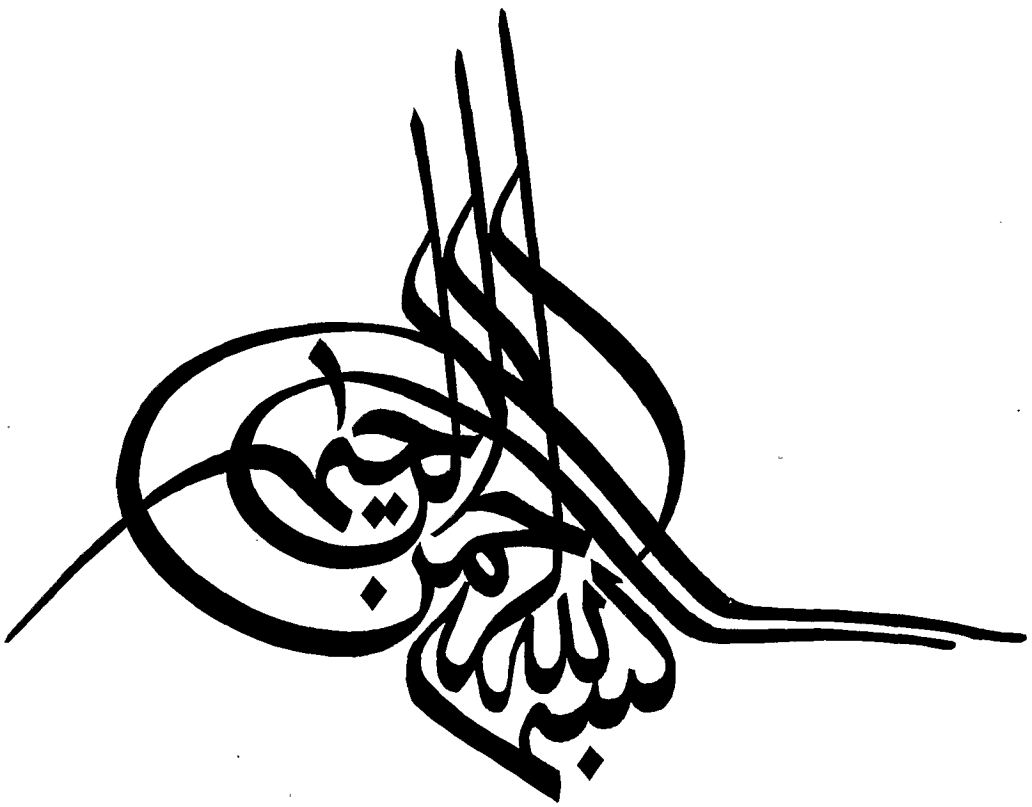

٩٤٠١١

دانشکده کشاورزی
گروه گیاه‌پزشکی

پایان‌نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌شناسی گیاهی

عنوان:

بررسی حساسیت جدایه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی طوقه برنج به قارچ‌کش‌ها و مقایسه این جدایه‌ها با استفاده از مارکرهای RAPD و PCR-RFLP در استان گیلان

استاد راهنما:
دکتر دوستمراد ظفری

استاد مشاور:
مهندس فریدون پاداشت دهکایی

پژوهشگر:
علی حسین‌نژاد

۱۳۸۶ /۱۲/ ۲۵

خرداد ۱۳۸۶

۹۶۰۸۸

این مجموعه، تحفه‌ای است بسیار ناچیز

تقدیم به

ساحت مقدس حضرت ولی عصر (عج)

و نیز

هدیه‌ای است بسیار کوچک

تقدیم به

بهترین اساتید زندگی‌ام:

پدر و مادرم

۲۵ /۱۲/ ۱۳۸۶

سپاسگزاری

خداوند قادر و متعال را شاکر و سپاسگزارم که بار دیگر جلوه‌هایی نو از قدرت لایزال خود را بر این بنده حقیر نمایان نمود. بی‌شک، توکل به او و سعه صدر و امدادهایی که به من عطاء فرمود، عامل اصلی موفقیت‌هایم بودند.

از اعضاء خانواده، خصوصاً پدر و مادر عزیزم، به‌خاطر تمامی زحماتی که در طی انجام این کار متقبل شدند، صمیمانه ممنون و سپاسگزارم.

از استاد راهنمای ارجمندم، **جناب آقای دکتر دوستمراد ظفری**، به‌خاطر تمامی حمایت‌ها و راهنمایی‌های ارزنده و نیز به‌خاطر سعه صدر و بلندنظری ایشان، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از استاد مشاور بزرگوارم، **جناب آقای دکتر فریدون پاداشت**، به‌خاطر راهنمایی‌های دلسوزانه و بسیار مؤثر ایشان و نیز به‌خاطر فراهم آوردن امکان انجام بخش اول این تحقیق در مؤسسه تحقیقات برنج کشور، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از اساتید محترم، جناب آقایان **دکتر محمد جواد سلیمانی**، مدیر محترم گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه بوعلی‌سینا و **دکتر بهرام شریف‌نبی**، عضو محترم هیأت علمی دانشگاه صنعتی اصفهان که زحمت داوری این پایان‌نامه را قبول فرمودند، صمیمانه ممنون و سپاسگزارم.

