بسم الله الرحمن الرحیم

همه امتیازهای این پایان‌نامه به دانشگاه بوعلی‌سینا تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه بوعلی‌سینا (یا استاد یا اساتید راهنمای پایان‌نامه) و نام دانشجو با ذکر مأخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

دانشکده کشاورزی
گروه گیاه‌پزشکی

پایان‌نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌شناسی گیاهی

عنوان:

کنترل بیولوژیک باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی سیب‌زمینی توسط باکتری‌های آنتاگونیست در استان همدان

اساتید راهنما:

دکتر غلامرضا خداکرمیان

دکتر محمد جواد سلیمانی

استاد مشاور:

مهندس عزیز باقری

پژوهشگر:

نازنین یگانه‌راد

خرداد 1389

به نام خالق هستی بخش

آمدنم را در وادی آگاهی دستی نیرومند هدایت گر شد، هم آمدنم را، هم ماندنم را و هم برخاستنم را، او که در لحظه-

هایم جادارد. سپاسم را چگونه در آغوشت رها کنم که ذره بودنم در برابر دریا بودنت هویدا نشود از تو مدد می گیرم تا سپاسم

را بر تمامی آنانی که گامهای استوارشان و دستان پرمهرشان تکیه گاه خستگی راهم بود پیشکش کنم.

تقدیم به

پدر بزرگوارم که لحظه لحظه زیستنم را در سایه بزرگواری و دانایی اش آسودم

و عشق بی انتهای **مادرم** که دستان پر مهرش آرامش بخش روحم است.

خواهران نازنینم

که با مهربانی ها و عطوفت های بی کرانشان دوران تحصیل را برای من آسان نمودند و موفقیت و خوشبختی آن ها آرزوی قلبی من است.

دانش به تنهایی یک قدرت است ((فرانسیس بیکن))

تشکر و قدردانی

اکنون که به لطف و عنایت بی بدیل حضرتش، موفق به اتمام این تحقیق شدم، بر خود واجب می دانم از اساتید راهنمای بزرگوار و ارجمندم جناب آقای دکتر **غلام خدا کرمیان** و جناب آقای دکتر **محمد جواد سلیمانی** که در طول اجرای این پروژه همواره مرا از راهنمایی های خوبشان بی نصیب نگذاشتند، کمال سپاسگزاری و تشکر را داشته باشم. از جناب آقای دکتر **دوستمراد ظفری** و جناب آقای دکتر **جلال سلطانی** که زحمت باز خوانی و داوری این پایان نامه را پذیرفتند بسیار ممنون و سپاسگزارم. از استاد مشاور بزرگوارم، **جناب آقای مهندس باقری**، سپاسگزارم. از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی جناب آقای **دکتر دشتی** تشکر فراوان دارم.

همچنین از تمام همکلاسی های عزیزم و دانشجویان رشته بیماری شناسی گیاهی ورودی 85 و 87 و نیز تمامی کسانی که در انجام این پایان نامه مرا یاری دادند تشکر می کنم و برای آنان آرزوی سلامتی و موفقیت دارم.

نازنین یگانه راد

تیر 1389

دانشگاه بوعلی سینا

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌شناسی گیاهی

عنوان: کنترل بیولوژیک باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی سیب‌زمینی توسط باکتری‌های آنتاگونیست در استان همدان

نام نویسنده: نازنین یگانه راد

نام استاد/اساتید راهنما: دکتر غلام خداکرمیان و دکتر محمد جواد سلیمانی

نام استاد/اساتید مشاور: مهندس عزیز باقری

دانشکده: کشاورزی	**گروه آموزشی: گیاهپزشکی**	
رشته تحصیلی: بیماریهای گیاهی	**گرایش تحصیلی: باکتری شناسی**	**مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد**
تاریخ تصویب: ۱۳۸۷/۹/۸	**تاریخ دفاع: ۱۳۸۹/۳/۲۵**	**تعداد صفحات: ۱۲۵**

