



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

تنوع ژنتیکی و بیماریزایی جدایه های *Verticillium dahliae* از
درختان پسته استان کرمان و واکنش ارقام *Pistacia vera*
نسبت به بیمارگر

بوسیله

۱۳۸۲ / ۶ / ۳۰

ایمان هادی زاده

پایان نامه

ارائه شده به معاونت تحصیلات تکمیلی به عنوان بخشی از فعالیتهای تحصیلی لازم برای
اخذ درجه کارشناسی ارشد

در رشته

بیماری شناسی گیاهی

از

دانشگاه شیراز

شیراز، ایران

مرکز اطلاعات مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

ارزیابی و تصویب شده توسط کمیته پایان نامه با درجه: عالی
امضاء اعضاء کمیته پایان نامه:

.....
دکتر ضیاء الدین بنی هاشمی، استاد بخش گیاهپزشکی (رئیس کمیته)

.....
دکتر کرامت الله ایزدپناه، استاد بخش گیاهپزشکی

.....
دکتر محمد تقی آساد، دانشیار بخش زراعت و اصلاح نباتات

شهریور ۱۳۸۱

تقدیم به خوبا زنگیم

مادر بزرگ پرمهر و عزیزم

به خاطر تمامی آرزوهائی که فرصت دیدنشان مرا نداشت

۱۳۸۲ / ۱۶ / ۳۰

مادر صبور و مهربانم

که نسیم سخنهايش نبض هر لحظه نرندگي در من است و در نریر با مران ابرشمين

نگاهش، چون جلگه اي سبز، نرنده و شاداب مي شور.

پدر مهربان و عزیزم

که سایه بان مهرش پناه من و راستاي قامتش تکیه گاهم. با عطر نجیب او من اثر

عطر افشاني تمام گلها بي نیازم.

گوهرهای بی مثال زنگیم، علی، سامی

که قلبهايشان لبریز از محبت و صداقت، گل و اثرهاي نر بانسان عشق و ايتار و حضورشان چون

ماه، روشني بخش شبهاي تار تهايي است.

شمع های روشنی بخش زنگیم، الهام، احلام

گلهاي سپيدي که با صفا، يکرنگي و مهرباني شکوفه هاي دلگرمي و اميد مرا با

گلبرك نر بياي لطف و محبت به من هديه دادند.

سپاسگزاری

سپاس بی کران خدای راست که دستانم را توان نوشتن از اوست تا به انجام رسانم هر آنچه را که با یادش آغاز کردم.

سپاس آنان را که روشنای ردای علمشان نردبان ناجی نادانی است ، آنان که معلم میثاق مهرند و شکوفاگر شاخه های شباب اندیشه .

اگر چه در کلام نمی گنجد، ژرفترین سپاس خود را از زحمات بی شائبه استاد فاضل و بزرگوارم جناب آقای دکتر ضیاء الدین بنی هاشمی که امروز در سایه رهنمودهای عالمانه و توجه پدرانیه شان توانسته ام گامی کوچک در پهنشدت لایتناهی علم و معرفت بردارم، ابراز می دارم و لطف بی دریغ و منتش را سپاس می گویم . همچنین شایسته است از اساتید عالیقدر جناب آقای دکتر کرامت اله ایزدپناه و آقای دکتر محمد تقی آساد که در این راستا مدیون و مرهون ارائه نظریات ارزشمند ، همت عالمانه و ارشادات حکیمانه آنها بوده و هستم صمیمانه تشکر و قدردانی نمایم.

در این مجال فرصت را غنیمت شمرده از اساتید گرانقدر جناب آقای دکتر علیرضا افشاریفر ریاست محترم بخش گیاهپزشکی و آقای دکتر سید محسن تقوی نماینده محترم تحصیلات تکمیلی که در کمال تواضع و فروتنی همیشه مشکل گشای بنده در طول دوران تحصیلات دانشگاهی بودند، سپاسگزاری کنم.