از جناب آقایان **دکتر مصطفی درویش‌نیا** به‌خاطر راهنمایی‌های ارزنده در تشخیص مورفولوژیک جدایه‌ها، **دکتر محمد جوان نیکخواه** به‌خاطر کمک‌ها و راهنمایی‌های مستقیم و غیرمستقیم ایشان، **دکتر پویا زمانی** به‌خاطر کمک به انجام تجزیه و تحلیل‌های آماری و **دکتر فرزاد مجیدی** به‌خاطر راهنمایی در تنظیم نتایج اولیه بخش قارچ‌کش‌ها، صمیمانه ممنون و سپاسگزارم.

از جناب آقایان **دکتر علی‌نیا** و **دکتر مؤمنی**، رئیس و معاونت محترم پژوهشی وقت مؤسسه تحقیقات برنج کشور، که امکان انجام بخش اول این تحقیق را در آن مؤسسه فراهم آوردند و نیز از پرسنل محترم بخش گیاه‌پزشکی، خصوصاً جناب آقایان **ابراهیم دودابی‌نژاد** و **حسن پورفرهنگ** و سرکار **خانم فتانه بخشی‌زاد**، به‌خاطر راهنمایی‌ها و همکاری‌های مؤثر ایشان، صمیمانه ممنون و سپاسگزارم.

از جناب آقای **دکتر علی دلجو**، مدیر وقت وسرکار **خانم مهندس احمدی**، مسؤول آزمایشگاه گروه بیوتکنولوژی، به‌خاطر همکاری در انجام بخش مولکولی این تحقیق، صمیمانه ممنون و سپاسگزارم.

از خواهر عزیز، سرکار **خانم محیا عباس‌زاده**، کارشناس ارشد میکروبیولوژی، به‌خاطر این‌که جدایه‌های تهیه شده خود را در اختیار این تحقیق قرار دادند و نیز به‌خاطر کمک‌ها و راهنمایی‌های مؤثر ایشان، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

از دوستان و سروران عزیزم، خصوصاً جناب آقایان مهندس **اسماعیل محمودی**، **مهدی مهرابی**، **خسرو چهری**، **یاور وفایی**، **اسفندیار حسنی‌مقدم**، **فریبرز لطفی**، **کاوه موسویه‌زاده**، **حامد پاشامختاری**، **سیاوش بهاری**، **مسعود رحمتی**، **شهرام نجفی** و **محمد ظاهری** که از کمک‌ها و راهنمایی‌های ایشان در طول انجام مراحل مختلف این پایان‌نامه بهره‌مند شدم، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

سعادت، سلامت و موفقیت روزافزون همه این عزیزان را از درگاه خداوند متعال خواستارم.

مقدمه ۱

فصل اول: بررسی منابع

۱-۱-تاریخچه بیماری ۴
۱-۲-علائم بیماری ۶
۱-۳- عامل بیماری ۸
۱-۴- مورفولوژی گونه‌های عامل بیماری ۹
۱-۵-سازگاری جنسی در قارچ‌ها و مفهوم گونه بیولوژیکی ۱۳
۱-۶-سیستماتیک مولکولی و طبقه بندی فیلوژنتیکی ۱۵
۱-۷- زیست شناسی قارچ عامل بیماری ۱۷
۱-۸- مبارزه با بیماری ۱۸
۱-۹- تاریخچه استفاده از قارچ‌کش ۲۳
۱-۱۰- تاریخچه مقاومت به قارچ‌کش‌ها ۲۵
۱-۱۱- توضیح دو عبارت در مقاومت به قارچ‌کش ۲۷
۱-۱۲- تقسیم بندی قارچ‌کش‌ها از لحاظ خطر مقاومت ۲۸
۱-۱۲-۱- قارچ‌کش‌های با خطر مقاومت پایین ۲۸
۱-۱۲-۲- قارچ‌کش‌های با خطر مقاومت بالا ۲۹
۱-۱۲-۳- قارچ‌کش‌های با خطر مقاومت متوسط ۳۰
۱-۱۳-مکانیزم‌های کلی مقاومت به قارچ‌کش‌ها ۳۱
۱-۱۴- مثال‌هایی از مقاومت به چند گروه قارچ‌کش ۳۲
۱-۱۴-۱- مقاومت به بنزیمیدازول‌ها ۳۲
۱-۱۴-۲- مقاومت به بازدارنده‌های بیوسنتز استرول (SBIها) ۳۳
۱-۱۴-۳- مقاومت به فنیل آمیدها ۳۷
۱-۱۴-۴-مقاومت به کربوکسیمیدها ۳۹
۱-۱۴-۵- قارچ‌کش‌های QoI (بازدارنده‌های Qo) ۳۹
۱-۱۵- مراقبت برای مقاومت به قارچ‌کش ۴۰
۱-۱۵-۱- دلایل مراقبت ۴۱

۱-۱۵-۲- طبیعت و زمان برنامه‌های مراقبت ۴۱
۱-۱۵-۳- نمونه برداری ۴۳
۱-۱۵-۴- زیست سنجی حساسیت ۴۳
۱-۱۵-۵- حساسیت پایه‌ای ۴۴
۱-۱۵-۶-کمیته فعال مقاومت به قارچ‌کش (FRAC) ۴۵
۱-۱۶- ارزیابی خطر مقاومت نامزدهای جدید کنترل بیماری ۴۶
۱-۱۶-۱- عوامل مقاومت ۴۶
۱-۱۶-۲- خطرات ذاتی قارچ‌کش ۴۷
۱-۱۷- راه‌کارهایی برای جلوگیری و یا تأخیر انداختن شروع مقاومت به قارچ‌کش‌ها و مدیریت رویدادهای مقاومتی ۵۰
۱-۱۷-۱- راه‌کارهای مدیریت سم‌پاشی ۵۱
۱-۱۷-۲- روش‌های مدیریت محصول ۵۲
۱-۱۸- مقاومت در قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج به قارچ‌کش‌ها ۵۳
۱-۱۹- نشانگرهای مولکولی ۵۳
۱-۱۹-۱- نشانگرهای DNA ۵۴
۱-۱۹-۲- نشانگر RAPD ۵۴
۱-۱۹-۳- نشانگر PCR-RFLP ۵۵
۱-۲۰- ردیابی مولکولی مقاومت به قارچ‌کش در قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی ۵۹

