

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه فردوسی مشهد

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

شناسایی نماتدهای انگل گیاهی مزارع گوجه فرنگی استان خراسان شمالی و  
بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای *Meloidogyne javanica* با استفاده

از نشانگر **RAPD-PCR**

قاسم فدوی خلاجلو

استاد راهنما

دکتر عصمت مهدیخانی مقدم

استاد مشاور

دکتر حمید روحانی

مهر ۱۳۸۹

## تصویب نامه

این پایان نامه با عنوان « شناسایی نماتدهای پارازیت گیاهی مزارع گوجه فرنگی استان خراسان شمالی و بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه‌ای *Meloidogyne javanica* با استفاده از نشانگر RAPD-PCR» توسط «قاسم

فدوی خلجلو» در تاریخ \_\_\_\_\_ با نمره \_\_\_\_\_ و درجه ارزشیابی \_\_\_\_\_ در حضور هیات داوران با موفقیت دفاع شد.

هیات داوران:

ردیف	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	سمت در هیات	امضاء
۱	خانم دکتر عصمت مهدیخانی مقدم	استادیار	استاد راهنما	
۲	آقای دکتر حمید روحانی	دانشیار	استاد مشاور	
۳	آقای دکتر بهروز جعفرپور	استاد	استاد مدعو	
۴	خانم دکتر پریسا طاهری	استادیار	استاد مدعو	
۵	آقای دکتر محسن مهرور	استادیار	نماینده تحصیلات تکمیلی	

## تعهد نامه

عنوان پایان نامه: شناسایی نماتدهای انگل گیاهی مزارع گوجه فرنگی استان خراسان شمالی و بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه ای *Meloidogyne javanica* با استفاده از نشانگر RAPD-PCR  
اینجانب قاسم فدوی خلجلو دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی خانم دکتر عصمت مهدیخانی مقدم متعهد می شوم:

- نتایج ارائه شده در این پایان نامه حاصل مطالعات علمی و عملی اینجانب بوده، مسئولیت صحت و اصالت مطالب مندرج را به طور کامل بر عهده می گیرم.
- در خصوص استفاده از نتایج پژوهشهای محققان دیگر به مرجع مورد نظر استناد شده است.
- مطالب مندرج در این پایان نامه را اینجانب یا فرد یگری به منظور اخذ هیچ نوع مدرک یا امتیازی تاکنون به هیچ مرجعی تسلیم نکرده است.
- کلیه حقوق معنوی این اثر به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد. مقالات مستخرج از پایان نامه، ذیل نام دانشگاه فردوسی مشهد (Ferdowsi University of Mashhad) به چاپ خواهد رسید.
- حقوق معنوی تمام افرادی که در به دست آمدن نتایج اصلی پایان نامه تاثیر گذار بوده اند در مقالات مستخرج از رساله رعایت خواهد شد.
- در خصوص استفاده از موجودات زنده یا بافتهای آنها برای انجام پایان نامه، کلیه ضوابط و اصول اخلاقی مربوطه رعایت شده است.

تاریخ

نام و امضاء دانشجو

### مالکیت نتایج و حق نشر

- کلیه حقوق معنوی این اثر و محصولات آن (مقالات مستخرج، برنامه های رایانه ای، نرم افزارها و تجهیزات ساخته شده) به دانشگاه فردوسی مشهد تعلق دارد و بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه قابل واگذاری به شخص ثالث نیست.
- استفاده از اطلاعات و نتایج این پایان نامه بدون ذکر مرجع مجاز نیست.

## سپاسگزاری

آن بی همتای بزرگ را می ستایم که همواره الطاف بی پایانش را بر من ارزانی داشته است. اکنون که به فضل خداوند منان مراحل تحقیق و نگارش این پایان نامه به اتمام رسیده است، بر خود لازم می دانم از تمام کسانی که با بذل عنایت خویش این جانب را یاری نموده اند سپاسگزاری نمایم.

از استاد راهنمای محترم، سرکار خانم دکتر عصمت مهدیخانی مقدم که همیشه مورد لطف و مرحمت ایشان بوده ام و اجرای این پایان نامه بدون راهنمایی ها و مساعدت های فراوان ایشان میسر نبود سپاسگزارم.

از استاد مشاور گرامی، جناب آقای دکتر حمید روحانی تشکر می کنم.

از جناب آقای دکتر بهروز جعفرپور و سرکار خانم دکتر پریسا طاهری، که زحمت داوری این پایان نامه را متقبل شدند کمال تشکر را دارم.

از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی، جناب آقای دکتر محسن مهرور متشکرم.