بسیار بجاست از دکتر R.C.Rowe عضو هیئت علمی دانشگاه ایالتی اوهایو، آمریکا جهت اهداء موتانت های نیت گروههای سازگاری رویشی مرجع (OARDC) و محققین محترم موسسه تحقیقات پسته جهت ارسال بذر ارقام مختلف پسته تقدیر و تشکر کنم. از تمامی اساتید، کارکنان و تکنسین های محترم بخش گیاهپزشکی ، خانمها، مهندس شهربانو پروین، لیلا اکبرزاده، فرنگیس شیرازی و آقای غلامعلی زارع که هر یک به نحوی در تکمیل این تحقیق یاریم دادند، سپاسگزارم . از خانم مهندس سارا علیپور خواهری که در تمام طول این دوران با کوشش بسیار ، بزرگوارانه مرا یاری نموده کمال تشکر و امتنان را دارم.

همچنین از همکاری و صمیمیت دوستان عزیزم، آقای مهندس امیر حسین محمدی، مهندس عباس شرزده ای ، مهندس محمد صادق صادقی، مهندس محمد زکی عقل و خانم مهندس معصومه حقدل که با پشتیبانی و کمک های سازنده مراتب دلگرمی و امید را برای من فراهم نموده اند بسیار سپاسگزارم و برای تک تک آنها سعادت ، کامروائی و سرانجام نیک را آرزو می کنم .

و بالاخره آنچه نه انکار پذیر است و نه فراموش شدنی ، محبت ، بزرگواری و تلاش دو شمع پرفروغ زندگی ، پدر و مادر عزیزم است که زمینه رشد و شکوفایی اندیشه ام را فراهم نمودند. نیاز من بوسیدن دستهای سخاوتمند آنهاست رخصت می خواهم که در پیشگاه مهربان آنها بنشینم، زانو بزنم و بگویم : تمام آنچه که بودم، هستم و خواهم بود همه و همه مدیون شماست .

چکیده

تنوع ژنتیکی و بیماریزایی جدایه های *Verticillium dahliae* از درختان پسته استان کرمان و واکنش ارقام *Pistacia vera* نسبت به بیمارگر

توسط:

ایمان هادی زاده

قارچ *Verticillium dahliae* یکی از مهمترین عوامل پژمردگی آوندی در طیف وسیعی از گونه های گیاهی از جمله پسته می باشد که دارای اختصاصیت میزبانی اندک و گسترش جغرافیایی وسیع است.

هفتاد جدایه تیپ وحشی *V. dahliae* در بین سالهای ۱۳۷۹ تا ۱۳۸۰ از درختان پسته استان کرمان جداسازی شد.

سازگاری رویشی محلی این جدایه ها باتلاقی موتانت های نیت مکمل و نماینده جدایه های مختلف در کلیه ترکیبات ممکن ($nit1 \times nitM$ ، $nit1 \times nit3$ و $nit3 \times nitM$) مشخص گردید. سه گروه محلی شناسایی و بصورت VCGA (۶۱ جدایه)، VCGB (۷ جدایه) و VCGC (۲ جدایه) نشان داده شدند. این نتایج نشان دهنده الگویی از تنوع ژنتیکی محدود در میان جمعیت *V. dahliae* از درختان پسته می باشد.

در این مطالعه، گروههای سازگاری رویشی (VCGs) مجموعه ای از ۱۱۳ جدایه بدست آمده از ۷ گونه گیاهی میزبان و خاک با استفاده از ۱۱ موتانت نیت مرجع