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه برداری و جداسازی جدایه‌های قارچ عامل بیماری ۶۲
۲-۲- خالص سازی جدایه‌ها ۶۳
۲-۳- نگهداری جدایه‌ها ۶۴
۲-۴- محیط کشت‌های مورد استفاده در شناسایی مورفولوژیک جدایه‌ها ۷۰
۲-۴-۱- محیط کشت PDA ۷۰
۲-۴-۲- محیط کشت آب - آگار (WA) ۷۰
۲-۴-۳- محیط کشت SNA ۷۰

۲-۴-۴- محیط کشت برگ میخک - آگار (CLA) ۷۱
۲-۵- شناسایی مورفولوژیک جدایه‌ها ۷۱
۲-۶- اثبات بیماری‌زایی ۷۲
۲-۷- مشخصات قارچ‌کش‌ها ۷۳
۲-۷-۱- تیوفانات متیل تیرام ۷۳
۲-۷-۲- تریفلومیزول ۷۴
۲-۸- محیط کشت مورد استفاده برای آزمایشات قارچ کش ۷۴
۲-۹- آزمایش حساسیت به قارچ کش ۷۵
۲-۱۰- استخراج DNA ژنومی ۷۷
۲-۱۰-۱- استخراج DNA با روش اصلاح شده موری و تامپسون ۷۷
۲-۱۰-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۷۹
۲-۱۱- تنظیم شرایط برای PCR در نشانگر RAPD ۸۰
۲-۱۱-۱- آغازگرها ۸۱
۲-۱۱-۲- dNTPs ۸۲
۲-۱۱-۳- کلرید منیزیم $MgCl_2$ ۸۲
۲-۱۱-۴- بافر PCR (۱۰ برابر) ۸۲
۲-۱۱-۵- آنزیم Taq DNA polymerase ۸۲
۲-۱۲- الکتروفورز فرآورده‌های تکثیر شده ۸۳
۲-۱۳- تجزیه و تحلیل داده‌های PARD ۸۳
۲-۱۴-تنظیم شرایط برای PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ITS5-ITS4 ..... ۸۴
۲-۱۴-۱- آغازگرها ۸۵
۲-۱۵- روش RFLP برای گروه بندی جدایه‌ها ۸۶
۲-۱۶- مواد و محلول‌های مورد نیاز در مطالعات مولکولی ۸۷
۲-۱۶-۱- محلول یک مولار Tris – HCl pH 8.0 ..... ۸۷
۲-۱۶-۲- محلول ۰/۵ مولار EDTA ۸۷
۲-۱۶-۳- محلول کلرید سدیم ۵ مولار ۸۷
۲-۱۶-۴- تهیه بافر TAE (۵ x) ۸۷

۲-۱۶-۵- تهیه بافر TBE (۵ x) ۸۷
۲-۱۶-۶- تهیه بافر نمونه گذاری (برای استفاده در ژل آگارز) ۸۸
۲-۱۶-۷- تهیه اتیدیوم بروماید (۱ mg/l) ۸۸

فصل سوم: نتایج
۳-۱-شناسایی جدایه های قارچ عامل بیماری ۸۹
۳-۲- نتایج آزمایشات حساسیت به قارچ‌کش ۹۱
۳-۲-۱- قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام ۹۱
۳-۲-۲- قارچ‌کش تریفلومیزول ۱۰۱
۳-۳- مقایسه میانگین EC50 دو قارچ‌کش ۱۱۴
۳-۴- بررسی مقاومت تقاطعی بین دو قارچ‌کش ۱۱۵
۳-۵- میانگین رشد ۳ روزه جدایه‌های مورد استفاده در کار مولکولی ۱۱۶
۳-۶- بررسی‌های مولکولی ۱۲۰
۳-۶-۱- استخراج DNA ۱۲۰
۳-۶-۲- نشانگر RAPD ۱۲۱
۳-۶-۳- نشانگر PCR-RFLP ۱۳۲

