر، ۰/۱ گرم chloramphenicol و ۰/۰۵ گرم hymexazole) قرار داده و در دمای ۲۵°C نگهداری شدند.به منظور جداسازی *Rhizoctonia* از ماده آلی، پس از خشک و غربال شدن نمونه های خاک جمع‌آوری شده از الک ۲ میلیمتری، مقداری خاک درون الک ۶۰ مش شسته شد، به طوری که تمام ذرات خاک شسته شده، فقط مواد آلی روی الک باقی ماند. مواد آلی پس از خشک شدن با دستمال کاغذی، روی محیط کشت PDA حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر پودر لباسشویی کشت (Steiner & Watson, 1965) و در دمای ۲۵°Cنگهداری شد. جهت تعیین تعداد هسته در هر سلول ریسه در جدایه‌های *Rhizoctonia* از روش باندونی (Bandoni, 1979) استفاده شد. در این روش هسته ریسه-های مورد بررسی با استفاده از محلول سافرانین- او قلیایی (Safranin O) و یک قطره از KOH ۳٪ رنگ‌آمیزی شد.گروه آناستوموزی جدایه‌های *Rhizoctonia* spp. با جفت کردن آن‌ها با سویه‌های آزمون کننده (tester) و مشاهده پیوند ریسه‌ها با روش اسلاید تمیز مورد بررسی قرار گرفت (Krondland & Stanghllini, 1988). به منظور تعیین گروه‌های آناستوموزی جدایه‌های *R. solani* با گروه‌های آناستوموزی استاندارد موجود شامل AG1.IA، AG2.2، AG2 ، AG2.2.B ، AG2.2IIIB، AG3 ، AG4، AG7 ، AG11 و AG13 بررسی و بر اساس امتزاج با AG خاص در آن گروه آناستوموزی قرار گرفتند.

نتایج و بحث

به منظور جداسازی گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia* از خاک در این بررسی در روش اول و دوم هیچ جدایه‌ای جدا نگردید. در روش استفاده از بذر چغندر سترون به عنوان طعمه در خاک، رشد ریسه‌های *Rhizoctonia* در اطراف بذرهایی که بدون ضدعفونی سطحی کشت شده بودند، مشاهده شد. بر این اساس *Rhizoctonia*های جداسازی شده از خاک در دو گروه *Rhizoctonia*های دو و چند هسته‌ای قرار گرفتند که شامل دو گونه *R. solani* و *Rhizoctonia*های دو هسته‌ای بودند. نتایج این بررسی در جدول ۱ آورده شده است. روش اول جداسازی *Rhizoctonia* از خاک با استفاده از محیط کشت ذکر شده در مطالعات قبل توسط Gutierrez و همکاران انجام شده بود و آن‌ها توانستند کلنی‌های رشد کرده *Rhizoctonia* را روی این محیط کشت بررسی کنند (Gutierrez *et al*., 2001). اما در بررسی ما با استفاده از این روش هیچ جدایه‌ای از *Rhizoctonia* از خاک جداسازی نشد. این احتمال وجود دارد که جمعیت

جدول ۱. جدایه‌های *Rhizoctonia* sp. براساس تعداد هسته‌و قطر ریسه‌وگروه‌های آناستوموزی–جداسازی شده‌ازخاک

Tabel1. *Rhizoctonia* isolates based on number of nuclei, hyphal diamete and anastomosis groups- isolatedfrom soil

Locaion	AG	Mean hyphal diameter(µm)	Mean number of nuclei	Isolate code	Fungus
HIS	AG2	5.75	5	Rs 1	***R. solani***
HIS	AG2	5.5	5	Rs 2	
HIS	AG2.2	7.2	6	Rs 3	
HIS	UN	7	5	Rs 4	
CB	AG4	5.2	4	Rs 5	
CB	AG4	5.2	4	Rs 6	
AB	UN	4.9	4	Rs 7	
AB	AG4	5.65	5	Rs 8	
NB	UN	4.7	4	Rs 9	
AP	AG13	5.5	5	Rs 10	
RP	AG7	6.9	6	Rs 11	
ES	AG2	7.2	6	Rs 12	
EG	AG4	6.2	5	Rs 13	
BS	AG4	6.6	6	Rs 14	
BS	AG4	6.5	5	Rs 15	
BS	UN	7	6	Rs 16	
GS	AG2	6	5	Rs 17	
GS	AG2	6.18	5	Rs 18	
IHOS	AG4	6.18	5	Rs 19	
IHOS	AG2	5	4	Rs 20	
KP	UN	4.5	2	Rs 21	**Binucleate *Rhizoctonia***
ES	UN	4	2	Rs 22	
VS	UN	4.6	2	Rs 23	
PB	UN	4.3	2	Rs 24	
GS	UN	4	2	Rs 25	
CB	UN	4.5	2	Rs 26	
NP	UN	4.7	2	Rs 27	

