بهینه جدا سازی و پراکنش گروه‌های آناستوموزی *Rhizoctonia solani* و تعیین منبع آلودگی گیاهان زینتی به آن در شیراز*

ریحانه رحیمی‌نژاد و ضیاالدین بنی‌هاشمی[1]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۳۰؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۶/۲)

چکیده

گونه‌ی *Rhizoctonia solani* با گروه آناستوموزی AG-2 و AG-4 مهم‌ترین بیمارگر گیاهان زینتی در شهرستان شیراز است، اما منبع آلودگی گیاهان زینتی به این قارچ کاملا مشخص نیست. در طی سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ از خزانه‌های گل‌ها و گیاهان زینتی شهرستان شیراز و حومه و دامنه‌ی کوه‌ها در منطقه‌ی باجگاه نمونه‌برداری انجام شد. نمونه‌ها شامل خاک‌های زراعی و غیر زراعی، کودهای حیوانی، برگی و کارخانه‌ای، خاک‌های مخلوط و آمیخته‌های خاکی شامل کوکوپیت و ورمی‌کمپوست بودند. جداسازی ریزوکتونیا از خاک با تغییراتی به روش طعمه‌گذاری به مدت ۷۲ ساعت با بذر جوشیده چغندرقند در دمای ۲۵°c و استفاده از محیط کشت PDA حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام PCNB، ۱۰۰ پی‌پی‌ام کلرامفنیکل و ۵۰ پی‌پی‌ام Hymexazole انجام شد. ۲۱۸ جدایه‌ی ریزوکتونیا از نمونه‌ها بدست آمد و ۱۹۳ جدایه چندهسته‌ای و ۲۵ جدایه، دوهسته‌ای بودند. گروهای آناستوموزی ۵۰ جدایه‌ی چندهسته‌ای تعیین شد. دوازده گروه آناستوموزی و در صد آنها شامل AG-4 (٪۳٦)، AG-2 (٪۱۸)، AG-1-1A (٪۱۸)، AG-2-2IIIB (٪٦)، AG-3 (٪٤)، AG-2-2 (٪٤)، AG-13 (٪٤)، AG-2-2C (٪۲)، AG-5 (٪۲)، AG-7 (٪۲)، AG-11(٪۲) در خاک‌های زراعی و AG-BI(٪۲) در خاک بکر بودند. منابع کودی، خاک‌های مخلوط و آمیخته‌های خاکی عاری از عامل بیماری بودند و منبع آلودگی، نشاءهای خزانه‌های گل‌ها و گیاهان زینتی تعیین شد.

کلیدواژه: ***Rhizoctonia solani*، گروه‌های آناستوموزی، منبع آلودگی،خاک، مواد آلی**

---

* بخشی ازپایان نامه نویسنده اول به دانشگاه شیراز

** مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: zia1937@gmail.com

۱. بخش گیاهپزشکی دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه شیراز

Optimaztion of isolation and distribution of anastomosis groups of *Rhizoctonia solani* and determination of sources of inoculums in ornamental plants in Shiraz*

R. Rahiminejad[1] and Z. Banihashemi[1]**

(Received: 20.1.2016; Accepted: 23.8.2016)

Abstract

Rhizoctonia solan AG-2 and AG-4 are main pathogens in ornamental plants in Shiraz but their sources of inoculum is not known. During 2013 and 2014 soil samples from different parts of Shiraz landscape, nurseries, sources of animal fertilizers, compost, vermin compost ,soil mix and Shiraz vicinities from cultivated and virgin soils were collected and assayed using sugar beet seeds as bait and plated on PDA supplemented with 100ppm PCNB and Chloramphenicole and 50ppm Hymexazole. 218 isolates of Rhizoctonia were recovered of which 193 multinucleate and 25 binucleate.Anastomosis groups of 50 multinucleate isolates were determined using 18 AG testers and the following AGs with their frequencies were found: Tweleve AGs included AG-4(36%), AG-2 (18%), AG-1-1A (18%), AG-2-IIIB(6%), AG-3, AG-2-2 and AG-13 (4%), AG-2-C, AG=5, AG-7 and AG-11(2%) in field soil and AG-BI (2%) in virgin soil. No Rhizoctoniawere recovered from in front of soil mix, animal fertilizers and composts used for potting and nurseries..It was concluded that transplants from nurseries are the main sources of inoculums.

Keywords: ornamentals, multinucleat binucleate Rhizoctonia,virgin soil,nursery

---

* A portion of MSc thesis by the first author submitted to Shiraz University.