VCG های مختلف (OARDC) توصیف شده توسط Rowe و Joaquim (1990) (اهدائی دکتر R. C. Rowe، دانشگاه ایالتی اوهایو، ووستر، آمریکا) مورد بررسی قرار گرفت. تنوع پائینی از VCG ها مشاهده شد و تمام جدایه ها در یکی از سه گروه VCG2B، VCG4A و VCG1 جای گرفتند. در برخی موارد، زمانی که جدایه ها با جدایه های نماینده از دو گروه استاندارد مختلف سازگار بودند، میزانی از همپوشانی بین VCG ها دیده شد. واکنش مکمل سازی قوی در تلاقی VCGA محلی از پسته با VCG2B بین المللی، VCGB محلی با VCG4A و VCGC محلی با VCG1 دیده شد. یازده جدایه به دلیل خود ناسازگاری، عدم تولید سکتور و موتانت نیت یا تولید موتانت هائی که واکنش منفی با همه موتانت های نیت مرجع و سایر جدایه ها نشان می دادند در هیچ VCG خاصی قرار داده نشدند. جدایه های برگریز و غیر برگریز پنبه بطور مشخص به گروه های سازگاری رویشی متفاوتی تفکیک یافتند.

در مطالعه تاثیر سطوح غلظت کلرات و نوع محیط کشت (WAC، MMC، CMC) بر سکتوردهی و میزان تولید موتانت نیت نشان داده شد که میزان تولید سکتور همواره با بیشتر شدن غلظت کلرات افزایش نیافت اما نسبت موتانت های نیت بدست آمده از این سکتورها و تعداد واقعی آنها در هر محیط کشت بطور معنی داری با بالا رفتن غلظت کلرات تا ۷٪، افزایش یافت. محیط کشت WAC حاوی ۳٪ - ۵٪ کلرات حدوداً دو برابر بیشتر از CMC کارآمد و فراوانی تولید موتانت *nitM* در این محیط در مقایسه با سایر محیط ها بیشتر بود.

آزمون بیماریزایی ۲۰ جدایه بر روی دو میزبان افتراقی پنبه و بامیه در شرایط گلخانه نشان داد که همه جدایه های پنبه در VCG1، ویروالانس بالا بر روی هر دو میزبان داشتند و تیپ برگریز بودند. اما جدایه های متعلق به VCG2B و VCG4A از نظر شدت بیماریزایی همگون نبوده و میزان انحراف ویروالانس تعدادی از جدایه ها از متوسط گروه موجب یک همپوشانی یا پیوستگی بین VCG ها شد. این گروه از جدایه ها بصورت غیر برگریز یا نسبتاً برگریز بر روی پنبه و برگریز بر روی بامیه توصیف شدند. جدایه های پسته در VCG1، VCG4A و VCG2B، روی پنبه ویروالانس خفیف تا متوسط و گاهی شدید و روی بامیه ویروالانس متوسط تا شدید را سبب شدند.

در بررسی واکنش ۱۰ رقم تجاری پسته به *V. dahliae* با مایه زنی دانه‌های شش ماهه در شرایط گلخانه (۵۰ میکرواسکلروت در هر گرم خاک خشک)، سه گروه متمایز تشخیص داده شد. ارقام اوحدی، بادامی راور و بادامی ریزرنند که دارای پائین ترین و ارقام سبز پسته نوق، خنجری دامغان و احمد آقایی که دارای بالاترین شاخص شدت بیماریزایی، شاخص قهوه ای شدن ، درصد کاهش ارتفاع گیاه، درصد کلنیزاسیون ساقه و مرگ بودند به ترتیب بصورت گروه متحمل و بسیار حساس ارزیابی شدند. در مقابل ، ارقام سرخس، اکبری و کله قوچی که از نظر آماری در حد واسط دو گروه قبل بودند بصورت حساس در نظر گرفته شدند.

همکنش بین ارقام پسته و جدایه های *V. dahliae* نشان داد که شاخص شدت بیماریزایی و درصد کلنیزاسیون جدایه های برگریز از جدایه های غیر برگریز بیشتر است. بنابراین جدایه ها درجه متفاوتی از بیماریزایی را بر روی ارقام ایجاد نمودند.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
هفت	فهرست مطالب
دوازده	فهرست جدول ها
شانزده	فهرست شکل ها
۱	فصل اول: مقدمه
۷	فصل دوم: مروری بر پژوهش‌های گذشته
۷	۱-۲- بیولوژی و گیاه‌شناسی پسته
۸	۱-۱-۲- ارقام پسته در ایران
۱۰	۲-۲- بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی و عامل مولد آن
۱۲	۱-۲-۲- چرخه بیماری
۱۳	۲-۲-۲- علائم بیماری
۱۴	۳-۲- مبارزه
۱۵	۱-۳-۲- کاربرد ارقام مقاوم
۱۹	۴-۲- تخمین جمعیت قارچ در خاک
۲۲	۵-۲- ژنتیک
۲۲	۱-۵-۲- هتروکاریوزیس و چرخه پراجنسی
۲۴	۲-۵-۲- مکانیسم ژنتیکی سازگاری رویشی