فصل چهارم: بحث ۱۳۹
منابع ۱۶۲

جدول ۱-۱- زمان بندی برنامه‌های مراقبت ۴۲
جدول ۲-۱- مشخصات جدایه های قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج، جمع آوری شده توسط عباس زاده (۱۳۸۴) از نقاط مختلف استان گیلان در سال ۱۳۸۳ که در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند. ۶۵
جدول ۲-۲- جدایه های جمع آوری شده در سال ۱۳۸۴ و جدایه های جمع آوری شده توسط پاداشت (۱۳۷۲) و پاداشت و همکاران (۱۳۸۳) ۶۸
جدول ۲-۳- مواد لازم و مقدار هر یک برای تهیه محلول پایه جهت نشانگر RAPD ۸۰
جدول ۲-۴- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف PCR با آغازگرهای تصادفی ۸۱
جدول ۲-۵- نام و توالی آغازگرهای تصادفی ۸۲
جدول ۲-۶- مواد لازم و مقدار آن برای تهیه محلول پایه آغازگرهای ITS5, ITS4 ..... ۸۴
جدول ۲-۷- زمان و دمای لازم جهت انجام مراحل مختلف PCR برای آغازگرهای اختصاصی ITS5–ITS4 ..... ۸۵
جدول ۲-۸- نام و توالی آغازگرهای اختصاصی استفاده شده جهت تکثیر نواحی ITS-1، ITS-2 و ژن ۵/۸ S ۸۵
جدول ۳-۱- درصد بازداری در غلظت های مختلف، EC50 و حدود اطمینان ۹۵ درصد EC50 در قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام ۹۲
جدول ۳-۲- درصد فراوانی MIC قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در جدایه‌های سال‌های مختلف. ۹۷
جدول ۳-۳- درصد فراوانی EC50 قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در جدایه‌های سال‌های مختلف و جمعیت‌های آمیزشی مختلف. ۹۸
جدول ۳-۴- مقایسه میانگین EC50 قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در جمعیت‌های آمیزشی (گونه‌های) مختلف ۱۰۰
جدول ۳-۵- مقایسه میانگین EC50 قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در سال‌های مختلف. ۱۰۰
جدول ۳-۶- درصد بازداری در غلظت‌های مختلف، EC50 و حدود اطمینان ۹۵ درصد EC50 در قارچ‌کش تریفلومیزول ۱۰۲
جدول ۳-۷- درصد فراوانی MIC قارچ‌کش تریفلومیزول در جدایه‌های سال‌های مختلف. ۱۰۹
جدول ۳-۸- درصد فراوانی EC50 قارچ‌کش تریفلومیزول در جدایه‌های سال‌های مختلف و جمعیت‌های آمیزشی مختلف. ۱۱۱

جدول ۳-۹- مقایسه میانگین EC50 قارچ‌کش تریفلومیزول در جمعیت‌های آمیزشی (گونه‌های) مختلف. ۱۱۲
جدول ۳-۱۰- مقایسه میانگین EC50 دو قارچ‌کش با در نظر گرفتن دو جدایه با حساسیت کم به تریفلومیزول. ۱۱۴
جدول ۳-۱۱- مقایسه میانگین EC50 دو قارچ‌کش بدون در نظر گرفتن دو جدایه با حساسیت کم به تریفلومیزول ۱۱۵
جدول۳-۱۲- مقایسه میانگین رشد ۳ روزه پرگنه ۲۱ جدایه استفاده شده در کار مولکولی. ۱۱۷
جدول۳-۱۳- مقایسه میانگین رشد ۳ روزه پرگنه جدایه‌های *F. proliferatum* استفاده شده در کار مولکولی. ۱۱۸
جدول۳-۱۴- مقایسه میانگین رشد ۳ روزه پرگنه جدایه‌های *F. fujikuroi* استفاده شده در کار مولکولی. ۱۱۹
جدول۳-۱۵- مقایسه میانگین رشد ۳ روزه پرگنه جدایه‌های *F. verticillioides* استفاده شده در کار مولکولی. ۱۱۹
جدول ۳-۱۶- تعداد باندهای ایجاد شده با آغازگرهای مختلف در آزمایش RAPD. ۱۲۱
جدول۳-۱۷- مقایسه ضریب همبستگی کوفنتیک برای روش‌های تجزیه خوشه‌ای و ضرایب تشابه مختلف جهت دسته‌بندی جدایه‌ها در آزمایش RAPD. ۱۲۴
جدول ۳-۱۸- تعداد باندهای ایجاد شده با آنزیم‌های برشی مختلف در نشانگر PCR-RFLP. ۱۳۲
جدول ۳-۱۹- مشخصات جدایه‌های استفاده شده در بررسی‌های مولکولی. ۱۳۶

شکل ۱-۱- جایگاه انواع ITS در rDNA..... ۵۵
شکل ۳- ۱- نمایش قسمت‌های مختلف قارچ‌های عامل بیماری. ۹۰
شکل۳-۲- نمودار رشد رویشی ۶۸ جدایه بیماری‌زا در لگاریتم غلظت‌های مختلف قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام..... ۹۵
شکل ۳-۳- رشد جدایه‌های مختلف عامل بیماری در غلظت‌های مختلف تیوفانات‌متیل‌تیرام در مقایسه با شاهد..... ۹۶
شکل ۳-۴- نمودار درصد فراوانی MIC قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در جدایه‌های سال‌های مختلف. ۹۷
شکل۳-۵- درصد فراوانی EC50 قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در جدایه‌های سال‌های مختلف و جمعیت‌های آمیزشی مختلف. ۹۸
شکل ۳-۶- نمودار رشد رویشی حساس‌ترین جدایه‌ها (Gf-237 و Gf-121) و جدایه با کمترین حساسیت (Gf-145) در غلظت‌های مختلف قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام. ۹۹
شکل ۳-۷- رشد جدایه‌های مختلف عامل بیماری در غلظت‌های مختلف تریفلومیزول در مقایسه با شاهد. ۱۰۸
شکل ۳-۸- نمودار رشد رویشی ۶۸ جدایه بیماری‌زا در لگاریتم غلظت‌های مختلف قارچ‌کش تریفلومیزول. ۱۰۹
شکل ۳-۹- نمودار درصد فراوانی MIC قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام در جدایه‌های سال‌های مختلف. ۱۱۰
شکل ۳-۱۰- درصد فراوانی EC50 قارچ‌کش تریفلومیزول در جدایه‌های سال‌های مختلف و جمعیت‌های آمیزشی مختلف. ۱۱۱
شکل ۳-۱۱- نمودار رشد رویشی حساس‌ترین جدایه‌ها (Gf-207 و Gf-266) و جدایه با کمترین حساسیت (Gf-213) در غلظت‌های مختلف قارچ‌کش تریفلومیزول. ۱۱۲
شکل ۳-۱۲- بررسی مقاومت تقاطعی بین دو قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام و تریفلومیزول. ۱۱۶
شکل ۳-۱۳- استخراج DNA با استفاده از روش اصلاح شده موری و تامپسون. ۱۲۰
شکل ۳-۱۴- غلظت سنجی DNA جدایه‌های مختلف با کمک DNA فاژ λ. ۱۲۰
شکل ۳-۱۵- نتیجه RAPD با استفاده از آغازگر R-11 (چاهک کوچک). ۱۲۲
شکل ۳-۱۶- نتیجه RAPD با استفاده از آغازگر R-11 (چاهک بزرگ). ۱۲۲
شکل ۳-۱۷- نتیجه RAPD با استفاده از آغازگر R-14 (چاهک کوچک). ۱۲۳