** Corresponding author's E-mail: zia1937@gmail.com

1. Department of Plant Protection College of Agriculture Shiraz University Shiraz

مقدمه

ریزوکتونیا از جمله قارچ‌های بازیدیومیست خاکزی است که در خاک بصورت غیر یکنواخت وجود دارد (Sneh *et al.*,1995). روش‌های زیادی برای جداسازی این قارچ از خاک بکار برده شده است اما به دلیل پایین بودن جمعیت و رشد کند با مشکلاتی مواجه است. محیط کشت‌های انتخابی و نیمه انتخابی مختلفی برای جداسازی ریزوکتونیا از خاک پیشنهاد شده است Ko and Hora, 1971 Gangopadhyay and Grover 1985, Castro et al.1988,) استفاده ار طعمه‌های مختلف از قبیل بذ چغندر قند (Papaviza et al 1975) و خلال دندان(Paulitz and Schroeder, 2005)به عنوان طعمه مورد استفاده قرار گرفته شده است (Singletone et al. 1992).

گونه‌ی *Rhizoctonia solani* با گروه آناستوموزی AG-2 و AG-۴ مهم‌ترین بیمارگر گیاهان زینتی در شهرستان شیراز است (Sabahi and Banihashemi 2014)، به علت دشواری جدا سازی ریزوکتونیا از خاک منابع آلودگی گیاهان زینتی به این قارچ کاملا مشخص نیست. خاک و مواد آلی می‌توانند منبعی برای آلودگی گیاهان زینتی به ریزوکتونیا باشند. با استفاده از محیط کشت مناسب در این پژوهش ،منبع آلودگی، انواع خاک زراعی و غیر زراعی، خاک خزانه‌های گل‌های زینتی و منابع کودی مورد بررسی قرار گرفت. گروه‌های آناستوموزی ریزوکتونیا و مشخصات مورفولوژیکی جدایه‌ها تعیین شد و در نهایت برای تعیین بیماری‌زا بودن جدایه‌های بدست آمده، اصول کخ اجرا شد.

روش بررسی

در طی سال‌های ۱۳۹۲ و ۱۳۹۳ از خاک و منابع کودی خزانه‌های گل‌ها و گیاهان زینتی قصرالدشت، کفترک، داریون، باجگاه، پارک‌ها، بلوارها و میدان‌های شهرستان شیراز و دامنه‌ی کوه‌ها در منطقه‌ی باجگاه ۲۰۸ نمونه خاک جمع‌آوری شد. نمونه‌ها شامل خاک‌های زراعی و غیر زراعی، کودهای حیوانی، برگی و کارخانه‌ای، خاک‌های مخلوط و آمیخته‌های خاکی شامل کوکوپیت و ورمی-کمپوست بودند.

نمونه‌های خاک از الک دو میلی‌متری عبور داده و به مدت یک شبانه‌روز در دمای اتاق هواخشک شدند. چهل گرم از هر نمونه‌ی خاک با ۲۰ درصد رطوبت استفاده شد. بیست گرم آن درون ظرف‌های یکبار مصرف کاسه‌ای درب دار ریخته و ۶۰ عدد بذر جوشیده چغندرقند به عنوان طعمه، روی آن چیده و توری نایلونی با سوراخ‌های ریز روی آن گذاشته و بقیه‌ی ۲۰ گرم خاک روی آن ریخته و درب آن بسته شد. ظروف به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵^{oc} نگهداری و بذور پس از شستشو و ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم نیم درصد روی محیط کشت PDA حاوی ۱۰۰ پی‌پی‌ام PCNB و کلرامفنیکل و ۵۰ پی-پی‌ام Hymexazole کشت شدند. پرگنه‌های ریزوکتونیا پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت ظاهر شدند.

شمارش تعداد هسته در هر سلول و قطر ریسه‌ی جدایه‌ها به روش باندونی (Bandoni., 1979) انجام شد. از میان ریزوکتونیاهای چند هسته‌ای، پنجاه جدایه به روش کرولند و استنگلینی (Kroland and Stanghellinii,1988, Sneh et al. 1991) و با داشتن ۱۸ گروه آناستوموزی استاندارد، تعیین گروه آناستوموزی شد. مشخصات مورفولوژیکی شامل مشخصات پرگنه و اسکلروت و دمای بهینه‌ی رشد تعیین شد. از هر کدام از گروه‌های آناستوموزی تشخیص داده شده، یک جدایه برای تعیین دمای بهینه‌ی رشد انتخاب شدند. دماهای ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در نظر گرفته شد.به منظور اثبات

بیماری‌زایی جدایه‌ها،مایه‌ی گروه‌های آناستوموزی بااستفاده از ورمیکولیت و عصاره‌ی سیب زمینی و دکستروز(عصاره ۳۰۰ گرم سیب زمینی در لیتر و ۲۰ گرم دکسترز) به مدت چهار هفته تهیه شد. بذر نخود و چغندرقنددر گلدان حاوی ترکیبی از خاک و ماسه‌ی سترون به نسبت ۲:۱ کشت شدند.مایه‌ی قارچ به نسبت ۱:۱۰ با خاک رویی گلدان‌ها مخلوط شد. تعداد گیاهان مرده هر روز به مدت سه هفته بعد از مایه‌زنی شمارش و درصد گیاهان مرده محاسبه شد.