از کلیه دوستان و همکلاسی های عزیزم، که در مراحل مختلف انجام این تحقیق بنده را یاری نموده اند، قدردانی می نمایم.

با تشکر ویژه از آقای مهندس عباس مکرم، که در انجام تمام مراحل پایان نامه همواره مرا یاری نمودند.

در پایان از خانواده مهربان و فداکارم که یاری دهنده و پشتیبان همیشگی ام بودند و تا ابد مرهون لطفشان خواهم ماند، کمال تشکر و سپاس را دارم.

## چکیده:

به منظور شناسایی نماتدهای انگل گیاهی مزارع گوجه فرنگی استان خراسان شمالی، طی سال های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹، تعداد ۵۰ نمونه خاک و ریشه از مزارع گوجه فرنگی استان جمع آوری گردید. پس از انتقال نمونه ها به آزمایشگاه، شستشوی خاک و ریشه ها و استخراج نماتدها با استفاده از روش تغییر یافته تلفیق الک و سانتریفیوژ جن کینز (Jenkins, 1964) انجام و تثبیت و انتقال آنها به گلیسرین طبق روش دگریس (De Grisse, 1969) انجام گرفت. سپس از نماتدهای جدا شده به تفکیک جنس، اسلایدهای میکروسکوپی تهیه شد. پس از بررسی های میکروسکوپی، اندازه گیری های لازم و رسم تصاویر مورد نیاز، شناسایی گونه ها با استفاده از منابع و کلیدهای موجود انجام گرفت و تعداد ۲۹ گونه نماتد متعلق به ۱۷ جنس شناسایی گردید که عبارتند از:

*Basiria* , *A. isomerus* , *Aphelenchus avenae* , *A. tuzeti* , *A. richardsoni* , *Aphelenchoides lanceolatus* , *D. medicaginis* , *D. dryadis* , *Ditylenchus acutatus* , *Boleodorus thylactus* , *B. graminophila* , *flandriensis* , *Helicotylenchus* , *Geocenamus tenuidens* , *F. vulgaris* , *F. thornei* , *Filenchus cylindricaudus* , *D. tenuidens* , *Merlinius* , *Meloidogyne javanica* , *Irantylenchus clavidorus* , *H. pseudorobustus* , *H. dihystra* , *digonicus* , *Seinura* , *Psilenchus iranicus* , *P. Thornei* , *Pratylenchus coffeae* , *Neopsilenchus magnidens* , *brevidens* , *Zygotylenchus guevarai* , *Tylenchorhynchus solani* , *tenuicaudata*

از بین جنس ها و گونه های شناسایی شده شش گونه *Basiria flandriensis* , *Aphelenchoides tuzeti* , *Geocenamus tenuidens* , *D. dryadis* , *Ditylenchus acutatus* و *Seinura tenuicaudata* برای اولین بار از ایران گزارش می شوند. در ادامه تحقیق، به منظور شناسایی نماتدهای ریشه گرهی مزارع گوجه فرنگی استان تعداد ۲۱ نمونه خاک و ریشه آلوده به نماتد از مناطق مختلف استان جمع آوری گردید. که در این نمونه ها گونه *Meloidogyne javanica* جداسازی، شناسایی و پس از خالص سازی در گلخانه بر روی رقم حساس گوجه فرنگی تکثیر گردید. جهت بررسی تنوع ژنتیکی درون گونه ای آن، استخراج DNA هر جمعیت انجام و تکنیک RAPD-PCR با ۲۳ آغازگر تصادفی و با استفاده از کیت انجام شد. پس از تجزیه و تحلیل داده ها در نرم افزار NTSYS و با توجه به نتایج کلی، نشانگر RAPD-PCR توانست ۷۳ درصد تشابه بین ۲۱ جمعیت گونه مورد مطالعه را نشان دهد.