چکیده: سیب زمینی با تولید حدود ۳۰۰ میلیون تن در سال، چهارمین محصول مهم غذایی در جهان است. این گیاه در معرض بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و مایکوپلاسمایی زیادی است که به آن خسارت وارد می کنند. بیماری پژمردگی باکتریایی سیب‌زمینی ناشی از *Ralstonia solanacearum* یکی از مهمترین بیماری‌های این محصول است که از مناطق مختلف ایران گزارش شده است. بر اساس گزارش‌های موجود این بیماری در ایران توسط نژاد 3 (بیووار 2) باکتری ایجاد می‌شود. عامل بیماری با غده‌های آلوده بذری انتقال یافته و پس از استقرار در خاک، گیاهان سالم را در سال‌های بعد آلوده می‌کند. در این پژوهش،در بهار و تابستان 1387، نمونه‌های سیب‌زمینی آلوده به بیماری پژمردگی از مزارع مختلف استان همدان گردآوری شدند. مجموعاً 28 استرین باکتری *R. solanacearum* پس از کشت روی محیط PDA و محیط اختصاصی تری فنیل تترازولیوم کلراید TTC به دست آمد. برای شناسایی سریع و اختصاصی *R. solanacearum* از سه آغازگر اختصاصی استفاده شد. تکثیر DNA استخراج شده با استفاده از این سه آغازگر و ایجاد باندهای مورد نظر صحت شناسایی *R. solanacearum* را نشان داد. از بین این استرین‌ها 15 استرین بر اساس بیماری-زایی روی سیب‌زمینی رقم آگریا انتخاب شدند. یکی از استرین‌ها با بیماری‌زایی بالا جهت انجام آزمایشات کنترل بیولوژیک در شرایط گلخانه انتخاب شد. به منظور کنترل بیولوژیکی باکتری مذکور تعداد 150 استرین باکتری از خاک ناحیه ریزوسفر سیب‌زمینی با استفاده از روش‌های آزمایشگاهی رقیق‌سازی و کشت روی محیط غذایی NA و King B جداسازی شدند. اثر آنتاگونیستی این استرین‌ها بر اساس توانایی آنها در جلوگیری از رشد پاتوژن با استفاده از آزمون کشت سه نقطه‌ای و بخار کلروفرم و تشکیل هاله بازدارنده در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد بررسی قرار گرفت. از بین این استرین‌ها 40 استرین دارای خاصیت بازدارندگی بودند. از بین استرین‌های مورد بررسی هفت استرین به عنوان نماینده انتخاب و ویژگی‌های فنوتیپی آن‌ها تعیین شد. بر این اساس استرینNY32, NY31, NY30به عنوان *Bacillus subtilis* و استرین *NY33* به عنوان *Bacillus megaterium* و استرین NY20 به عنوان *Pseudomonas fluorescens* استرینNY21 به عنوان *Psudomonas putida* و استرینNY10 به عنوان *Rhizobium* sp. تشخیص داده شدند. استرین‌های NY32, NY31, NY30 و NY33 در شرایط آزمایشگاهی به ترتیب با میانگین قطر هاله بازدارنده 8/36، 8/31، 8/23 و 8/21 میلی‌متر دارای بیشترین تاثیر بودند. استرین‌های NY21, NY20 و NY10 به ترتیب با میانگین قطر هاله بازدارنده 7/57، 7/49 و 7/46 میلی‌متر دارای اثر بازدارندگی کمتری بودند. بررسی‌های گلخانه-ای روی سیب‌زمینی رقم آگریا در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی در سه تکرار انجام شد. پس از گذشت سه ماه فاکتورهای طول ساقه و ریشه، وزن‌تر، وزن خشک و شدت بیماری مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد تیمارهای مورد بررسی در سطح 1٪ دارای تفاوت معنی‌دار بودند. استرین NY30 در روش آغشته‌سازی غده با کاهش شدت بیماری

به میزان 65/78 درصد و در روش آغشته‌سازی خاک، با کاهش شدت بیماری به میزان 61/35 درصد بیشترین تاثیر را در افزایش وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی نشان داد. در هر دو روش استرین NY10 کمترین اثر را روی وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی نشان داد. به منظور مقایسه الگوی پروتئینی استرین‌های باکتری بیمارگر و استرین‌های باکتری آنتاگونیست پروتئین آن‌ها استخراج و در ژل اکریل‌آمید 12٪ الکتروفورز شد. در الگوی پروتئینی استرین‌های باکتری بیماری‌زا و استرین‌های آنتاگونیست تنوع مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیکی، *Bacillus sp.*، *Psudomonas sp.*، *Rhizobium sp.*، پژمردگی باکتریایی سیب-زمینی، PCR، الکتروفورز پروتئین.