شکل ۳-۱۸- نتیجه RAPD با استفاده از آغازگر R-14 (چاهک بزرگ). ۱۲۳
شکل ۳-۱۹- دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه دایس برای ۲۱ جدایه در نشانگر RAPD. ۱۲۷
شکل ۳-۲۰- دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۱ جدایه در نشانگر RAPD. ۱۲۸
شکل ۳-۲۱- دندروگرام ترسیم‌شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای جدایه‌هایی که از لحاظ مورفولوژی به‌عنوان *F. proliferatum* شناسایی شدند. ۱۲۹
شکل ۳-۲۲- دندروگرام ترسیم‌شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه دایس برای جدایه‌هایی که از لحاظ مورفولوژی به‌عنوان *F. proliferatum* شناسایی شدند. ۱۲۹
شکل ۳-۲۳- دندروگرام ترسیم‌شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای جدایه‌هایی که از لحاظ مورفولوژی به‌عنوان *F. fujikuroi* شناسایی شدند. ۱۳۰
شکل ۳-۲۴- دندروگرام ترسیم‌شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه دایس برای جدایه‌هایی که از لحاظ مورفولوژی به‌عنوان *F. fujikuroi* شناسایی شدند. ۱۳۰
شکل ۳-۲۵- دندروگرام ترسیم‌شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای جدایه‌هایی که از لحاظ مورفولوژی به‌عنوان *F. vericillioides* شناسایی شدند. ۱۳۱
شکل ۳-۲۶- دندروگرام ترسیم‌شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه دایس برای جدایه‌هایی که از لحاظ مورفولوژی به‌عنوان *F. vericillioides* شناسایی شدند ۱۳۱
شکل ۳-۲۷- باند ایجاد شده از تکثیر نواحی ITS-1، ITS-2 و ژن S ۵/۸ ..... ۱۳۳
شکل ۳-۲۸- الگوی برشی نواحی ITS-1، ITS-2 و ژن S ۵/۸ با استفاده از آنزیم برشی*Cfo*I ۱۳۳
شکل ۳-۲۹- الگوی برشی نواحی ITS-1، ITS-2 و ژن S ۵/۸ با استفاده از آنزیم برشی *Hae*III ۱۳۴
شکل ۳-۳۰- الگوی برشی نواحی ITS-1، ITS-2 و ژن S ۵/۸ با استفاده از آنزیم برشی*Msp*I ۱۳۴
شکل ۳-۳۱- دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۰ جدایه در نشانگر PCR-RFLP ۱۳۵
شکل ۳-۳۲- دندروگرام ترسیم شده با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه دایس برای ۲۰ جدایه در نشانگر PCR-RFLP ۱۳۵

شکل۳-۳۳- محل جمع‌آوری جدایه‌های استفاده شده در بررسی‌های مولکولی از نقاط مختلف استان گیلان. ۱۳۸.....

شکل ۴-۱- مقایسه دندروگرام‌های به‌دست آمده از ۵ و۶ آغازگر با استفاده از روش تجزیه خوشه‌ای UPGMA و ضریب تشابه دایس. ۱۵۵