**کلید واژه‌ها:** تنوع ژنتیکی، خراسان شمالی، گوجه فرنگی، نماتدهای انگل گیاهی و RAPD-PCR

## فهرست مطالب

۱	فصل اول: مقدمه و اهمیت تحقیق.....
۱	۱-۱- گیاهشناسی گوجه فرنگی.....
۲	۲-۱- نیاز های محیطی گوجه فرنگی.....
۲	۳-۱- بررسی وضعیت سطح زیر کشت، عملکرد و تولید در جهان.....
۳	۴-۱- بیماری های مهم گوجه فرنگی.....
۳	۵-۱- اهمیت و اهداف تحقیق.....
۵	فصل دوم: بررسی منابع.....
۵	۱-۲- اهمیت نماتد های انگل گیاهی بر روی گوجه فرنگی.....
۶	۲-۲- مطالعات انجام شده در جهان و ایران.....
۸	۳-۲- روش RAPD- PCR و کاربرد آن در شناسایی و بررسی تنوع ژنتیکی نماتدهای مولد گره ریشه.....
۱۰	فصل سوم: مواد و روش ها.....
۱۰	۱-۳- نمونه برداری.....
۱۳	۲-۳- استخراج نماتدها.....
۱۴	۱-۲-۳- استخراج نماتد های کرمی شکل از خاک.....
۱۴	۳-۳- استخراج ماده های متورم جنس <i>Meloidogyne</i> از ریشه.....
۱۴	۴-۳- کشتن، ثابت کردن و انتقال نماتد ها به گلیسرین خالص.....
۱۵	۵-۳- تهیه اسلاید های میکروسکوپی.....
۱۶	۱-۵-۳- تهیه اسلاید های دائم از نماتد های کرمی شکل.....
۱۶	۲-۵-۳- تهیه برش از شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده های بالغ جنس <i>Meloidogyne</i> و تهیه اسلاید میکروسکوپی.....
۱۷	۶-۳- مشخصات مورفولوژیک و مورفومتریک مورد استفاده در تشخیص گونه ها.....
۱۸	۱-۶-۳- مورفومتری و رسم تصاویر.....
۲۱	۷-۳- جداسازی نماتد های ریشه گرهی و خالص سازی آنها.....

۲۲	.....۸-۳-آماده سازی نمونه ها جهت استخراج DNA ژنومی.....
۲۳	.....۱-۸-۳- استخراج DNA به روش سیلوا و همکاران.....
۲۴	.....۹-۳- روشهای مولکولی مورد استفاده برای نماتد های ریشه گرهی.....
۲۴	.....۱-۹-۳-آزمون PCR.....
۲۵	.....۲-۹-۳-RAPD.....
۲۶	.....۳-۹-۳-الکتروفورز فرآورده تکثیر شده.....
۲۶	.....۱۰-۳- تجزیه و تحلیل داده های حاصل از RAPD.....
۲۸	.....فصل چهارم: نتایج و بحث.....
۲۸	.....۱-۴- نتایج.....
۲۹	.....۲-۴- شرح جنس ها و گونه های شناسایی شده.....
۲۹	.....۱-۲-۴- جنس <i>Aphelenchoides</i> Fischer, 1894.....
۳۰	.....۱-۱-۲-۴- گونه <i>Aphelenchoides lanceolatus</i> Tandon & Singh, 1974.....
۳۱	.....۲-۱-۲-۴- گونه <i>Aphelenchoides richardsoni</i> Grewal , Siddiqi & Atkey, 1992.....
۳۲	.....۳-۱-۲-۴- گونه <i>Aphelenchoides tuzeti</i> B'chir 1978.....
۳۴	.....۲-۲-۴- جنس <i>Aphelenchus</i> Bastian, 1865.....
۳۵	.....۱-۲-۲-۴- گونه <i>Aphelenchus avenae</i> Bastian , 1865.....
۳۵	.....۲-۲-۲-۴- گونه <i>Aphelenchus isomerus</i> Anderson & Hooper, 1980.....
۳۷	.....۳-۲-۴- جنس <i>Basiria</i> siddiqi, 1959.....
۳۷	.....۱-۳-۲-۴- گونه <i>Basiria flandriensis</i> Geraert, 1968.....
۳۹	.....۲-۳-۲-۴- گونه <i>Basiria graminophila</i> siddiqi, 1959.....
۴۱	.....۴-۲-۴- جنس <i>Boleodorus</i> Thorne, 1941.....
۴۲	.....۱-۴-۲-۴- گونه <i>Boleodorus thylactus</i> Thorne, 1941.....
۴۳	.....۵-۲-۴- جنس <i>Ditylenchus</i> Filipjev, 1936.....
۴۴	.....۱-۵-۲-۴- گونه <i>Ditylenchus acutatus</i> Brzeski, 1991.....