فهرست مطالب | صفحه

مقدمه 1

1- بررسی منابع 6

1-1- باکتری *Ralstonia solanacearum* 6

1-1-1- مقدمه 6

1-1-2-موقعیت تاکسونومیکی 7

1-1-3- ویژگی های *Ralstonia solanacearum* 8

1-1-4-مکانیسم بیماریزایی *R. solanacearum* و عوامل موثر در آن 9

الف- پلی ساکاریدهای خارج سلولی(EPS) 10

1-1-5- تاکسونومی *Ralstonia solanacearum* 11

1-1-6- علائم بیماری پژمردگی باکتریایی ناشی از *R. solanacearum* 12

الف- علائم روی سیب زمینی 14

ب- علائم روی گوجه فرنگی 15

ج- علائم روی شمعدانی 16

د- روی توتون 17

1-1-7- چرخه بیماری پژمردگی باکتریایی سیب زمینی و اپیدمیولوژی آن 17

1-1-8- تشخیص و شناسایی *R. solanacearum* 19

1-1-9- راه های پراکنش باکتری *R. solanacearum* 21

1-1-10- اهمیت اقتصادی بیماری پژمردگی باکتریایی سیب زمینی 21

1-1-11میزبان های باکتری *R.solanacearum* 22

1-1-12- مدیریت بیماری پژمردگی باکتریایی سیب زمینی 23

1-2-کنترل بیولوژیک بیماری پژمردگی باکتریایی سیب زمینی 26

1-2-1-تاریخچه مبارزه بیولوژیکی 26

1-3- تعاریف و اصول کنترل بیولوژیک 27

1-3-1-عوامل موثر در کنترل بیولوژیک 28

الف-میزبان 28

ب-عامل بیماری 29

ج-آب وهوا 30

1-4- مکانیسم های دخیل در آنتاگونیسم 30

1-4-1- مایکو پارازیتیسم 30

1-4-2- شکارگری(Predation) 31

1-4-3-رقابت(Competition) 31

1-4-4- هیپوویرولانس(Hypovirulenc) 31

1-4-5- آنتی بیوز(Antibiosis) 31

1-5- کنترل بیولوژیک با استفاده از باکتری های باسیلوس 32

1-5-1-مکانیسم بازدارندگی گونه های باسیلوس 33
الف- تولید آنتی بیوتیک و مواد ضدقارچ 33
ب- تولید سیدرو فور 33
ج-تولید ترشحات مایع خارج سلولی 34
د- تولید ترکیبات فرار 34
1-6- سودوموناس های فلورسنت و نقش آنها در کنترل بیولوژیکی 34
1-6-1-مکانیسم های بیوکنترل سودوموناده‌ای فلورسنت 36
الف- آنتی بیوتیک 36
ب- سیدروفور 36
ج- سیانید هیدروژن 37
1-7- کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی توسط *Rhizobium sp.* 37
1-8- بررسی های ژنتیکی عوامل بیماریزای گیاهی 38
1-8-1- نشانگرهای مولکولی 38
1-8-2- نشانگرهای بیوشیمیایی 39

2-مواد و روش ها 41
2-1- نمونه برداری از مزارع آلوده سیب زمینی 41
2-2- جداسازی استرین های باکتری *R. solanacearum* 41
2-3- خالص سازی و نگهداری 42
2-3-1- خالص سازی و نگهداری استرین های باکتری *R. solanacearum* 42
2-4- شناسایی 43
2-4-1- شناسایی *Ralstonia solanacearum* 43
بررسی خصوصیات فنوتیپی 43
2-5- تهیه محیط کشت های مورد استفاده در آزمون های مختلف ویژگی های فنوتیپی باکتری ***R. solanacearum*** 44
2-5-1- محیط پایه گلوکز- پپتون- آگار 44
2-5-2- محیط Ayer 44
2-5-3- محیط TTC 44
2-6- آزمون بیماریزایی 44
2-6-1- آزمون بیماریزایی باکتری *R. solanacearum* 44
2-7- جداسازی باکتری های آنتاگونیست 45
2-8-نگهداری باکتری ها 46
2-9- محیط کشت‌های مورد استفاده برای جدایه های باکتری 46
2-9-1 - محیط کشت آگار مغذی (NA) 46
2-9-2 - محیط کشت King's B 46

2-9-3- محیط کشت شیر بدون چربی- آگار (SMA) 46
2-9-4- محیط پایه آیر 46
2-10- شناسایی باکتری های آنتاگونیست 47
2-10-1-آزمون های افتراقی جهت تشخیص جنس استرین های آنتاگونیست 47
2-10-2- آزمون های مورفولوژیک-فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جهت شناسایی استرین های *Rhizobium* 47
2-10-2- آزمون های مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی جهت شناسایی استرین های *Bacillus* 49
2-10-3.آزمون های مورفولوژیک-فیزیولوژیک و بیوشیمیایی جهت شناسایی استرین های *Pseudomunas* ..49
2-11-بررسی تولید متابولیتهای میکروبی موثر در خاصیت آنتاگونیستی 49
2-11-1-آزمون تولید پروتئاز 49
2-11-2-آزمون تولید سلولاز 50
2-11-3- آزمون تولید سیانید هیدروژن 50
2-11-4-آزمون تولید سیدروفور 50
2-12-غربال کردن باکتری ها در شرایط آزمایشگاهی به روش کشت سه نقطه ایی و بخار کلروفورم 51
2-13-تهیه مایه تلقیح 52
2-13-1-تهیه سوسپانسیون باکتری *R. solanacearum* 52
2-13-2-تهیه سوسپانسیون باکتری های آنتاگونیست 52
2-14- تعیین استرین های آنتاگونیست *R. solanacaerum* با استفاده از نتایج آزمایشگاهی و الکتروفورز پروتئین .53
2-14-1- استخراج پروتئین باکتری *R. solanacearum* 53
2-14-2- محلول های مورد نیاز برای استخراج پروتئین های محلول سلولی باکتری*R. solanacearum* 53
الف- بافر Tris-Hcl 1/5 مولار با pH 6/8 53
ب- تهیه بافر استخراج 54
2-15- استخراج پروتئین باکتری های آنتاگونیست 55
2-16-تهیه ژل اکریل آمید 55
2-16-1- ژل زیری 56
2-16-2- ژل رویی 56
2-17- رنگ آمیزی ژل اکریل آمید 57
2-17-1-تهیه محلول رنگ آمیزی 57
2-18-رنگ بری ژل اکریل آمید 57
2-18-1-تهیه محلول رنگ بر 58
2-19-نگهداری ژل 58
2-20- بررسی های گلخانه ایی 58
2-20-1- تهیه خاک و غده های سیب زمینی 58
2-20-2-کاشت غده های سیب زمینی و تلقیح عامل بیماریزا و باکتری های آنتاگونیست 58
الف- آغشته سازی غده های سیب زمینی با باکتری های آنتاگونیست و باکتری *R. solanacearum* 59