چکیده

بیماری پوسیدگی طوقه برنج ناشی از گونه‌های *Fusarium verticillioides*، *F. fujikuroi* و *F. proliferatum* یکی از بیماری‌های مهم بذرزاد برنج می‌باشد که بهترین راه کنترل آن، ضدعفونی بذر با قارچ‌کش‌ها می‌باشد. مقاومت به قارچ‌کش‌ها یکی از موضوعات مهمی است که باید به‌طور مداوم مورد بررسی قرار گیرد و لازمه آن، بررسی حساسیت پایه‌ای قارچ به قارچ‌کش، قبل از کاربرد آن می‌باشد. بیشتر عوامل بیماری‌زا از لحاظ پاسخی که به یک قارچ‌کش، در داخل و یا بین جمعیت‌ها نشان می‌دهند، متفاوت هستند. این تنوع طبیعی، باید قبل از این‌که تغییر در پاسخ قابل سنجش باشد، شناخته شود. بنابراین علاوه بر ردیابی جدایه‌های مقاوم در منطقه، توصیف تنوع ژنتیکی در تیپ وحشی نیز ضروری است. در این پژوهش، حساسیت ۷۷ جدایه قارچ‌های عامل بیماری به قارچ‌کش‌های تیوفانات‌متیل‌تیرام و تریفلومیزول در محیط‌کشت PSA حاوی ۱، ۵، ۱۰، ۲۰ و ۲۵ میلی‌گرم در لیتر از ماده مؤثره تیوفانات‌متیل‌تیرام و همچنین ۰/۰۰۲، ۰/۰۰۸، ۱، ۵، ۸، ۱۲، ۱۶، ۲۰، ۲۴، ۲۸ و ۳۲ میلی‌گرم در لیتر از ماده مؤثره تریفلومیزول مورد مطالعه قرارگرفت و سپس EC50 و MIC قارچ‌کش‌ها برای هرکدام از جدایه‌ها محاسبه شد. ۲۱ جدایه منتخب، متعلق به سه جمعیت آمیزشی (گونه) مختلف، جهت بررسی‌های مولکولی با استفاده از نشانگرهای RAPD و همچنین ۲۰ جدایه جهت بررسی تفاوت در نواحی ITS-1، ITS-2 و ژن S ۵/۸ با استفاده از نشانگر PCR-RFLP مقایسه شدند. نتایج نشان داد که EC50 وMIC قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام برای جدایه‌های مختلف به‌ترتیب بین ۶/۴۷-۲/۰۱ و ۲۵-۵ میلی‌گرم در لیتر متغیر بوده است. از آنجا که EC50 جدایه با کمترین حساسیت، تنها ۳/۲۲ برابر حساس‌ترین جدایه بوده و جدایه‌های قدیمی استفاده شده نیز در همین دامنه حساسیت قرار گرفتند، بنابراین در جمعیت قارچ عامل بیماری، بعد از ۱۰ سال مصرف قارچ‌کش تیوفانات‌متیل‌تیرام، مقاومتی رخ نداده است. همچنین EC50 وMIC قارچ‌کش تریفلومیزول برای جدایه‌های مختلف بین ۰/۶۴۲-۰/۰۰۵ و ۳۲-۰/۲۵ میلی‌گرم در لیتر متغیر بود. جدایه‌های مختلف بر اساس هم‌پوشانی حدود اطمینان ۹۵ درصد EC50 در ۴ گروه قرار گرفتند و تنها دو جدایه Gf-213 و Gf-217، جمع‌آوری شده از املش و رودسر، حساسیت کمتری نسبت به این قارچ‌کش داشتند. به‌دلیل عدم استفاده قبلی از قارچ‌کش مذکور، این اطلاعات می‌تواند به‌عنوان حساسیت پایه‌ای قارچ‌های عامل بیماری به قارچ‌کش تریفلومیزول استفاده شود. از آنجا که تفاوت معنی‌داری بین میانگین EC50 جدایه‌های گونه‌های مختلف مشاهده نشد، می‌توان دامنه حساسیت را برای هر سه گونه به‌صورت مشترک بیان کرد. در بررسی‌های مولکولی با استفاده از نشانگر RAPD ، جدایه‌های متعلق به جمعیت آمیزشی C (*F. fujikuroi*) در دسته جداگانه قرار گرفتند. همچنین جدایه‌های با شباهت بیش از ۷۸ درصد، متعلق به یک گونه بودند. تفاوت ژنتیکی مشاهده شده در جدایه‌های گونه‌های مختلف به رقم و مرحله رشدی گیاه میزبان ، محل جمع‌آوری، حساسیت به قارچ‌کش تریفلومیزول و میانگین رشد ۳ روزه پرگنه مرتبط دانسته شد. در اغلب موارد، جدایه‌هایی که EC50 قارچ‌کش تریفلومیزول برای آن‌ها بیشتر از سایر جدایه‌ها بود، در دسته‌های جداگانه قرار گرفتند. تفاوتی که با استفاده از نشانگر RAPD در بین جدایه‌ها مشاهده شد، اثبات کرد که تفاوت در حساسیت به تریفلومیزول، ناشی از تنوع ژنتیکی است. در بررسی‌های مولکولی با استفاده از نشانگر PCR-RFLP، ۱۹ جدایه با شباهت ۱۰۰ درصد در یک دسته قرار گرفتند و جدایه Gf-207 با تفاوت بسیار با جدایه‌های دیگر، در دسته جداگانه‌ای قرار گرفت. تفاوت زیاد جدایه Gf-207 با سایر جدایه‌ها با استفاده از نشانگرهای RAPD و PCR-RFLP نشان می‌دهد که به احتمال زیاد این جدایه جزء ۳ گونه مورد بررسی نمی‌باشد و ممکن است گونه بیماری‌زای جدیدی برای برنج باشد.

واژه‌های کلیدی: حساسیت، قارچ‌کش، *Fusarium*، پوسیدگی طوقه، RAPD، PCR-RFLP.

مقدمه

برنج یکی از غلات مهم جهان بوده و ازعمده منابع انرژی غذایی محسوب می‌شود. بیش از ۹۰ درصد سطح زیر کشت این محصول در قاره آسیا است و حدود ۶۰ درصد مصرف برنج جهان در آن مناطق تولید می‌شود. امروزه حدود ۱۰ درصد محصولات کشاورزی در ۱۱۰ کشور به برنج اختصاص داشته و سطح زیر کشت آن پس از گندم قرار دارد (اخوت، ۱۳۷۸).