- ۲۷ ۴-۵-۲- پایداری هتروکاریون
- ۲۷ ۵-۵-۲- موتانت (Mutant) و موتاسیون زایی (Mutagenesis)
- ۲۹ ۶-۵-۲- انواع موتانتها
- ۳۴ ۷-۵-۲- گروه‌های سازگاری رویشی در *Verticillium*
- ۴۰ ۸-۵-۲- گروه‌های سازگاری رویشی و پاتوتیپ
- ۴۵ ۹-۵-۲- سازگاری رویشی و نشانگرهای مولکولی

فصل سوم: روش و مواد تحقیق ۴۸

- ۴۸ ۱-۳- جدایه‌های قارچ
- ۴۸ ۲-۳- نمونه برداری و جداسازی از بافت درختان بیمار
- ۴۹ ۳-۳- خالص سازی و نگهداری جدایه‌های قارچ
- ۵۰ ۴-۳- تشخیص گونه قارچ
- ۵۰ ۵-۳- بررسی گروه‌های سازگاری رویشی

۱-۵-۳- تعیین غلظت بهینه کلرات و کارایی سه محیط کشت کلرات‌دار

- ۵۰ مختلف جهت تولید موتانت نیت
- ۵۱ ۲-۵-۳- تولید موتانت های نیت
- ۵۲ ۳-۵-۳- تعیین کلاس فنوتیپی موتانت‌های نیت
- ۴-۵-۳- بررسی میزان بازگشت موتانت‌های نیت به حالت وحشی
- ۵۳ (پایداری موتانت‌ها)
- ۵-۵-۳- بررسی گروه‌های سازگاری رویشی جدایه های *V. dahliae*
- ۵۳ از پسته

- ۳-۵-۶- مقابله موتانت‌های نیت با موتانت‌های مرجع و بررسی ارتباط بین
 ۵۷..... VCG محلی با VCG‌های مرجع
- ۳-۵-۷- آزمون بیماری زایی ۵۸.....
- ۳-۶-۶- بررسی واکنش ارقام مختلف پسته آلوده به قارچ *Verticillium dahliae* ۶۰.....
- ۳-۶-۱- انتخاب ارقام ۶۰.....
- ۳-۶-۲- کشت بذر و تولید دانهال ۶۱.....
- ۳-۶-۳- تهیه میکرواسکروت قارچ ۶۲.....
- ۳-۶-۴- مایه زنی دانهال‌ها ۶۴.....
- ۳-۶-۵- روش ارزیابی ۶۵.....
- ۳-۶-۶- بررسی اثر جدایه‌های مختلف *V. dahliae* روی ارقام تجاری پسته ۶۸.....
- ۳-۶-۷- نمونه‌برداری و جداسازی قارچ از خاک آلوده به *V. dahliae* ۷۰.....
- فصل چهارم: نتایج ۷۳.....
- ۴-۱- جداسازی ازبافت و خاک آلوده و تشخیص قارچ عامل بیماری ۷۳.....
- ۴-۲- تاثیر سطوح غلظت کلرات و نوع محیط کلرات دار در میزان سکتوردهی
 و درصد تولید موتانت نیت ۸۲.....
- ۴-۳- تولید موتانت نیت در جدایه‌های *V. dahliae* ۸۵.....
- ۴-۴- بررسی کلاس فنوتیپی موتانت‌های نیت و آزمون خودسازگاری ۸۸.....
- ۴-۵- پایداری موتانت‌های نیت ۹۱.....
- ۴-۶- تلاقی موتانت‌های نیت و تعیین گروه‌های سازگاری رویشی محلی جدایه‌ها ۹۲.....