ب- آغشته سازی خاک با باکتری های آنتاگونیست و باکتری *R. solanacearum* 59
2-21-طرح آزمایش و آنالیز نتایج حاصل 60
2-22- استخراج DNA از استرین های باکتریایی و برای انجام واکنش PCR 61
2-23-1-آغازگرها 61
2-23-2- تنظیم شرایط برای PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی 62
2-23-3- بافر PCR ۱۰ برابر (10X) 63
2-23-4- کلرید منیزیم $MgCl_2$ 63
2-23-5- dNTPs 63
2-23-6- آنزیم Taq DNA polymerase 63
2-24- الکتروفورز فرآورده های تکثیر شده 64

3- نتایج و بحث 66
3-1-جداسازی و شناسایی 66
3-1-1- *Ralstonia solanacearum* 66
الف- ویژگی های فنوتیپی استرین های مورد بررسی 66
ب- واکنش فوق حساسیت در توتون 68
3-2-آزمون بیماریزایی 68
3-2-1- آزمون بیماریزایی باکتری *R . solanacearum* 69
3-3- فعالیت آنتاگونیستی و استرین های باکتری آنتاگونیست *R. solanacearum* در شرایط آزمایشگاهی 70
3-3-1- غربال کردن استرین های آنتاگونیست با استفاده روش کشت سه نقطه ایی و بخار کلروفورم 70
3-4- آزمون های شناسایی باکتری های آنتاگونیست 75
3-5- بررسی تولید متابولیت های میکروبی موثر در خاصیت آنتاگونیستی 76
3-5-1- آزمون تولید پروتئاز 76
3-5-2- آزمون تولید سلولاز 76
3-5-3- آزمون تولید سیانید هیدروژن 76
3-5-4- آزمون تولید سیدروفور 77
3-6- نتایج آزمون های گلخانه ایی 77
3-6-1- اثر جدایه های آنتاگونیست روی باکتری بیمارگر به دو روش آغشته سازی غده و آغشته سازی خاک ... 77
3-6-2- تاثیر استرین های آنتاگونیست علیه *R. solanacearum* روی سیب زمینی رقم آگریا 80
الف- روی طول ساقه 80
ب- روی طول ریشه 82
ج- روی وزن تر ساقه 84
د- روی وزن خشک ساقه 86
ه- روی وزن خشک ریشه 88
و- روی وزن تر ریشه 90

ز- اثر استرین های آنتاگونیست بر کاهش شدت بیماری 92
3-7- بحث در مورد بررسی اثر بیوکنترلی استرین های آنتاگونیست روی *R. solanacearum* 96
3-8- انجام واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی 760-759، PS96 H-PS96 I و OLI 1 -Y2. 102
3-8-1- نتیجه PCR با جفت پرایمرهای 760-759 102
3-8-2- نتیجه PCR با جفت پرایمرهای PS96I, PS96H 103
3-8-3- نتیجه PCR با جفت پرایمرهای OLI1, Y2 104
3-9- الکتروفورز پروتئین باکتری *R. solanacearum* و استرین های آنتاگونیست در ژل پلی آکریل آمید... 107
3-9-1- الگوی پروتیئین های الکتروفورز شده *R. solanacearum* 107
3-9-2- الگوی پروتیئین های الکتروفورز شده استرین های *Pseudomonas* sp. 108
3-9-3- الگوی پروتیئین های الکتروفورز شده استرین های *Rhizobium* sp. 108
3-9-4- الگوی پروتیئین های الکتروفورز شده استرین های *Bacillus* sp. 109
3-10- نتیجه گیری کلی 112
3-11- پیشنهادها 113