نتایج و بحث

برای جدا سازی ریزوکتونیا از خاک از روشها و محیط کشت‌های مختلف در این پژوهش استفاده گردید.استفاده مستقیم از محیط کشت‌ها و خلال دندان موفقیت‌آمیز نبود. از دماها زمانهای مختلف نگهداری در خاک و تعداد مختلف بذر جوشیده چغندر قند استفاده گردید و بهینه آن‌ها در این پژوهش استفاده گردید. محسنی و همکاران (Mosani et al. 2011) با استفاده از خلال دندان گروه‌های مختلف آنوستوموزی ریزوکتونیا از خاک‌های باغ‌ها و مزارع مازندران جدا سازی نمودند که ممکن است به علت جمعیت بالای آن در آن مناطق باشد.

در این پژوهش، از ۲۱۸ جدایه‌ی ریزوکتونیای بدست آمده با روش بذر جوشیده چغندر قند ، ۱۹۳ جدایه چندهسته‌ای و ۲۵ جدایه دوهسته‌ای بودند. قطر ریسه‌ی جدایه‌های دوهسته‌ای ۳ تا ۵ میکرومتر، پرگنه سفید پنبه‌ای و فاقد اسکلروت بود.۱۲ گروه آناستوموزی شامل AG-4 (۳۶٪)، AG-2 (۱۸٪)، AG-1-1A (۱۸٪)، AG-2-2IIIB (۶٪)، AG-3 (۴٪)، AG-2-2 (۴٪)، AG-13 (۴٪)، AG-2-2C (۲٪)، AG-5 (۲٪)، AG-7 (۲٪)، AG-11(۲٪) در خاک‌های زراعی و AG-BI (۲٪) در خاک بکر بودند.مشخصات مورفولوژیکی ۱۲ گروه آناستوموزی تعیین شد.میانگین قطر ریسه‌ی جدایه‌های چندهسته‌ای ۷ تا ۸ میکرومتر و میانگین هسته در هر سلول ۶ تا ۷ تعیین شد. دمای بهینه‌ی ۱۲ گروه آناستوموزی AG-4 ۲۵ċ، AG-2 ۲۵ċ، AG-1-1A ۳۰ċ، AG-2-2IIIB ۳۰ċ، AG-3 ۲۵ċ، AG-2-2 ۳۰ċ، AG-13 ۲۵ċ، AG-2-2C ۳۰ċ، AG-5 ۲۰ċ، AG-7 ۳۰ċ، AG-11 ۲۵ċ و AG-BI ۲۵ċ تعین شد.ویژگی‌های مورفولوژیکی گروه‌های آناستوموزی ریزوکتونیا، با یکدیگر اختلاف چشم‌گیری دارند. پرگنه‌ی AG-13 بصورت پنبه‌ای رشد می‌کند و دارای حلقه‌های متحدالمرکز منظم است که دارا بودن این دو ویژگی بطور همزمان در یک پرگنه، در میان گروه‌های آناستوموزی کاملا منحصر به فرد است. همچنین پرگنه‌ی AG-BI که دارای دوایر متحدالمرکز نامنظم و نزدیک به هم است، سفید و پودری بودن پرگنه‌ی AG-4، اسکلروت‌های بزرگ و معدود AG-1-1A که در اطراف یا چسبیده به بلوک قارچ تشکیل می‌شود و اسکلروت‌های AG-2-2IIIB که بصورت قطره‌های سیاه رنگ بر روی پرگنه تشکیل می‌شود، همگی ویژگی‌های منحصر به فردی هستند که در گروه‌های آناستوموزی دیگر وجود ندارد. ریزوکتونیا از منابع کودی، خاک‌های مخلوط و آمیخته‌های خاکی جداسازی نشد. آلودگی اصلی مربوط به نشاءهایی است که خزانه‌داران خریداری می‌کنند و در نهایت این نشاءها برای گلکاری در فضاهای سبز استفاده می‌شود که باعث انتقال و پخش این عامل بیماری به نقاط دورتر می‌شود.در گلخانه اولین علائم پس از چهار روز در چغندرقند و پس از یک هفته در نخود مشاهده شد. علائم در هر دو گیاه نخود و چغندرقند بصورت از پا افتادگی گیاهچه، تغییر رنگ در ناحیه‌ی طوقه و ریشه،

جدول ۱. درصد گیاهان مرده در اثر مایه‌زنی ۱۲ گروه آناستوموزی *Rhizoctonia solani* به گیاهان چغندرقند.