UN: گروه آناستوموزی نامشخص. این جدایه‌ها با گروه‌های آناستوموزی موجود پیوند ریسه نداشتند. IHS: میدان امام حسن، CB: بلوار چمران،AB: بلوار امیرکبیر، NB: بلوار نصر، AP: بوستان ولیعصر، RP: بوستان رضوی،ES: میدان ارم، EG: باغ ارم،BS: میدان بسیج، GS: میدان گلستان، IHOS: میدان امام حسین، KP: بوستان خلدبرین،VS: میدان ولیعصر، PB: بلوار تخت‌جمشید، NP: بوستان ملی

UN: Unknown anastomosis group
EG: IHS: Imam Hassan Square, CB: ChamranBlvd.,AB: Amirkabir Blvd., NB: Nasr Blvd., AP: Asr Park, RP: Razavi Park, ES: Eram Square, EG:EramGarden,BS: BassijSquare,GS: GolestanSquare,IHOS: Imam Hossein Square, KP: KholdebarinPark,VS: ValiasrSquare,PB: Persepolis Blvd., NP: National Park

Rhizoctonia در خاک مورد آزمایش Gutierrez و همکاران بالاتر از جمعیت *Rhizoctonia* در خاک‌های نمونه‌برداری شده در بررسی ما بوده است. در تحقیقات ما قارچ *Rhizoctonia* با استفاده از محیط کشت استفاده شده در تحقیقات Paulitz & Schroeder جداسازی نشد، محیط کشتی که در این بررسی برای جداسازی *Rhizoctonia* استفاده شد همان محیط کشت استفاده شده در تحقیقات Paulitz& Schroeder بود با این تفاوت که بنومیل در این محیط کشت، به دلیل ممانعت روی رشد *Rhizoctonia*، حذف شد و hymexazole با مقدار ۰/۰۵ گرم در لیتر به

جدول ۲.جدایه‌های*Rhizoctonia solani* براساس تعداد هسته‌و قطر ریسه وگروه‌های آناستوموزی–جداسازی شده از موادآلی

Tabel2. *Rhizoctonia solani* isolates based on number of nuclei, hyphal diameter and anastomosis groups- isolated from organic matter

Locaion	AG	Mean hyphal diameter(µm)	Mean number of nuclei	Isolate code
IHS	AG2	5.2	4	Ro 1
IHS	UN	5.5	4	Ro 2
VS	AG2	5.68	5	Ro 3
VS	UN	6	5	Ro 4
BS	UN	4.9	4	Ro 5
CB	AG4	7.5	6	Ro 6
AB	AG4	6.9	6	Ro 7
IHOS	AG4	6.2	5	Ro 8
ES	AG7	4.8	4	Ro 9
ES	AG4	7.2	6	Ro 10
GS	AG2	6	5	Ro 11