- ۷-۴- تعیین گروه سازگاری رویشی جدایه‌های *V. dahliae* با استفاده از VCG های مرجع (OARDC) ۹۸
- ۸-۴- تعیین ارتباط بین VCG محلی با VCG مرجع سیستم بین المللی (OARDC) ۱۰۷
- ۹-۴- تعیین بیماری‌زایی جدایه‌های *V. dahliae* متعلق به گروه‌های سازگاری رویشی مختلف ۱۰۹
- ۱۰-۴- تولید میکرواسکلروت ۱۱۸
- ۱۱-۴- واکنش ارقام پسته به *Verticillium dahliae* ۱۱۸
- ۱۲-۴- بررسی ارتباط بین درصد کلونیزاسیون، شاخص قهوه‌ای شدن، کاهش ارتفاع و درصد مرگ گیاه با شاخص بیماری ۱۳۹
- ۱۳-۴- بررسی برهمکنش ارقام پسته و جدایه‌های *V. dahliae* ۱۴۰
- فصل پنجم: بحث** ۱۴۷
- ۱-۵- تاثیر سطوح غلظت و نوع محیط کشت بر میزان سکتوردهی و نسبت موتانت نیت ۱۴۷
- ۲-۵- بازیابی موتانت‌های نیت و انواع فنوتیپ آنها در جدایه‌های *V. dahliae* ۱۴۹
- ۳-۵- تعیین گروه‌های سازگاری رویشی محلی (منطقه‌ای) در جمعیت *V. dahliae* جدا شده از پسته ۱۵۴
- ۴-۵- تعیین گروه‌های سازگاری رویشی جدایه‌های *V. dahliae* با استفاده از VCG های مرجع ۱۵۷
- ۵-۵- ارتباط گروه‌های سازگاری رویشی با بیماری‌زایی و پاتوتیپ جدایه‌ها ۱۶۱

۱۶۷	۵-۶- تولید میکرواسکلروت
۱۶۸	۵-۷- واکنش ارقام مختلف پسته به <i>V. dahliae</i>
۱۷۳	۵-۸- برهمکنش جدایه‌های <i>V. dahliae</i> و ارقام مختلف پسته
۱۷۴	۵-۹- تخمین میزان جمعیت <i>V. dahliae</i> در خاک
۱۷۷	۵-۱۰- پیشنهادات
۱۷۹	پیوست
۱۸۶	فهرست منابع

صفحه عنوان و چکیده به زبان انگلیسی

فهرست جدول ها

صفحه	جدول
۷۴	جدول ۱-۴- مشخصات محل جمع‌آوری، میزبان، تعداد سکتور، تعداد کل موتانت‌های نیت و تعداد آنها در کلاس‌های فنوتیپی برای هر جدایه قارچ <i>Verticillium dahliae</i>
۸۳	جدول ۲-۴- مقایسه درصد تولید موتانت نیت جدایه‌های <i>Verticillium dahliae</i> در سه غلظت کلرات (۳۰، ۵۰ و ۷۰ گرم در لیتر)
۸۵	جدول ۳-۴- مقایسه میزان سکتوردهی و درصد تولید موتانت نیت جدایه‌های <i>Verticillium dahliae</i> در سه محیط کشت کلرات‌دار (WAC، MMC و CMC)
۹۰	جدول ۴-۴- تعداد سکتور، تعداد موتانت نیت در هر کلاس فنوتیپی و تعداد موتانت نیت برگشتی در جدایه‌های <i>Verticillium dahliae</i> از میزبان‌های مختلف
۹۱	جدول ۵-۴- میزان برگشت‌پذیری هر یک از کلاس‌های فنوتیپی موتانت نیت جدایه‌های <i>Verticillium dahliae</i>
۹۳	جدول ۶-۴- آزمون مکمل‌سازی و گروه‌بندی بر اساس سازگاری رویشی در میان مجموعه‌ای از ۳۰ جدایه پسته <i>Verticillium dahliae</i>

