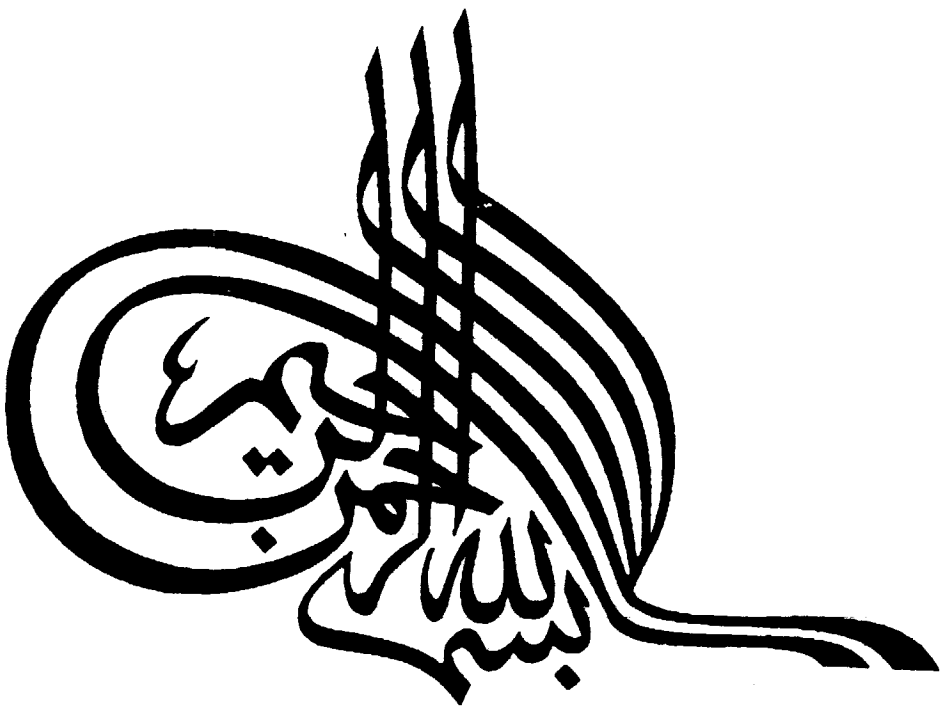
بسم الله الرحمن الرحيم

۱۳۷۸/۴/۲۰

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
تهیه مدارک

دانشگاه فردوسی مشهد

دانشکده کشاورزی

پایان‌نامه

جهت اخذ دانشنامه کارشناسی ارشد

در رشته بیماری‌شناسی گیاهی

# عنوان

# شناسایی گروههای آناستوموزی قارچ Rhizoctonia solani در مزارع سیب‌زمینی استان خراسان

استاد راهنما

دکتر ماهرخ فلاحتی رستگار

استاد مشاور

دکتر بهروز جعفرپور

نگارش

منصور صلاتی

۱۳۷۷

۱۳۲۲۵/۱

۲۴۶۴۰

## تقدیم به

پدر و مادر مهربانم

که وجودشان برایم همه عشق است و وجودم برایشان همه رنج

توانشان رفت تا به توانایی رسم و

موهایشان سپیدی گرفت تا روی سپید بمانم.

آنانکه فروغ نگاهشان، گرمی کلامشان و روشنی رویشان سرمایه جاودانی زندگی من است در برابر وجود گرامیشان زانوی ادب بر زمین می‌نهم و با دلی مالامال از عشق و محبت بر دستانشان بوسه می‌زنم.