- ٤٦ .....*Ditylenchus dryadis* Anderson & Mulvey, 1980 گونه ٢-٥-٢-٤
- ٤٩ .....*Ditylenchus medicaginis* Wasilewska, 1965 گونه ٣-٥-٢-٤
- ٥٠ .....*Ditylenchus tenuidens* Gritzenko,1971 گونه ٤-٥-٢-٤
- ٥٤ .....*Filenchus* Andrassy,1954 (Mey,1961) جنس ٦-٢-٤
- ٥٤ ..... *Filenchus cylindricaudus* (wu,1969) siddiqi, گونه ١-٦-٢-٤  
.....1986
- ٥٦ .....*Filenchus thornei* (Thorne& Malek,1968)Siddiqi,1986 گونه ٢-٦-٢-٤
- ٥٧ ..... *Filenchus vulgaris* (Brzeski,1963) Lownsbery & گونه ٣-٦-٢-٤  
.....Lownsbery,1985
- ٦٠ ..... *Geocenamus* Thorne & Malek,1968 جنس ٧-٢-٤
- ٦١ .....*Geocenamus tenuidens* Thorne & Malek, 1968 گونه ١-٧-٢-٤
- ٦٤ ..... *Helicotylenchus steiner*, 1945 جنس ٨-٢-٤
- ٦٥ ..... *Helicotylenchus digonicus* perry in perry, Darling & گونه ١-٨-٢-٤  
.....Thorne, 1959
- ٦٦ .....*Helicotylenchus dihystra* (Cobb, 1893) sher , 1961 گونه ٢-٨-٢-٤
- ٦٧ .....*Helicotylenchus pseudorobustus* (Steiner,1964) Golden گونه ٣-٨-٢-٤  
.....,1956
- ٦٩ .....*Irantylenchus kheiri*, 1972 جنس ٩-٢-٤
- ٧٠ ..... *Irantylenchus clavidorus* Kheiri,1972 گونه ١-٩-٢-٤
- ٧١ ..... *Meloidogyne* Goeldi,1892 جنس ١٠-٢-٤
- ٧٣ .....*Meloidogyne Javanica* (Treub,1885) chitwood,1949 گونه ١-١٠-٢-٤
- ٧٥ .....*Merlinius* siddiqi,1970 جنس ١١-٢-٤
- ٧٥ .....*Merlinius brevidens* (Allen,1955) siddiqi,1970 گونه ١-١١-٢-٤
- ٧٧ .....*Neopsilenchus* Thorne & Malek, 1968 جنس ١٢-٢-٤
- ٧٨ ..... *Neopsilenchus magnidens* (Thorne,1949) Thorne & گونه ١-١٢-٢-٤  
.....Malek, 1968

۸۰	..... <i>Pratylenchus Filipjev</i> , 1936 جنس ۱۳-۲-۴
۸۰	<i>Pratylenchus Coffeae</i> (Zimmermann, 1898)Filipjev & گونه ۱-۱۳-۲-۴
	.....Schuermans Stekhoven, 1941
۸۱	..... <i>Pratylenchus thornei</i> sher & Allen ,1953 گونه ۲-۱۳-۲-۴
۸۳	..... <i>Psilenchus deman</i> ,1921 جنس ۱۴-۲-۴
۸۴	..... <i>Psilenchus iranicus kheiri</i> ,1970 گونه ۱-۱۴-۲-۴
۸۵	..... <i>Seinura Fuchs</i> ,1931 جنس ۱۵-۲-۴
۸۶	..... <i>Seinura tenuicaudata</i> (deMan,1885) گونه ۱-۱۵-۲-۴
۹۰	..... <i>Tylenchorhynchus cobb</i> , 1913 جنس ۱۶-۲-۴
۹۱	..... <i>Tylenchorhynchus solani</i> Gupta & Uma, 1982 گونه ۱-۱۶-۲-۴
۹۲	..... <i>Zygotylenchus Siddiqi</i> , 1963 جنس ۱۷-۲-۴
۹۳	<i>Zygotylenchus guevarai</i> (Tobar jimenz, 1963) Braun & گونه ۱-۱۷-۲-۴
	.....Loof,1966
۹۴	۳-۴- بررسی تنوع ژنتیکی جمعیت های مختلف نماتد ریشه گرهی (گونه .....( <i>Meloidogyne javanica</i> )
۹۴	۱-۳-۴- انجام واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی گونه <i>M. javanica</i>
۹۶	.....RAPD انجام واکنش ۲-۳-۴
۹۸	۳-۳-۴- تجزیه و تحلیل داده های حاصل از واکنش RAPD در بین جمعیت های ..... <i>M. javanica</i> مختلف گونه
۱۰۱	.....فصل پنجم: نتیجه گیری کلی و پیشنهادات
۱۰۱	.....۱-۵- نتیجه گیری کلی
۱۰۲	.....۲-۵- پیشنهادات
۱۰۳	.....منابع