Table 1. % dead plants inoculated to 12 anastomosis groups (AG) of *Rhizoconia solani* to sugar beet and chickpea.

Chick pea	Sugar beet	AG
۴۴	۰	AG-1-1A
۵۵	۴۵.۶	AG-2
۸۸	۸۶	AG-2-2
۵۶	۵۳	AG-2-2C
۶۲	۶۵.۴	AG-2-2IIIB
۱۲.۴	۰	AG-3
۶۰	۴۵	AG-4
۲۷	۰	AG-5
۵۰.۴	۳۷	AG-7
۵۶	۲۹	AG-11
۳۴	۰	AG-13
۱۱.۴	۰	AG-BI

پوسیدگی ریشه و طوقه، از بین رفتن کامل تارهای کشنده و زخم یا شانکر در ناحیه‌ی طوقه متغیر بود. درصد گیاهان مرده محاسبه شد که در جدول ۱ آمده است.

در هر دو گیاه چغندرقند و نخود، بیشترین درصد گیاهان مرده در اثر مایه‌زنی AG-2 و زیرگروه‌هایش و AG-4 بود. گیاهان مرده در اثر مایه‌زنی AG-1-1A، AG-11 و AG-7 به نخود نیز درصد بالایی داشتند. بطور کلی *R. solani* یک گونه‌ی پلی‌فاژ است. دامنه‌ی میزبانی گروه‌های آناستوموزی آن تا حدودی مشخص شده است. بر اساس پژوهش‌های گذشته (Carling *et al.*, 2002) دامنه‌ی میزبانی AG-13، کلم، کاهو، پنبه، سیب‌زمینی، جو و ذرت (Tomaso-Peterson *et al.*, 2004) است، در این پژوهش AG-13 روی نخود، علائم ضعیفی شامل شانکرهای کوچک روی طوقه نشان داد. در بررسی منابع، چغندرقند میزبان AG-7 و AG-11 نبوده است اما در این پژوهش این دو گروه آناستوموزی روی چغندرقند علائم نشان دادند. در گیاهان چغندرقند مایه‌زنی شده با سایر گروه‌های آناستوموزی شامل AG-3، AG-5، AG-BI و AG-13 علائم دیده نشد اما پس از کشت روی محیط کشت PDA جداسازی شدند که نشان دهنده‌ی استقرار این گروه‌های آناستوموزی روی ریشه‌ی چغندرقند است. اما احتمالا چغندرقند میزبان آنها نبوده است.

منابع

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

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 *Rhizoctoniasolani*.Phtopathology 92:893-899.

Castro, C., Davis, J.R., and Wiese, M.V. 1988. Quantitative estimation of *Rhizoctonia solani* AG-3 in soil.Phytopathology 78: 1287-1292.

Gangopadhyay, S., and Grover, R.K. 1985.A selective medium for isolating *Rhizoctonia solani* from soil.Annual Review.Applied Biology.106: 405

Ko, W. H., and Hora, K. 1971. A selective medium for the quantitative determination of *Rhizoctonia solani* in soil. Phytopathology 61: 707-710.

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

Mohseni Chamazkoti, S., TajickGhanbari, M.A., and Abbasi, M. 2011. Isolation and identification of *Rhizoctonia* spp. from cultivated soil in Mazandaran province. PlantPathology47: 149-150.

Papaviza, G.C. Adams, P.B., Lumbsden, R.D. Lewis, J.A., Dow, R.L., Ayers, W.A. and Kantzes, J.G. 1975. Ecology and epidemiology of *Rhizoctonia solani* in field soil.Phytopathology 65:871-877.

Paulitz,T.C. and Schroeder K.L. 2005. A new method for quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* from soil. Plant Disease 89: 707-772.

Sabahi, F. and Banihashemi, Z. 2014. Identification of pathogenic fungal and fungal like organisms of ornamental plants in Shiraz. Iran. J. Plant Pathol. 50: 325-338.

Singleton, L. L., Mihail, J. D., and Rush, C. M. 1992.Methods for Research on Soil BornePhytopathogenicFungi.APS Press.USA265p.

Sneh, B., Burpee, L., and Ogoshi, A. 1991.Identification of *Rhizoctonia* species.The American PhythologicalSociety.St.Paul, MN 133 p.

Sneh, B., Suha Jabaji-Haire and Dijst, G. 1995. Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular, Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kluwer Akademic Published .578p.

Tomaso-Peterson,M.and Trevathan, L.E. 2004. *Rhizoctonia solani* AG-13 isolates from corn in Mississipi. Plant Disease 88: 908.