- جدول ۷-۴- تعیین VCG و آزمون مکمل سازی میان موتانت های *nit1* در ۴۱ جدایه
Verticillium dahliae از پسته (محور عمودی) و ۷ موتانت
nitM منتخب (محور افقی) از جدایه های نماینده گروه های سازگاری
 رویشی محلی ۹۶
- جدول ۸-۴- تعیین گروه سازگاری رویشی جدایه های *Verticillium dahliae* از
 میزبان های مختلف با استفاده از جدایه های مرجع متعلق به گروه های
 سازگاری رویشی سیستم بین المللی (OARDC) ۱۰۰
- جدول ۹-۴- ارتباط بین گروه های سازگاری رویشی با میزبان ۱۰۶
- جدول ۱۰-۴- مقایسه شدت بیماری زایی جدایه های *Verticillium dahliae*
 متعلق به گروه های سازگاری رویشی مختلف بر روی میزبان های افتراقی
 پنبه و بامیه ۱۱۰
- جدول ۱۱-۴- مقایسه شدت بیماری زایی گروه های سازگاری مختلف بر روی دو
 میزبان افتراقی ۱۱۱
- جدول ۱۲-۴- درصد بیماری ارقام مختلف پسته آلوده به *Verticillium dahliae*
 در شرایط گلخانه ۱۲۰
- جدول ۱۳-۴- تجزیه واریانس شاخص شدت بیماری ارقام مختلف پسته آلوده به
Verticillium dahliae در شرایط گلخانه ۱۲۳
- جدول ۱۴-۴- تجزیه واریانس میزان کاهش ارتفاع ساقه دانهال های ارقام مختلف
 پسته آلوده به *Verticillium dahliae* در شرایط گلخانه ۱۲۶
- جدول ۱۵-۴- تجزیه واریانس شاخص قهوه ای شدن مقاطع عرضی ساقه ارقام
 مختلف پسته آلوده به *Verticillium dahliae* در شرایط گلخانه ۱۲۷

- جدول ۴-۱۶- تجزیه واریانس میزان مرگ و میر دانهال های ارقام مختلف پسته آلوده
به *Verticillium dahliae* در شرایط گلخانه. ۱۳۳.....
- جدول ۴-۱۷- تجزیه واریانس میزان کلونیزاسیون قسمت فوقانی ساقه ارقام مختلف
پسته آلوده به *Verticillium dahliae* در شرایط گلخانه. ۱۳۴.....
- جدول ۴-۱۸- تجزیه واریانس میزان کلونیزاسیون قسمت میانی ساقه ارقام مختلف
پسته آلوده به *Verticillium dahliae* در شرایط گلخانه. ۱۳۵.....
- جدول ۴-۱۹- تجزیه واریانس میزان کلونیزاسیون قسمت تحتانی ساقه ارقام مختلف
پسته آلوده به *Verticillium dahliae* در شرایط گلخانه. ۱۳۶.....
- جدول ۴-۲۰- واکنش دانهال های ارقام مختلف پسته نسبت به
Verticillium dahliae. ۱۳۸.....
- جدول ۴-۲۱: همبستگی شاخص شدت بیماری با درصد کلونیزاسیون، شاخص قهوه‌ای
شدن، درصد کاهش ارتفاع ساقه و درصد مرگ (براساس ضرایب
همبستگی پیرسون). ۱۳۹.....
- جدول ۴-۲۲: مقایسه میانگین شاخص شدت بیماری و درصد کلونیزاسیون فوقانی
ساقه جدایه های *Verticillium dahliae* بر روی ارقام تجاری پسته
در شرایط گلخانه. ۱۴۲.....
- جدول ۱- پیوست: تجزیه واریانس درصد تولیدموتانت نیت جدایه های
Verticillium dahliae در سه محیط کشت کلرات دار و سه غلظت
متفاوت کلرات. ۱۸۳.....