فهرست جداول **صفحه**

جدول 1-1- طبقه بندی *Ralstonia solanacearum* 7
جدول 1-2-طبقه بندی *R.solanacearum* بر اساس بیووار..... 13
جدول1-3-ویژگی نژادها ی *R. solanacearum* وارتباط آن ها با بیووارهای این باکتری 14
جدول2-1- مواد لازم جهت تهیه MIX1 54
جدول 2-2- شاخص اندازه گیری گیاهان سیب‌زمینی آلوده به *R. solanacearum* 60
جدول 2-3- پرایمرهای اختصاصی شناسایی باکتری *R. solanacearum* عامل پژمردگی باکتریایی سیب زمینی 62
جدول 2-4- آماده سازی محلول های پایه برای آغازگرهای اختصاصی جهت انجام واکنش PCR..... 62
جدول2-5-زمان و دمای لازم مراحل PCR با آغازگر اختصاصی 760-759 برای باکتری *R. solanacearum* 63
جدول 2-6- زمان و دمای لازم مراحلPCR با آغازگر اختصاصی PS96H- PS96I 64
جدول 2- 7- زمان و دمای لازم مراحل مختلف PCR با آغازگر اختصاصیOLI 1-Y2..... 64
جدول 3-1- ویژگی های فنوتیپی استرین های *R. solanacearum* جداشده از مزارع سیب زمینی همدان 66
جدول 3-2- آزمون های تعیین بیووار باکتری *R. solanacearum*..... 67
جدول 3-3- تجزیه واریانس اثر بازدارندگی استرین های آنتاگونیست روی پژمردگی باکتریایی سیب زمینی..... 70
جدول 3-4-بازدارندگی باکتریایی علیه *R. solanacearum* در آزمایشگاه با کشت سه نقطه ای و کلروفرم..... 72
جدول 3-5- ویژگی های فنوتیپی استرین های باکتری های آنتاگونیست *R. solanacearum*..... 75
جدول 3-6- مقایسه میانگین آنتاگونیست های *R. solanacearum* روی سیب زمینی در آغشته سازی غده..... 78
. جدول 3-7- مقایسه میانگین اثر آنتاگونیست های *R. solanacearum* روی سیب زمینی در آغشته سازی غده..... 78
جدول 3-8- مقایسه میانگین اثر آنتاگونیست های *R. solanacearum* روی سیب زمینی در آغشته سازی خاک.... 79
جدول 3-9- مقایسه میانگین اثر آنتاگونیست های *R. solanacearum* روی سیب زمینی ا در آغشته سازی خاک.. 79
جدول 3-10- تجزیه واریانس اثر استرین های آنتاگونیست روی طول ساقه در روش آغشته سازی غده..... 80
جدول 3-11- تجزیه واریانس اثر استرین های آنتاگونیست روی طول ساقه در روش آغشته سازی خاک..... 81
جدول 3-12- تجزیه واریانس اثر باکتری های آنتاگونیست روی طول ریشه درروش آغشته سازی غده. 82
جدول 3-13- تجزیه واریانس اثر باکتری های آنتاگونیست روی طول ریشه در روش آغشته سازی خاک 83
جدول 3-14- تجزیه واریانس اثر باکتری های آنتاگونیست روی وزن تر ساقه در روش آغشته سازی غده..... 84
جدول 3-15- تجزیه واریانس اثر باکتری های آنتاگونیست روی وزن ساقه در روش آغشته سازی خاک..... 85
جدول 3-16- تجزیه واریانس اثر باکتری های آنتاگونیست روی وزن خشک ساقه در آغشته سازی غده..... 86
جدول 3-17- تجزیه واریانس اثر باکتری های آنتاگونیست روی وزن خشک ساقه در آغشته سازی خاک..... 87
جدول 3-18- تجزیه واریانس اثر باکتری های آنتاگونیست روی وزن خشک ریشه در آغشته سازی غده..... 88
جدول 3-19- تجزیه واریانس اثر باکتری های آنتاگونیست روی وزن خشک ریشه در آغشته سازی خاک..... 89
جدول 3-20- تجزیه واریانس اثر استرین های آنتاگونیست وزن تر ریشه در روش آغشته سازی غده..... 90
جدول 3-21- تجزیه واریانس اثرباکتری های آنتاگونیست وزن تر ریشه در روش آغشته سازی خاک. 91
جدول 3-22- تجزیه واریانس اثر باکتری های آنتاگونیست روی کاهش شدت بیماری در آغشته سازی غده. 92
جدول 3-23- تجزیه واریانس اثر باکتری های آنتاگونیست روی کاهش شدت بیماری در آغشته سازی خاک. 93

شکل 3-1- ایجاد واکنش فوق حساسیت در توتون توسط دو استرین باکتری *R. solanacearum* 68
شکل 3-2- بیماریزایی باکتری *R. solanacearum* بوته گوجه فرنگی وبوته سیب زمینی..... 69
شکل 3-3- تاثیر استرین های باکتریایی آنتاگونیست علیه *R. solanacearum* در شرایط آزمایشگاه..... 73
شکل 3-4- تشکیل هاله بازدارندگی توسط استرین های باکتری های آنتاگونیست علیه *R. solanacearum*..... 74
شکل 3-5- تشکیل هاله روشن پروتئاز در اطراف پرگنه های *P. Flourescens* و *P. putida* 76
شکل 3-6- اثربازدارندگی استرین های آنتاگونیست روی *R. solanacearum* و طول ساقه سیب زمینی آگریا..... 81
شکل 3-7- اثر *R. solanacearum* و استرین های آنتاگونیست به تنهایی و با هم روی طول ریشه در سیب زمینی .. 83
شکل 3-8- اثر *R. solanacearum* و استرین های آنتاگونیست به تنهایی و با هم روی وزن تر ساقه سیب زمینی .. 85
شکل 3-9- اثر *R. solanacearum* و استرین های آنتاگونیست به تنهایی با هم روی وزن خشک ساقه سیب زمینی 87
شکل 3-10- اثر *R. solanacearum* و استرین آنتاگونیست به تنهایی و با هم روی وزن خشک ریشه سیب زمینی. 89
شکل 3-11- اثر *R. solanacearum* و استرین آنتاگونیست به تنهایی و با هم روی وزن تر ریشه در سیب زمینی . 91
شکل 3-12- اثر استرین های باکتری های آنتاگونیست در کاهش شدت بیماری در سیب زمینی رقم آگریا. 93
شکل 3-13 کشت سیب زمینی در گلخانه جهت انجام آزمون‌های گلخانه‌ای مربوط به اثر بازدارندگی باکتری ها..... 94
شکل 3-14 تاثیر استرین های آنتاگونیست بر فاکتورهای رشدی سیب زمینی رقم آگریا..... 95
شکل 3-15- واکنش PCR با پرایمر 760-759 جهت شناسایی باکتری *R. solanacearum*..... 102
شکل 3-16- واکنش PCR با پرایمر PS96H , PS96I جهت شناسایی باکتری *R. solanacearum*..... 103
شکل 3-17- واکنش PCR با پرایمر OLI1, Y2 جهت شناسایی باکتری *R. solanacearum*..... 104
شکل 3-18- الگوی پروتئین های استرین های *R. solanacearum* جدا شده از مزارع سیب زمینی استان همدان... 107
شکل 3-19- الگوی پروتئین های *Pseudomonas fluoresenct* و *P. putida* جدا شده از مزارع سیب زمینی 108
شکل 3-20- الگوی پروتئین های استرین های *Rhizobium sp.* جدا شده ازمزارع سیب زمینی استان همدان 108
شکل 3-21- الگوی پروتئین های استرین های *Bacillus sp.* جدا شده ازمزارع سیب زمینی استان همدان..... 109