## تقدیم به

همسر عزیزم

**بسمه تعالی**

با تأییدات خداوند متعال و با استعانت از حضرت ولی‌عصر (عج) جلسهٔ دفاع از پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد آقای مهندس منصور صلاتی تحت عنوان :

**شناسایی گروههای آناستوموزی قارچ Rhizoctonia solani در مزارع سیب‌زمینی استان خراسان**

با حضور اساتید راهنما و هیأت داوران در محل دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد در تاریخ ۷۷/۲/۱۷ ساعت ۱۰... تشکیل و با موفقیت با نمره ۱۹/۷۵ و امتیاز عالی دفاع گردید.

| | |
|---|---|
| **هیأت داوران :** | |
| **استاد راهنما:** | **دکتر ماهرخ فلاحتی رستگار** |
| **اساتید مشاور:** | **دکتر بهروز جعفرپور** |
| | **دکتر مهدی مدرس اول** |
| **استاد مدعو:** | **دکتر محمد فارسی** |
| **نماینده تحصیلات تکمیلی :** | |

# قدردانی

با حمد و سپاس به درگاه ایزد متعال و خضوع و خشوع به بارگاه ثامن‌الائمه که توفیق کسب علم و دانش و انجام این تحقیق را به اینجانب عطا فرمود، برخود لازم می‌دانم که از استاد راهنمای ارجمندم سرکار خانم دکتر فلاحتی رستگار بخاطر راهنمائی‌ها و مساعدتهایشان در امر اجرای تحقیق و همچنین جناب آقای دکتر بهروز جعفرپور بخاطر مشاوره و رهنمودهای ایشان صمیمانه تشکر نمایم.

از آقای مهندس یوبرت قوستا مربی دانشکده کشاورزی دانشگاه ارومیه به جهت در اختیار قرار دادن ایزوله‌های استاندارد این قارچ کمال تشکر و قدردانی دارم.

از آقایان دکتر Donald R.Sumner از بخش بیماری‌های گیاهی دانشگاه تیفتن جرجیا، دکتر شهریاری و مهندس حاجیان و مهندس علوی به جهت مساعدتها و همکاری‌های لازم در امر اجرای این تحقیق تشکر و قدردانی می‌شود.

از ریاست محترم گروه گیاهپزشکی آقای دکتر مدرس و از کادر محترم کتابخانه، چاپ و تکثیر، اتاق کامپیوتر، سمعی و بصری، آموزش، حسابداری، آزمایشگاه گیاهپزشکی و بیماریهای گیاهی بخصوص آقای مهندس جهان‌آرا و آقای قدیمی که در اجرای این پژوهش مرا یاری کردند سپاسگزارم.

# چکیده

طی سال زراعی ۱۳۷۶ از مجموع ۲۱ مزرعه سیب‌زمینی، تعداد ۲۵۶ نمونهٔ آلودهٔ گیاهی جمع‌آوری گردید و پس از کشت قسمت‌هایی از ساقه، استولن، ریشه و غده کلاً ۱۰۵ ایزوله که مشخصات مرفولوژیکی آنها مشابه قارچ Rhizoctonia بود شناسایی گردید، که پس از رنگ‌آمیزی هسته‌ها و بررسی واکنش آناستوموز هیف‌ها، به روش Agarfilm با ایزوله‌های استاندارد AG (1-11, BI) بجز AG8, AG10 نتایج زیر بدست آمد:

۷۱/۵٪ ایزوله‌های شناسایی شده متعلق به گروه آناستوموزی AG3، ۱۰/۵٪ متعلق به گروه آناستوموزی AG4 و ۴/۷٪ متعلق به گروه آناستوموزی AG2-1 و ۱۲/۳٪ متعلق به رایزوکتونیاهای دو هسته‌ای (BNR) و ۱٪ ایزوله‌ها با هیچیک از گروه‌های استاندارد، آناستوموز ندادند.

طی این بررسی مشخص گردید که ایزوله‌های گروه AG3 از کلیه قسمت‌های زیرزمینی گیاه سیب‌زمینی قابل جداسازی بوده و این گروه قادر به ایجاد اسکلروت در کلیه اندامهای زیرزمینی گیاه می‌باشد. ۱۰۰٪ اسکلروت‌های روی غده متعلق به گروه AG3 می‌باشند و همچنین در این نمونه‌برداری AG3 با بیشترین فراوانی و شدت بیماری‌زایی بعنوان مهمترین گروه ایجاد شانکر طوقه و ریشه در گیاه سیب‌زمینی اهمیت داشته و پس از آن به ترتیب گروه‌های AG4 و AG2-1 فراوانی بیشتری داشتند.