## فهرست جداول

۱۲	جدول ۱-۳: مکان، زمان و نوع آبیاری در نمونه های جمع آوری شده.....
۲۲	جدول ۲-۳: مشخصات نمونه های جمع آوری شده، نماتد ریشه گرهی از روی گوجه فرنگی .....
۲۴	جدول ۳-۳: اجزاء واکنش PCR برای آغازگرهای OPAFjav و OPARjav.....
۲۵	جدول ۳-۴: برنامه PCR برای آغازگرهای OPAFjav و OPARjav.....
۲۵	جدول ۳-۵: اجزاء واکنش PCR برای واکنش RAPD .....
۲۶	جدول ۳-۶: برنامه PCR برای واکنش RAPD .....
۳۳	جدول ۴-۱: خصوصیات مورفومتریکی سه گونه از جنس <i>Aphelenchoides</i> اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
۳۶	جدول ۴-۲: خصوصیات مورفومتریکی دو گونه از جنس <i>Aphelenchus</i> (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
۴۱	جدول ۴-۳: خصوصیات مورفومتریکی دو گونه از جنس <i>Basiria</i> (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
۴۳	جدول ۴-۴: خصوصیات مورفومتریکی یک گونه از جنس <i>Boleudorus</i> (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
۵۳	جدول ۴-۵: خصوصیات مورفومتریکی چهار گونه از جنس <i>Ditylenchus</i> از استان خراسان شمالی (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
۵۹	جدول ۴-۶: خصوصیات مورفومتریکی سه گونه از جنس <i>Filenchus</i> از استان خراسان شمالی (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
۶۴	جدول ۴-۷: خصوصیات مورفومتریکی یک گونه از جنس <i>Geocenamus</i> از استان خراسان شمالی (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
۶۹	جدول ۴-۸: خصوصیات مورفومتریکی سه گونه از جنس <i>Helicotylenchus</i> (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
۷۱	جدول ۴-۹: خصوصیات مورفومتریکی یک گونه از جنس <i>Irantylenchus</i> (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....

- ۷۴ جدول ۴-۱۰: خصوصیات مورفومتریکی شبکه کوتیکولی انتهای بدن ماده های بالغ و لاروهای سن ۲، گونه *Meloidogyne javanica* از استان خراسان شمالی (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
- ۷۷ جدول ۴-۱۱: خصوصیات مورفومتریکی یک گونه از جنس *Merlinius* (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
- ۷۹ جدول ۴-۱۲: خصوصیات مورفومتریکی گونه *Neopsilenchus magnidens* (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
- ۸۳ جدول ۴-۱۳: خصوصیات مورفومتریکی دو گونه از جنس *Pratylenchus* (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
- ۸۵ جدول ۴-۱۴: خصوصیات مورفومتریکی یک گونه از جنس *Psilenchus* (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
- ۸۹ جدول ۴-۱۵: خصوصیات مورفومتریکی گونه *Seinura tenuicaudata* (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
- ۹۲ جدول ۴-۱۶: خصوصیات مورفومتریکی یک گونه از جنس *Tylenchorhynchus* (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
- ۹۴ جدول ۴-۱۷: خصوصیات مورفومتریکی یک گونه از جنس *Zygotylenchus* (اندازه ها بر حسب میکرومتر).....
- ۹۷ جدول ۴-۱۸: تعداد و اندازه باندهای تولید شده توسط آغازگرهای RAPD.....

## فهرست اشکال

- شکل ۴-۱: *Aphelenchoides tuzeti* (♀) ..... ۳۴
- شکل ۴-۲: *Basiria flandriensis* (♀) ..... ۳۹
- شکل ۴-۳: *Ditylenchus acutatus* (♀) ..... ۴۶
- شکل ۴-۴: *Ditylenchus dryadis* (♀) ..... ۴۹
- شکل ۴-۵: *Geocenamus tenuidens* (♀, ♂) ..... ۶۳
- شکل ۴-۶: *Seinura tenuicaudata* (♀) ..... ۸۹
- شکل ۴-۷: تکثیر باندها ۶۷۰ جفت باز توسط آغازگر اختصاصی گونه *M. javanica* ..... ۹۶
- شکل ۴-۸: الگوی نشانگر RAPD با استفاده از آغازگر OPE18 در مورد جمعیت های مختلف *M. javanica* ..... ۹۸
- شکل ۴-۹: دندروگرام حاصل از نتایج واکنش RAPD در مورد جمعیت های مختلف *M. javanica* ..... ۱۰۰