پیش گفتار

تاثیر خسارت بیماری‌های گیاهی بر زندگی انسان از مسائل بسیار با اهمیت است. انسان از دیر باز فکر ابداع روش‌هایی مؤثر برای کنترل بیماری‌های گیاهی را در ذهن خود می‌پرورانده و در این راه گرچه به موفقیت‌هایی دست یافته است اما عمده روش‌های کنترل بیماری‌های گیاهی مبتنی بر استفاده از سموم شیمیایی در سطح وسیع بوده است. در صورت ادامه روند کنونی مصرف بی-رویه سموم و کودهای شیمیایی باید منتظر عواقبی وخیم برای سلامت و بهداشت جامعه بشری باشیم.

مقدمه

سیب زمینی‌ها (*Solanum tuberosum*) گیاهان غده‌ای هستند. این گیاهان از زمانی که اسپانیائی‌ها به کشورهای آمریکای جنوبی مانند پرو ، بولیوی و شیلی قدم نهادند شناخته شدند و در قرن شانزدهم کشورهای انگلستان، هلند، اسپانیا، ایتالیا و فرانسه از گیاهان غده‌ای که از آمریکا آورده شده بود سیب زمینی را به‌دست آوردند. تاریخچه کشت این گیاه در قاره آفریقا به حدود 50 سال پیش برمی‌گردد. حدود 200 سال پیش (در زمان فتحعلیشاه قاجار) مقداری بذر سیب-زمینی به ایران آورده شد. این بذرها ابتدا در یکی از روستاهای تهران کاشته شده و سپس به فریدن اصفهان و به تدریج به سایر نقاط کشور برده و کشت شد (شجاعی[1]، 1383).

الف: ویژگی‌های گیاه سیب‌زمینی:

سیب‌زمینی ازخانواده *Solanaceae* و جنس *Solanum* و نام علمی آن *S. tubersom* است. جنس *Solanum* شامل 2000 گونه وحشی و زراعی است که در سراسر جهان به ویژه در نواحی گرمسیر و نیمه گرمسیر پراکنده است و حدود 150 گونه آن غده تولید می‌کند. سیب-زمینی گیاهی دائمی است که قسمت‌های هوایی آن در اثر سرمای زمستان از بین می‌رود ولی غده‌های موجود در خاک سالم می‌مانند و در بهار سال بعد تولید شاخ و برگ می‌کنند. غده سیب-زمینی در انتهای ساقه‌های نازک زیرزمینی یا ریزوم که از محل طوقه گیاه جوان یا قسمتی از ساقه هوایی که در خاک قرار گرفته تولید می‌شود. ازدیاد سیب‌زمینی توسط بذر هم امکان پذیر است ولی بوته‌ایی که از بذر به‌دست می‌آید محصولی شبیه بوته مادری تولید نمی‌کند.

سیب‌زمینی‌های زراعی شامل تعدادی گونه یا به عبارت بهتر هیبریدهای بین گونه‌ای هستند که همگی به تیره سولاناسه[2] تعلق دارند. متداول‌ترین هیبرید سیب‌زمینی، تتراپلوییدی ($2n = 4x$)

[1] shojai
[2] solanaceae

(48 با نام علمی *Solanum tuberosum* است. این گیاه دو لپه‌ای، یک ساله و علفی است که به علت تکثیر از طریق غده‌ها ظرفیت بالقوه چند ساله بودن را دارد. این گونه زیر گونه‌هایی دارد که از مهم‌ترین آنها می توان به *tuberosum* و *andigena* اشاره کرد. گل‌ها در این گونه پنج قسمتی، به رنگ‌های مختلف، خامه و کلاله ساده و تخمدان دو خانه‌ای است. گرده اصولا" با باد انتقال یافته و خودگشنی در این گیاه بسیار شیوع دارد و دگرگشنی نسبتا" نادر است و در صورت وقوع، احتمالا" حشرات در آن دخالت دارند. دیپلوییدها بجز چند استثنا خود ناسازگارند. میوه‌ها گرد تا تخم مرغی و دوخانه‌ای به رنگ‌های مختلف بوده اما در هنگام رسیدن قرمز تا بنفش می-شوند. ساقه معمولا" سبز است اما می‌تواند قرمز تا ارغوانی ، زاویه‌دار و غیر چوبی باشد. با وجود این در اواخر فصل رشد، قسمت‌های تحتانی می‌توانند نسبتاً چوبی شوند(هوکر[1]، 1990).