این اولین گزارش از شناسایی گروههایی آناستوموزی AG2-1 و AG4 از مزارع سیب‌زمینی می‌باشد.

تلاش برای تولید مرحلهٔ تلومورف ایزوله‌های مختلف علی‌رغم استفاده از هفت روش گوناگون با موفقیت روبرو نبود.

الکتروفورز پروتئین‌های محلول ایزوله‌های گروه‌های شناخته شده به روش SDS-PAGE انجام گرفت و الگوهای پروتئینی گروه‌ها با یکدیگر تفاوت بارزی را نشان داده و بین ایزوله‌های متعلق به یک گروه آناستوموزی، الگوی پروتئینی یکسان بود و تنها در بین ایزوله‌های متعلق به گروه AG4 هماهنگی لازم مشاهده نگردید. نتایج حاصله از الکتروفوروگرام ثابت می‌کند که می‌تواند به عنوان معیاری برای تفکیک گروههای آناستوموزی از یکدیگر مورد استفاده قرار گیرد.

## فهرست مطالب


**فصل اول - مقدمه** ..... ۱

۱ـ۱ معرفی گیاه سیب‌زمینی ..... ۲

۱ـ۲ اختصاصات گیاه‌شناسی ..... ۲

۱ـ۳ اهمیت بیماری ..... ۳

**فصل دوم - بررسی منابع** ..... ۴

۲ـ۱ عامل بیماری ..... ۵

۲ـ۲ ساختمان داخلی هیف و ضمائم قارچ ..... ۵

۲ـ۳ مشخصات مورفولوژیکی Rhizoctonia spp. (Ogoshi 1987-Parmeter 1969) ..... ۸

۲ـ۴ مرحله تلومورف Rhizoctonia spp. ..... ۹

۲ـ۵ گروه‌های آناستوموزی Anastomosis Groups (AG) ..... ۱۰

۲ـ۶ تکنیک‌های مولکولی و بیوشیمیایی ..... ۱۵

۲ـ۷ گروه‌های آناستوموزی گزارش شده از سیب‌زمینی ..... ۱۶

**فصل سوم - مواد و روشها** ..... ۱۹

۳ـ۱ نمونه‌برداری ..... ۲۰

۳ـ۲ محیطهای کشت مورد استفاده ..... ۲۰

۳ـ۲ـ۱ محیط کشت PDA Potato Dextrose Agar ..... ۲۰

۳ـ۲ـ۲ محیط کشت آب آگار Water Agar ..... ۲۱

۳ـ۲ـ۳ محیط کشت P.D.broth Potato Dextrose broth ..... ۲۱

۳ـ۳ معرف‌های رنگی مورد استفاده ..... ۲۱

۱-۳-۳ روش‌های رنگ‌آمیزی هسته ..... ۲۱
۱-۱-۳-۳ رنگ‌آمیزی به روش Hcl-Geimsa (Herr 1979) ..... ۲۲
۲-۱-۳-۳ رنگ‌آمیزی هسته به کمک سافرانین اُ (Bandoni, 1979) ..... ۲۲
۲-۳-۳ سایر معرف‌های رنگی Cotton Blue ..... ۲۳
۱-۲-۳-۳ آبی پنبه در آب ..... ۲۳
۲-۲-۳-۳ اریتروزین ..... ۲۳
۴-۳ جداسازی عامل بیماری ..... ۲۴
۵-۳ شناسایی گروه آناستوموزی به روش Agar Film (Roberts & Herr 1980) ..... ۲۵
۶-۳ اندازه‌گیری قطر هیف، سلولهای مونیلیوئید و اسکلروت ..... ۲۶
۷-۳ محاسبه میزان رشد کلنی در دماهای مختلف ..... ۲۷
۸-۳ روش‌های تحریک قارچ به تولید حالت جنسی ..... ۲۷
۱-۸-۳ انتقال از محیط غذایی غنی به محیط غذایی فقیر ..... ۲۷
۲-۸-۳ آگار حاوی عصارهٔ مخمر مارمایت (Murray 1982) ..... ۲۸
۳-۸-۳ آگار حاوی قارچکش (Kangatharalingam & Carson 1988) ..... ۲۸
۴-۸-۳ دانه یولاف پوست‌کنده و آگار Oat Agar (Quimio 1973) ..... ۲۹
۵-۸-۳ روش پوشاندن محیط با خاک: ..... ۲۹
۹-۳ اثبات بیماری‌زایی ایزوله‌های ریزوکتونیا ..... ۳۰
۱-۹-۳ تهیه مایهٔ تلقیح: به ۲ روش مایهٔ تلقیح تهیه گردید ..... ۳۰
۲-۹-۳ تهیه گیاه سیب‌زمینی ..... ۳۰
۳-۹-۳ روشها اثبات بیماری‌زایی ..... ۳۰
۴-۹-۳ برآورد میزان خسارت به گیاهچه‌ها (Carling et al 1990) ..... ۳۱
۱۰-۳ الکتروفورز پروتئین گروه‌های آناستوموزی ..... ۳۲
۱-۱۰-۳ تهیه عصارهٔ پروتئینی قارچ ..... ۳۲
۲-۱۰-۳ الکتروفورز پروتئین ..... ۳۳