این محیط کشت اضافه گردید. حذف این قارچ‌کش از محیط کشت و اضافه کردن hymexazole جهت جلوگیری از رشد گونه‌های *Pythium* باعث جداسازی قارچ *Rhizoctonia* از خاک شد. در این بررسی قارچ *Rhizoctonia* با روش خلال دندان چوبی به عنوان طعمه (Paulitz & Schroeder, 2005)، از خاک جداسازی نشد و نتایج ما در جداسازی قارچ با نتایجPaulitz & Schroeder در مناطق شمال غربی اقیانوس آرام و محسنی و همکاران (Mohseni *et al*., 2011) در ایران مطابقت نداشت. در این بررسی پرگنه‌های قارچ *Rhizoctonia* توسط بذور چغندر-قند جوشیده که به عنوان طعمه در خاک گذاشته شده بود، از خاک جداسازی شد. در تحقیقات محسنی و همکاران(Mohseni*et al*.,2011) نیز از بذر چغندر به عنوان تله جهت جداسازی *Rhizoctonia* از خاک استفاده شده بود که نتایج ما از این جهت با مطالعات محسنی و همکاران مطابقت داشت. در جداسازی گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia* از مواد آلی تنها *Rhizoctonia*های چند هسته‌ای از مواد آلی جداسازی شدند، که نتایج در جدول ۲ آورده شده است.با توجه به اینکه قارچ *Rhizoctonia* مهم‌ترین بیمارگر گیاهان زینتی می‌باشد (Sabahi & Banihashemi, 2014) جداسازی گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia* از خاک و مواد آلی در مناطق گل‌کاری شده در شهر شیراز این نکته را مشخص کرد که خاک و مواد آلی می‌توانند منبعی برای آلودگی گیاهان زینتی به قارچ *Rhizoctonia* باشند، در نتیجه استفاده از خاک و کود عاری از *Rhizoctonia* به عنوان بستر بذر در خزانه‌ها و همچنین به عنوان بستر کشت نشا گل‌ها در خیابان و پارک‌ها توصیه می‌شود. البته در این بررسی خاک خزانه‌ها از جهت آلودگی به قارچ *Rhizoctonia* بررسی نشد که آیا این قارچ در خزانه‌ها وجود دارد اما بدلایلی از جمله مساعد نبودن شرایط محیطی باعث آلودگی نمی‌شود و اینکه این قارچ به همراه نشا گل‌ها به خیابان و پارک‌ها منتقل می‌شود و در آن‌جا گیاه را آلوده می‌کند ویا اینکه ممکن است خاک خزانه‌ها عاری از این بیمارگر باشد و بدلیل حضور این قارچ در خیابان و پارک‌ها، نشا گل‌ها مورد تهاجم این قارچ قرار می‌گیرد. بنابراین پیشنهاد می‌شود خاک خزانه‌ها از جهت آلودگی به قارچ *Rhizoctonia* بررسی شود.

منابع

Bandoni R. J. 1979. Safranin as a rapid nuclear stain for fungi. Mycology 71: 873-874.

Boysen M., Borja M., Delmoral C., Salazar O. and Rubio V. 1996. Identification at strain level of *Rhizoctonia solani* AG-4 isolates by direct sequence of asymmetric PCR products of the ITS regions. Curr.Genet. 29: 174 – 181.

Carling D. E., Barid R. E., Gitaitis R. D., Brainard K. A., and Kuninaga S. 2002. Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 92:893-899.

Cubeta M. A., and Vilgalis R. 1997.Population biology of the *Rhizoctonia solani* complex. Phytopathology 87: 480-484.

Gutierrez W. A., Shew H. D., and Melton T. A. 2001. A semi-selective medium to isolate *Rhizoctoni solani* from soil and tissue. Plan Pathology. Extension, North Carolinat State University.

Kronland W. C., and Stanghellini.1988. Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 78:820-822.

Mohseni Chamazkoti S., Tajick Ghanbai M.A., and Abbasi M. 2011. Isolation and identification of *Rhizoctonia* spp. from cultivated soil in Mazandaran province. Plan Pathology 47: 149-150.

Naito S., and Kanematuso S. 1994.Characterization and pathogenicity of a new anastomosis subgroup AG-2-3 of *Rhizoctonia solani* Kuhn isolated from leaves of soybean. Annals of the Phytopathological Society of Japan 60:681-690.

Ogoshi A. 1987.Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific group of *Rhizoctonia solani*. Annual Review of Phytopathology 25:125-143.

Paulitz T. C., and Schroeder K. L. 2005. A new method for the quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* from soil. Plant Disease 89:767-772.

Sabahi F., and Banihashemi Z. 2014. Identification of pathogenic fungal and fungal like organisms of ornamental plants in shiraz**.** In preas.

Sneh B., Yamohah E., and Stewart A. 2004. Hypovirulent*Rhizoctonia* spp. Isolates from New Zealand soils protect radish seedlings against damping-off caused by *R. solani*. Plant Protection 57:54-58.

Steiner G. W. and Watson R. D. 1965. Use of surfectants in the soil dilution and plate count method. Phytopathol 55: 728-730.