ب- شرایط محیطی

سیب‌زمینی به طور مشخص متعلق به مناطق معتدل سرد با ارتفاع تقریبی 2000 متر یا ارتفاعات بالاتر در مناطق گرمسیری است. این گیاه به شب‌های خنک و خاک دارای زهکشی مناسب و رطوبت کافی نیاز دارد و در عرض‌های جغرافیایی پایین در مناطق گرم تولید خوبی ندارد. خاک لومی- شنی حاصلخیز برای این گیاه مناسب است. دمای مناسب برای رشد 15 الی 20 درجه سلسیوس است و دمای بالای 29 درجه سلسیوس تولید غده را کاهش می‌دهد. این محصول تا انتهای دوره رشد به 7 الی 9 بار آبیاری نیاز دارد(هوکر، 1990)[2]

ج- اهمیت اقتصادی سیب‌زمینی

سیب‌زمینی مهم‌ترین گیاه دو لپه‌ای است که به عنوان منبع غذایی انسان‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این گیاه بعد از گندم، برنج و ذرت چهارمین محصول مهم غذایی در جهان است. میزان تولید ماده خشک سیب‌زمینی در واحد سطح با ضرایب 3/04، 2/68 و 1/12از گندم، جو و ذرت بیشتر است. مقدار پروتئین آن نیز بیشتر از گندم، جو و ذرت است(هوکر، 1990).

بعد از ذرت، سیب‌زمینی دارای گسترده‌ترین سطح زیر کشت در دنیاست. بر اساس آمارنامه-های مختلف، این محصول در حدود 140 کشور کشت می‌شود که بیش از صدکشور آن در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری واقع شده اند. بیشترین تولید در مناطق معتدله کشورهای صنعتی متمرکز است. تقریباً یک سوم این محصول در کشورهای در حال توسعه (عمدتا" در کشورهایی در آسیا) تولید می‌شود. کمتر از نیمی از کل سیب‌زمینی تولید شده برای مصارف انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. استفاده از سیب‌زمینی برای تولید نشاسته در هلند، اروپای شرقی و ژاپن رواج دارد.

[1] Hooker
[2] Hooker

سطح زیر کشت سیب‌زمینی در ایران و جهان

مناطق عمده کشت سیب‌زمینی در ایران عبارتند از: مناطق سردسیر مانند اردبیل، تبریز، شاهرود، دماوند، همدان و مشهد که حدود 80 درصد از محصول کشور در این مناطق تولید می‌شود. مناطق نیمه‌گرمسیر مانند گرگان و حومه شهرستان اصفهان و مناطق گرمسیر مانند هرمزگان، خوزستان و جیرفت که حدود 15 درصد محصول کشور را تولید می‌کنند.

طبق آمار سازمان خوار و بار جهانی کشاورزی (FAO)[1] در سال 2007، میزان تولید کل سیب‌زمینی در جهان 321736483 تن گزارش شده که بیشترین سهم مربوط به چین[2] با 72040000 تن و کمترین میزان مربوط به بنین[3] با تولید 30 تن است. سهم ایران 5240000 تن است. در قاره آسیا تولید کل 135607646 تن بوده و چین و بحرین به ترتیب بیشترین و کمترین تولید را دارا هستند.

د- بیماری‌های سیب‌زمینی:

هر گیاهی در طول دوره رشد خود دستخوش آسیب‌های مختلف ناشی از شرایط محیطی نامناسب (آب و هوا، نور، رطوبت و خاک)، حمله آفات و عوامل بیماری‌زا (قارچ، باکتری، ویروس، نماتد و مایکوپلاسما) است. در واقع بیماری به برهم‌کنش بین میزبان و بیمارگر گفته می‌شود که تولید و قابلیت استفاده محصول را دچار مشکل می‌کند. شرایط محیطی نامساعد حتی در غیاب عامل بیماری‌زا به تنهایی برای صدمه به گیاه کفایت می‌کند.

از جمله بیماری‌های قارچی مهم می‌توان به شانکر رایزوکتونیایی ناشی از *Rhizoctonia solani*، پژمردگی‌های فوزاریومی و پوسیدگی ریشه فوزاریومی ناشی از گونه‌های *Fusarium*، پژمردگی ورتیسیلیومی ناشی از *Verticillium albo-atrum*، پوسیدگی ساقه ناشی از *Sclerotium rolfsii*، کپک سفید ناشی از *Sclerotinia sclerotiorum*، پوسیدگی صورتی با عامل *Phytophthora erythroseptica*، لکه موجی ناشی از *Alternaria solani* و خال سیاه ناشی از *Colletotrichum coccodes* اشاره کرد.