۱-۲-۱۰-۳ تهیه ژل پلی آکریل آمید ..... ۳۴
۲-۲-۱۰-۳ تهیه محلول 30% Acrylamide / 0.8% Bise acrylamide ..... ۳۵
۳-۲-۱۰-۳ تهیه تریس ۰/۵ مولار حاوی ۰/۴ % SDS ..... ۳۵
۴-۲-۱۰-۳ تهیهٔ تریس ۱/۵ مولار حاوی ۰/۴ % SDS ..... ۳۵
۵-۲-۱۰-۳ تهیهٔ بافر تانک الکتروفورز ..... ۳۵
۶-۲-۱۰-۳ ریختن ژل پلی آکریل آمید ..... ۳۵
۷-۲-۱۰-۳ نحوهٔ عمل الکتروفورز ..... ۳۶
۸-۲-۱۰-۳ رنگ آمیزی ژل ..... ۳۶
۹-۲-۱۰-۳ رنگ بری ژل ..... ۳۷
**فصل چهارم - نتایج** ..... ۳۸
۱-۴ علائم بیماری ..... ۳۹
۲-۴ جداسازی عامل بیماری و شناسایی ایزوله‌ها ..... ۴۰
۳-۴ تحریک قارچ به تولید مرحله جنسی ..... ۴۷
۴-۴ اثبات بیماری‌زایی ..... ۴۷
۵-۴ الکتروفورز پروتئین ..... ۵۰
**فصل پنجم - بحث و نتیجه‌گیری** ..... ۵۲
**فصل ششم - ضمیمه** ..... ۶۱
منابع ..... ۶۹

# فصل اول

## مقدمه

## INTRODUCTION

## ۱-۱ معرفی گیاه سیب‌زمینی

سیب‌زمینی از محصولات غده‌ای است که نقش مهمی در تغذیه مردم جهان دارد. از نظر تولید مواد غذایی در واحد سطح هیچ محصول زراعی قادر به رقابت با سیب‌زمینی نیست. متوسط سرانه آن درایران ۴۴ کیلوگرم می‌باشد. این محصول در ۱۴۰ کشور دنیا کشت می‌شود. سطح زیر کشت این محصول در دنیا حدود ۲۲ میلیون هکتار و تولید آن حدود ۳۰۰ میلیون تن می‌باشد و پس از گندم و جو و برنج و ذرت پنجمین محصول غذایی جهان بشمار می‌رود (۶۸-۵).

در ایران، سطح زیر کشت آن ۱۴۳۲۶۶ هکتار و میزان تولید ۳۱۳۹۹۱۹ تن و راندمان تولید تقریباً ۲۲ تن در هکتار می‌باشد و در استان خراسان سطح زیر کشت ۱۰۰۰۰ هکتار و میزان تولید ۱۹۶۶۸۰ و راندمان تولید ۱۹۶۶۸ کیلوگرم در هکتار می‌باشد (۶۸-۱).