برنج متعلق به جنس *Oryza* و تیره غلات (گندمیان) می‌باشد و ارقام زیر کشت آن از گونه‌های *O. sativa* L. (آسیایی) و *O. glaberrima* Steudel (آفریقایی) می‌باشد (پاداشت، ۱۳۷۲ و اخوت، ۱۳۷۸). زمان کشت *O. sativa* به ۳۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح، در چین بر می گردد و شواهدی وجود دارد که زندگی مردم جنوب و جنوب شرقی آسیا از ۵۰۰۰ سال قبل از میلاد مسیح به این گیاه وابسته بوده است (اخوت، ۱۳۷۸). کشت برنج در ایران از ۲۰۰۰ سال پیش متداول بوده است. در زمان هخامنشیان، اشکانیان و ساسانیان نیز در ایران برنج کشت می‌شده است. هم اکنون استان‌های گیلان و مازندران از مناطق مهم تولید برنج در کشور هستند (اخوت و وکیلی، ۱۳۷۶).

بیماری‌های برنج در غالب مناطق کشت این گیاه، عامل اصلی کاهش محصول هستند. بیماری‌های انگلی در اثر قارچ‌ها، باکتری‌ها، ویروس‌ها، مایکوپلاسماها و نماتدها ایجاد می‌شوند. قارچ‌ها، عامل بیماری‌های بیشتری در برنج، در مقایسه با سایر عوامل انگلی هستند (اخوت، ۱۳۷۸).

بیماری پوسیدگی طوقه برنج (Bakanae disease and Foot Rot) یکی از بیماری‌های بذرزاد برنج است که از خزانه تا شالیزار روی برنج دیده می‌شود (پاداشت، ۱۳۷۲). این بیماری ابتدا از ژاپن در سال ۱۸۲۸ تشخیص داده شد و در سال ۱۸۹۸ تشریح گردید (اخوت، ۱۳۷۸). در سال ۱۹۱۶ فوجی کورو[1] فرم جنسی آن را پیدا کرد و ساوادا[2] در سال ۱۹۱۷ آن را *Lisea fujikuroi* نامید. این قارچ بعداً در جنس *Gibberella* و تحت نام *G. fujikuroi* (Saw.) Wollenw قرار گرفت. فرم غیرجنسی این قارچ به دلیل اختلافاتی که در تاکسونومی آن در بین تاکسونومیست‌ها وجود دارد به نام‌های *Fusarium moniliforme* Sheld ، *Fusarium fujikuroi* Nirenberg و *Fusarium proliferatum* var. *proliferatum* ذکر گردیده است. به طور کلی قارچ عامل این بیماری دربخش[3] Liseola و مرحله جنسی آن در جنس *Gibberella* قرار دارد (پاداشت، ۱۳۷۲).

در ایران، ابراهیم نسبت (۱۳۴۳) برای اولین بار این بیماری را از دهستان شالگوراب فومن گزارش کرده و عامل آن را *F. moniliforme* معرفی نمود. پاداشت (۱۳۷۲) فرم جنسی آن را برای اولین بار در ایران از فومن جمع آوری و به نام *G. fujikuroi* و فرم غیر جنسی آن را به نام *F. fujikuroi* شناسایی نمود.

1- Fujikuro
2- Sawada
3- section

مشخص‌ترین علائم بیماری، طویل شدن غیر طبیعی بوته‌های برنج بوده که در خزانه و مزرعه به خوبی مشهود است. گیاهچه‌های آلوده حدود چندین سانتی متر طویل‌تر از گیاهچه‌های سالم، نازک‌تر و سبز روشن می‌باشند. این زردی از انتهای بوته شروع می‌شود. عده‌ای از این گیاهچه‌ها در خزانه و تعدادی پس از جابجایی می‌میرند. همه گیاهچه‌های آلوده چنین نشانه‌ای نداشته و حتی عده‌ای کوتاه‌تر و گاهی احتمالاً به طور طبیعی می‌نمایند که با نژاد عامل بیماری و شرایط آب و هوایی مانند حرارت و رطوبت ارتباط دارد. نشاءهای بیمار به ظاهر سالم،وقتی که به مزرعه منتقل می‌شوند، به تدریج به رنگ سبز روشن درآمده و سریعاً رشد نموده و نهایتاً بوته‌های باریک و دراز تولید می‌نمایند. در موقع تشعشع نور خورشید و بارندگی خفیف، بوته‌های آلوده بلند قد به وضوح در شالیزار دیده می‌شوند.در این بوته‌ها، تعداد پنجه‌ها کم و برگ‌ها یکی پس از دیگری از پایین به رنگ قهوه‌ای در آمده، لوله‌ای شده و می‌میرند. در بعضی از مواقع بوته‌های آلوده تا مرحله تکاملی باقی می‌مانند ولی دارای چند خوشه‌چه پوک هستند. چنانچه پای بوته‌های آلوده را نگاه کنیم، در مزارعی که آب فراوان داشته باشند، محل طوقه سیاه رنگ شده و در مزارع کم آب علاوه بر سیاه شدگی محل طوقه، توده قارچ به صورت قشر متراکم سفید یا ارغوانی مشاهده می‌شود که میسیلیوم‌های قارچ بوده و تعداد زیادی کنیدی روی آن تشکیل شده است. در هندوستان ملاحظه گردیده که ریشه‌های نابجا از گره اولیه ساقه خارج می‌شوند. این ریشه‌ها ابتدا به رنگ سفید کرمی و بعد از مدتی به رنگ قهوه‌ای تیره در می‌آیند، در حالی که ریشه‌های خود بوته در زیر خاک، سفید رنگ است. بندهای دوم و سوم از قسمت پایین ساقه که در زیر غلاف برگ پوشیده‌اند، دارای جوانه‌های متعددی از این ریشه‌های نابجا هستند که رشد نکرده‌اند . اگر به ساقه برش طولی داده شود، مغز ساقه در قسمت گره‌ها دارای بافت اسفنجی قهوه‌ای رنگ می‌باشد که رشته‌های سفید رنگ قارچ آنها را نیز پوشانیده است (اخوت و وکیلی، ۱۳۷۶).