باکتری‌های *Pectobacterium carrotovorum subsp.carotovora* عامل ساق سیاه، *Erwinia* spp. عامل ایجاد پوسیدگی نرم، *Streptomyces scabies* عامل اسکب و *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی باکتریایی از جمله عوامل باکتریایی زیان‌آور سیب‌زمینی هستند. نماتد طلایی سیب‌زمینی (*Globodera rostochinensis*)، نماتد مولد

[1] Food and Agricultural Organization
[2] China
[3] Benin

زخم غده (*Pratylenchus penetrans*) و ویروس X سیب‌زمینی از جمله عوامل بیماری‌زای دیگر در سیب‌زمینی به شمار می‌آیند.

ه- اهمیت موضوع تحقیق

بیماری‌های زیادی به سیب‌زمینی آسیب می‌رسانند از جمله بیماری پژمردگی باکتریایی ناشی از *R. solanacearum* که یکی از اهم این بیماری‌ها است. ازآنجاکه استان همدان یکی از مراکز مهم سیب‌زمینی‌کاری کشور محسوب می‌شود و باکتری *R. solanacearum* از عوامل بیماری‌زای مهم این گیاه در این منطقه است، انجام تحقیقی پیرامون آن ضروری به نظر رسید. طبق گزارش سازمان جهاد کشاورزی استان همدان، این عامل در مزارع سیب‌زمینی استان وجود داشته و خسارات قابل توجهی(حدود 40 درصد) را به این محصول وارد می‌سازد. به دلیل اینکه تکثیر سیب‌زمینی با استفاده از غده صورت می‌گیرد و همچنین این بیمارگر توسط غده نیز منتقل می‌شود و احتمال آلودگی خاک نیز حتماً وجود دارد، بسته به شرایط، تقریباً هر ساله با این بیماری مواجه هستیم. کنترل شیمیایی با فومیگانت‌ها و آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند: Streptomycin ، Ampicillin، Penicillin انجام می‌شود که مشخص شده اثر بازدارندگی اندکی در کنترل این بیماری دارند (موراکوشی و تاکاهاشی.[1] ، 1984) و علاوه بر هزینه زیاد سبب آلودگی زیست محیطی و اثرات سو بر زندگی انسان می‌شود. تناوب زراعی 6-5 ساله با میزبان‌های غیرحساس نیز برای کنترل بیماری پیشنهاد شده است(اسمیت[2]، 1999). برای سیب‌زمینی کاهش pH به 4 تا 5 در تابستان و افزایش آن به 6 در پاییز نیز پیشنهاد شده است (اسمیت 1999). اما امروزه بهترین روش کنترل، کنترل بیولوژیک است. کنترل بیولوژیکی عبارتست ازکاهش اینوکولوم یا فعالیت بیماری‌زایی یک پاتوژن که از راه یک یا چند آنتاگونیست، حتی خود گیاه میزبان، و بدون دخالت انسان انجام می‌شود(بیکر[3]، 1987).

با توجه به این‌که بیشترین اقدامات بیوکنترل در خاک انجام می‌گیرد، ریزجاندارانی که در فراریشه رشد می‌کنند برای استفاده به عنوان عوامل بیوکنترل مناسب هستند چون ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه در برابر حمله پاتوژن‌ها است. باکتری‌های زیادی با پتانسیل بیوکنترل معرفی شده‌اند که نقش آن‌ها در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی به اثبات

4 Murakoshi
5 Smith
[3] Baker

رسیده است. در این میان باکتری‌های جنس سودوموناس و باسیلوس از اهمیت بسزایی برخوردارهستند.

کنترل بیماری پژمردگی باکتریایی با تاثیر مثبت برروی سیب‌زمینی و افزایش فاکتورهای رشدی می‌تواند باعث افزایش میزان این محصول در منطقه شود. بنابراین در این تحقیق تعیین استرین‌های باکتری *R. slanacearum* و تعیین باکتری‌های مهم آنتاگونیست این بیمارگر در خاک‌های مزارع سیب‌زمینی استان همدان جهت کنترل بیولوژیکی ضروری به نظر می‌رسد.

تقریباً همه بیمارگرهای گیاهی دارای تنوع درون‌گونه‌ای و بین‌گونه‌ای هستند. این تنوع با تکنیک‌های مختلف قابل بررسی است. این تکنیک‌ها به سه دسته تقسیم می‌شوند: روش‌های مبتنی بر ویژگی‌های ظاهری،روش‌های مبتنی بر DNA و روش‌های مبتنی بر پروتئین.

الکتروفورز پروتئین(SDS-PAGE)[1] یکی از روش‌های مورد استفاده در گروه‌بندی استرین‌ها و محصول ژن‌های کلون شده است. به منظور بررسی الگوی پروتئینی موجودات مختلف، پروتئین آن‌ها استخراج و در ژل پلی‌اکریل آمید در میدان الکتریکی قرار داده می‌شود. پروتئین‌ها بر اساس وزن مولکولی در داخل ژل از هم جدا می‌شوند. پس از طی رنگ‌آمیزی و رنگ‌بری، باندهای پروتئینی در ژل قابل رویت بوده و می‌توان آن‌ها را به منظورهای خاص از جمله گروه‌بندی استرین‌ها مورد بررسی قرار داد.

[1] Sodium dodecyl polyacrylamid gel electrophoresis