## فصل اول

### مقدمه و اهمیت تحقیق

#### ۱-۱- گیاهشناسی گوجه فرنگی

گوجه فرنگی با نام علمی لیکوپرسیکون اسکولنتوم<sup>۱</sup> و از خانواده سولاناسه<sup>۲</sup> می باشد. گیاهی است چند ساله، و به صورت یکساله کشت می شود. گوجه فرنگی معمولاً در مناطق بومی یا گرمسیری به صورت چند ساله است ولی در مناطق معتدله به صورت یکساله کشت می گردد. دارای برگ های مرکب بوده و خصوصیات گل بدین شرح است: گل های گوجه فرنگی بر روی نافه گرزمانندی با درجات متغیر، پیچیدگی های متعدد ظاهر می شود. گل دهی در یک گل آذین معین قبل از این که در گل آذین قدیمی تر متوقف گردد، شروع می شود. به این دلیل گل ها و جوانه های گل در تمامی مراحل باز شدن، معمولاً در یک شاخه وجود دارد. گل دو جنسه است و مادگی توسط لوله توپر که توسط پرچم ها ایجاد می گردد. پوشیده می شوند. از آنجایی که گل به حالت آویزان است دانه های گرده توسط نیروی ثقل به دهانه لوله جایی که کلاله قرار دارد می افتد. بنابراین

---

1 - Lycopersicon esculentum

2 - Solanaceae

خود گرده افشانی به صورت خود به خودی صورت می گیرد. در برخی از شرایط امکان دگر گرده افشانی در گوجه فرنگی نیز وجود دارد (کافی، ۱۳۷۸).

### ۱-۲- نیازهای محیطی گوجه فرنگی

گوجه فرنگی گیاهی است گرما دوست و کلیه ارقام آن حساس به سرما می باشند. درجه حرارت پایه برای جوانه زنی گیاه ۱۱ درجه سانتی گراد می باشد و در ۲۵ تا ۲۷ درجه بهترین رشد را داراست. در مورد کشت گیاه باید به طول فصل رشد توجه خاص نمود چون توجه به شرایط آب و هوایی منطقه و بررسی آمار چند ساله هواشناسی برای تنظیم تاریخ کشت بسیار مهم است. بخصوص در مناطقی مانند خراسان شمالی که سرمای دیررس بهاره یا سرمای زود رس پاییزه طول فصل رشد را کوتاه می کنند و خساراتی از قبیل سرمازدگی گیاهچه ها در بهار یا سرمازدگی محصول تولید شده در پاییز را به وجود می آورند (کافی، ۱۳۷۸).

### ۱-۳- بررسی وضعیت سطح زیر کشت، عملکرد و تولید در جهان

گوجه فرنگی به لحاظ ارزش دلاری دومین سبزی مهم دنیا است. تولید جهانی آن از ۸۸/۵۲۸ میلیون تن در سال ۱۹۹۵ به ۱۲۵/۲۶۶ میلیون تن در سال ۲۰۰۴ رسیده است. تولید گوجه فرنگی ایران در سال ۱۳۷۴ (۱۹۹۵) از ۲/۴ میلیون تن به حدود ۴/۲ میلیون تن در سال ۱۳۸۳ (۲۰۰۴) رسیده است که سهم بسیار جزئی یعنی حدود ۳/۴ درصد از تولید جهانی را به خود اختصاص داده است (مظاهری، ۱۳۸۶).

سطح زیر کشت گوجه فرنگی در استان خراسان شمالی ۳۷۲۴ هکتار و کل تولید گوجه فرنگی این استان ۱۰۳۷۸۲ تن در سال و عملکرد آن ۲۷۸۶۸ کیلوگرم در هکتار می باشد (آمار نامه کشاورزی، ۱۳۸۶).

## ۱-۴- بیماری های مهم گوجه فرنگی

بیماری ها یکی از عوامل محدود کننده کشت گوجه فرنگی به شمار می روند از جمله می توان قارچها، باکتریها، ویروسها و نماتدها را ذکر نمود که مهمترین آنها عبارتند از: سوختگی آلترناریایی گوجه فرنگی، پوسیدگی رایزوکتونایی گوجه فرنگی، بیماری های آوندی گوجه فرنگی در اثر قارچ فوزاریوم، سوختگی شاخ و برگ گوجه فرنگی، اسکروتینیای گوجه فرنگی و نماتد های ریشه گرهی (کافی، ۱۳۷۸).

## ۱-۵- اهمیت و اهداف تحقیق

به منظور اهمیت استان مورد نظر از نظر تولید گوجه فرنگی و خسارت زا بودن نماتد های انگل گیاهی بر روی این محصول و نیز با توجه به اینکه در رابطه با نماتدهای انگل گیاهی گوجه فرنگی هیچ گونه تحقیق جامع و کاملی در استان صورت نگرفته است. لذا به عنوان اولین و مهمترین قدم، شناسایی نماتدهای انگل گیاهی این محصول در استان ضروری به نظر می رسد. نماتدهای انگل گیاهی می توانند از تمام قسمت های گیاه تغذیه کنند. برخی از این گونه ها فقط از خارجی ترین بافت های گیاهی تغذیه می نمایند، تعدادی دیگر به بافت های عمیق تر نفوذ می کنند. خسارت ناشی از تعداد کمی نماتد معمولا ناچیز است ولی جمعیت های زیاد آنها صدمه شدیدی را وارد نموده و یا موجب از بین رفتن میزبان می گردند. بعلاوه، برخی از نماتد ها نیز ویروس های بیماریزا را در بین گیاهان انتقال می دهند (دراپ کین، ۱۹۸۹).