ابتدا این بیماری در استان گیلان اهمیت چندانی نداشت؛ اما، پس از تهیه و کشت ارقام پرمحصولی مانند رقم خزر، به سرعت بیماری در این استان توسعه یافت (پاداشت، ۱۳۷۲).

یکی از راه‌های مؤثر مبارزه علیه این بیماری، ضدعفونی بذر با قارچ‌کش‌ها می‌باشد. پاداشت و همکاران (۱۳۷۵) و سپس ایزدیار و همکاران (۱۳۷۹) به ترتیب قارچ‌کش تیوفانات متیل تیرام[1] وهمچنین قارچ‌کش‌های تریفلومیزول[2] و فلودیوکسونیل[3] را برای مبارزه با این بیماری به ثبت رسانده‌اند.

1- Thiopanate-methyl thiram
2- Triflumizole
3- Fludioxonil

در حال حاضر، مقاومت به قارچ‌کش‌ها به علت استفاده گسترده از آنها به عنوان یک خطر جدی در مدیریت بیماری‌های گیاهی محسوب می شود (هویت[1]، ۱۹۹۸). جهت پیش‌بینی ظهور مشکلات مقاومت، بررسی موارد مشکوک مقاومت عملی، پیگیری پیشرفت مقاومت در طول زمان و ... نیاز به مراقبت از مقاومت قارچ هدف به قارچ‌کش وجود دارد.

در این مطالعه، نظر به اهمیت برنامه مراقبت، حساسیت پایه‌ای جدایه‌های قارچ عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در استان گیلان نسبت به قارچ‌کش تریفلومیزول قبل از استفاده آن در سطح استان و حساسیت (یا احتمال مقاومت) آنها نسبت به قارچ‌کش تیوفانات متیل تیرام که نزدیک به ۱۰ سال از استفاده آن می‌گذرد، مورد بررسی قرار گرفته است. همچنین از نشانگرهای مولکولی RAPD و PCR-RFLP جهت مقایسه منتخب‌هایی از این جدایه‌ها استفاده شده است.

1- Hewitt

فصل اول:
بررسی منابع

۱-۱-تاریخچه بیماری

بیماری پوسیدگی طوقه برنج، ابتدا در سال ۱۸۲۸ به وسیله کونیشی[1] از ژاپن تحت عنوان نوگیویووا[2] گزارش شد. در ۱۸۹۸ هوری[3] آن را به عنوان یک بیماری دانسته و به اشتباه عامل آن را *Fusarium heterosporum* Nees نامید. در سال ۱۹۱۶ فوجی کورو مرحله جنسی قارچ را *Lisea fujikuroi* نامید و ساوادا در سال ۱۹۱۷ عامل این بیماری را روی ساقه‌های برنج مشاهده نموده و آن را در جنس *Gibberella* طبقه بندی نمود. این قارچ بعداً تحت نام *G. fujikuroi* (saw.) wollenw قرار گرفت (گرلاخ و نیرنبرگ[4]، ۱۹۸۲ و نلسون[5] و همکاران، ۱۹۸۳). فرم غیرجنسی این قارچ به دلیل اختلافاتی که در تاکسونومی آن در بین تاکسونومیستهاوجود دارد،به نام‌های *Fusarium moniliforme* sheld (بوث[6]، ۱۹۷۱ و نلسون وهمکاران، ۱۹۸۳) *F. fujikuroi* Nirenberg و *F. proliferatum* var. *proliferatum* (نیرنبرگ، ۱۹۷۶ و گرلاخ و نیرنبرگ، ۱۹۸۲) ذکر گردیده است. به طور کلی قارچ این بیماری در بخش Liseola و مرحله جنسی آن در جنس *Gibberella* قرار دارد (گرلاخ، ۱۹۸۱ و بوث، ۱۹۸۱). جنس *Gibberella* به همراه جنس *Necteria* که فرم جنسی عده‌ای دیگر از فوزاریوم‌هاست، متعلق به خانواده Necteriaceae، راسته Hypocreales و رده Ascomycetes می‌باشد (بوث، ۱۹۷۱ و گمس و نیرنبرگ[7]؛ ۱۹۸۹).

این بیماری در حال حاضر در تمامی مناطق برنج کاری دنیا با نام‌های مختلف پراکنده است. در چین به نام ساق سفید، در فیلیپین به نام‌های پالای لالاک[8] و من‌رایس[9] و در گویان نیز به نام من‌رایس معروف است (پاداشت، ۱۳۷۲ و اخوت، ۱۳۷۸). سکوایرا[10] در سال ۱۹۶۳ آن را به عنوان باکانه[11] یا نشاء احمق[12] ذکر نموده است و در حال حاضر در اکثر مقالات و منابع منتشره در این مورد در سطح دنیا به نام Bakanae disease and Foot Rot معروف است (پاداشت، ۱۳۷۲).

علائم قد کشیدگی بوته در این بیماری مورد توجه بسیاری از بیماری شناسان گیاهی و بیوشیمیست‌ها قرار گرفته که مربوط به عمل بیوشیمیایی و فیزیولوژی گیاه و ترشح جیبرلین[13] و

1- Konishi
2- Nogyo Yowa
3- Hori
4- Gerlach & Nirenberg
5- Nelson
6- Booth
7- Gams & Nirenberg
8- Palay lalake
9- man rice
10- Sequeira
11- Bakanae
12- Foolish seedling
13- Gibberellin