به دلیل کشت و کار روز افزون این محصول و افزایش تولید آن از طریق کاهش عوامل بیماریزا، در درجه اول شناسایی عوامل بیماریزای خاکزی ضروری به نظر می رسد، با توجه به این که نماتدها جزء عوامل بیماریزای خاکزی بوده و در جمعیت های بالا خسارت قابل توجهی وارد می کنند. لذا در درجه اول هدف از این تحقیق، شناسایی نماتدهای انگل گیاهی مزارع گوجه فرنگی در استان خراسان شمالی در نظر گرفته شد. از



سوی دیگر با توجه به اهمیت میزان تنوع ژنتیکی گونه های خسارتزای نماتدها برای پیش بینی روشهای مفید کنترل و با توجه به خسارتهای زیادی که نماتد های ریشه گرهی در مزارع گوجه فرنگی استان به بار می آورند، لذا تعیین میزان تنوع ژنتیکی این نماتد ها در دستور کار قرار گرفت. تاکنون تحقیقات متعددی در رابطه با تنوع ژنتیکی نماتد های بیماریزای گیاهی به ویژه جنس *Meloidogyne* با استفاده از نشانگرهای مولکولی<sup>1</sup> مختلف صورت گرفته است. در بررسی گونه های نماتد ریشه گرهی در منطقه، گونه *Meloidogyne javanica* مشاهده گردید. با توجه به مطالب بالا و مهم بودن گونه اخیر، تعیین تنوع ژنتیکی جمعیت های مختلف گونه مذکور با استفاده از نشانگر RAPD-PCR هدف بعدی این تحقیق قرار گرفت. انتظار می رود با استفاده از نتایج این مطالعه، علاوه بر بررسی وضعیت و اهمیت نماتد های انگل گیاهی مزارع مختلف منطقه، به خصوص نماتد ریشه گرهی، بتوان تنوع ژنتیکی نماتد ریشه گرهی را مشخص کرد تا نتایج حاصل در برنامه های اصلاحی برای شناسایی منابع مقاومت و اصلاح و ایجاد ارقام مقاوم مورد استفاده قرارگیرد.

---

1 - Molecular markers

## فصل دوم

### بررسی منابع

#### ۱-۲- اهمیت نماتدهای انگل گیاهی بر روی گوجه فرنگی

نماتدهای انگل گیاهی در کلیه ی نقاط کشاورزی جهان یافت شده و هر محصولی مورد حمله و خسارت آن ها قرار می گیرد. نماتدهای انگل گیاهی نقش مهمی در کاهش تولید سبزی ها ایفا می کنند که بستگی به بزرگی و وسعت سیستم کشاورزی به کار رفته دارد به طوریکه در سیستم های چند کشتی و وسیع و سیستم های بین کشتی در کشاورزی اهمیت کمتری دارند ولی در سیستم کشت های متمرکز اهمیت خیلی زیادی پیدا می کنند. در سیستم کشت تک محصولی یا در مزرعه ای که به طور متوالی و پشت سرهم میزبان حساس کشت می شود، جمعیت آنها افزایش یافته و می توانند خسارتزا باشند. در سیستم های چند کشتی خسارت شدید حاصل از نماتدها معمولا به مرور زمان رخ می دهد ولی در محصولاتی که به صورت تک کشتی کشت می گردند، خسارت سریعتر اتفاق می افتد (سیکورا و فرناندز، ۲۰۰۵).

## ۲-۲- مطالعات انجام شده در جهان و ایران

سندرا و همکاران در سال ۱۹۱۴ نماتدهای ریشه گرهی و نماتدهای مولد زخم را نماتدهای رایج خسارت زا در محصولات سبزی مریلند معرفی کردند. جانسون و بوخوون در سال ۱۹۶۹ نماتدهای گلخانه‌های گوجه فرنگی و خیار شهرستان اسکس در اونتاریو را شناسایی و در بررسی شان شش جنس *Aphelenchoides* ، *Aphelenchus* ، *Helicotylenchus* ، *Meloidogyne* ، *Pratylenchus* و *Tylenchus* را گزارش کردند. ارزهانوا و همکاران در سال ۱۹۸۶ نماتدهای پارازیت گیاهی ریزوسفر گوجه فرنگی را در مزارع Karakalpakia در ازبکستان بررسی کردند و از ۵۰ نمونه بررسی شده ۳۸ گونه به ترتیب زیر شناسایی شدند. ۱۸ تا *Rhabditida* ، ۱۶ تا *Tylenchida* ، ۳ تا *Enoplida* و ۱ عدد *Mononchida* بود و با بررسی توزیع جمعیت مشخص شد که بیشترین جمعیت در ۲۰-۱۰ سانتی متری لایه خاک بود. در سال ۱۹۹۴ ، یوسف و جاکوب نماتد های انگل گیاهی سبزیجات از جمله گوجه فرنگی و برخی محصولات باغی را در منطقه غور اردن شناسایی و ۶۷ گونه نماتد متعلق به ۳۲ جنس را گزارش کردند که گونه های *Meloidogyne javanica* و *M. incognita* مهمترین نماتدهای خسارتزا روی محصولات سبزی بودند. در سال ۲۰۰۵ ، کرجه و همکاران، نژاد ۲ نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne arenaria* را در اردن از روی خیار، گوجه فرنگی، کدو و لوبیا جمع آوری و گزارش نمودند. برایان گریفیتس و همکاران در سال ۲۰۰۶ تاثیر نماتد های تغذیه کننده باکتری ها را در رشد ریشه بوته های گوجه فرنگی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که بوته های گوجه فرنگی در خاکی که حاوی تعداد زیادی از نماتدهای تغذیه کننده باکتری هاست رشد زیادی دارند و دارای سیستم ریشه ای منشعب با ریشه های نازک و بلند هستند. گلا دیس امیلیا و همکاران در سال ۲۰۰۸ نماتد های پارازیت گیاهی را در ریزوسفر گوجه فرنگی و تعدادی از گیاهان گرمسیری در نواحی مختلف کلمبیا بررسی کردند و مشاهده کردند

که جنس *Meloidogyne* و گونه های (*M. arenaria* و *M. hapla* ، *M. javanica* ، *M. incognita*) بیشتر شایع بودند. باروتی در سال ۱۳۷۶ در بررسی فون نماتدهای انگل گیاهی خاک های زراعی آذربایجان شرقی ، اردبیل و مغان ، گونه *M. javanica* را از روی خیار ، گوجه فرنگی ، یونجه و بارهنگ و سیب زمینی در مناطق ذکر شده جدا کرد. احمدی و مرتضوی بک در سال ۱۳۸۱ چندین رقم متحمل و مقاوم گوجه فرنگی را نسبت به نماتد گره ریشه *Meloidogyne javanica* در استان اصفهان معرفی کردند.

در سال ۱۳۸۲ مهدیخانی مقدم و همکاران در بررسی و شناسایی گونه های جنس *Meloidogyne* در ایران، گونه *Meloidogyne javanica* را از روی ریشه های گوجه فرنگی و سایر گیاهان در مناطق مختلف ایران گزارش نمودند. پورجم و حیدری در سال ۱۳۸۳ کنترل بیولوژیکی نماتد گره ریشه *Meloidogyne javanica* روی گوجه فرنگی را توسط کمپوست حاصل از دو گونه قارچ صدفی بررسی کردند و نتیجه گرفتند که کمپوست حاصل از قارچ *Pleurotus ostreatus* بیشترین اثر را در کنترل دارد. پاک نیت در سال ۱۳۸۳ گونه های نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne spp.* را در تعدادی از مزارع و گلخانه های استان فارس بررسی کرد و گونه های *M. javanica* و *M. incognita* را شناسایی کرد. در سال ۱۳۸۵ پاک نیت گونه های نماتد ریشه گرهی (*Meloidogyne spp.*) را در تعدادی از گلخانه ها و مزارع کدوییان و گوجه فرنگی بررسی و بیان کردند که ۷۶/۴ درصد نمونه ها آلوده به جمعیت مخلوط *M. javanica* و *M. incognita* و حدود ۱۷/۵ درصد آلوده به *M. javanica* و ۶ درصد آلوده به *M. incognita* بودند. در سال ۱۳۸۶ مهدیخانی مقدم و همکاران گونه *Meloidogyne javanica* را از روی خیار از منطقه های ارومیه- بادرلو، بیرجند، سبزوار، کرج- سرحدآباد و هشتگرد جمع آوری و شناسایی کردند و جمعیت های مختلف این گونه را از نظر چند شکلی آنزیمی در رابطه با آنزیم های استراز، ملات دهیدروناز و سوپر اکسید دیسموتاز مورد بررسی قرار دادند.