سیب‌زمینی از گیاهان بومی نیمکرهٔ غربی بوده و احتمالاً از ارتفاعات سلسله جبان آند[1] در بولیوی یا پرو منشأ گرفته است، در این نواحی گونه‌های وحشی آن وجود دارند.

کاشت آن در ایران از دوران فتحعلی‌شاه قاجار آغاز شد و انگلیسیها آن را به ایران آوردند. در حال حاضر در تمام نقاط ایران کشت آن ادامه دارد (۵).

## ۱-۲ اختصاصات گیاه‌شناسی

گیاهی است یکساله از تیره سولاناسه[2] بنام علمی Solanum tuberosum L. با ۴۸ کروموزوم، این جنس شامل ۲۰۰۰ گونه است که ۱۶۰ گونهٔ آن غده زایند.

ریشهٔ آن افشان و جانبی و در عمق ۴۰ تا ۶۰ سانتیمتری از سطح خاک نفوذ می‌کند.

ساقهٔ آن سبز و علفی و کمی گوشه‌دار می‌باشد و در رأس هر ساقه زیرزمینی این گیاه تورم‌هایی که بعداً منجر به تولید غده می‌شوند تشکیل می‌شوند. در روی غده، چشمک‌ها قرار دارند که هر چشمک حداقل حاوی ۳ جوانهٔ ساقه می‌باشد.

برگ‌های آن مرکب تک شانه‌ای بوده و متناوب روی ساقه جای می‌گیرند.

گلاذین، گرزن و لقاح، خودگشن و میوه، شبیه گوجه‌فرنگی حداکثر دو سانتیمتر قطر دارد. میوهٔ سته در

1. Andes.
2. SoLanaceae.

مدت ۴۰ روز پس از گرده‌افشانی می‌رسد و هر بوته متوسط دارای ۲۰ سته و هر سته متوسط ۲۰۰ بذر حقیقی (TPS)[1] خواهد داشت (۵).

## ۳-۱ اهمیت بیماری

شانکر ساقه گیاه سیب‌زمینی از بیماری‌های مهم مزارع سیب‌زمینی بحساب می‌آید که انتشار جهانی داشته و در هر مزرعه‌ای که اقدام به کشت سیب‌زمینی گردد، مشاهده می‌شود (٦٨).

آندرسن[2] (۱۹۸۲) طی آزمایشی که از غدهٔ سالم و آلوده به اسکلروت استفاده کرده بود، در تیمار سالم افزایش محصولی از ۲/۸ تا ۱٦/۰۳٪ نسبت به تیمار آلوده بدست آورد(۱۲).

ریچ[3] (۱۹۸۳) میزان خسارت را در مزارع از ۱٦ تا ۳۰٪ اعلام کرد (٦٨).

بنویل[4] (۱۹۸۹) ثابت کرد که غده‌های آلوده به اسکلروت، دارای محصول نهایی کمتر و کوچکتری می‌باشند. این بیماری علاوه بر خسارت کمّی، از نظر کیفی نیز محصول را تحت تأثیر قرار داده و ارزش بازارپسندی غده‌ها راکاهش می‌دهد (۱۷).

1. True Potato Seed.
2. Anderson 1982.
3. Rich 1983.
4. Banville 1989.

# فصل دوم

# بررسی منابع

# LITERATURE REVIEW

## ۲-۱ عامل بیماری

ازگروه قارچهای عقیم[1] و فاقدکنیدی بوده و بنام Rhizoctonia solani kühn می‌باشدکه فرم جنسی آن توسط Flentje 1956 به نام Thanatephorus cucumeris(frank) Donk شناسایی شده است. این پاتوژن از نظر دامنه میزبانی، خصوصیات رویشی و قدرت بیماری‌زایی دارای تنوع زیادی است (Parmeter & Whitney, 1970).

Rhizoctonia spp. برای اولین‌بار توسط Decandol 1815 شناسایی گردید و پس از آن توسط Kühn 1858 بنام R. solani نام‌گذاری شد (۵۳) خسارت حاصله ازاین قارچ درگیاهانی چون: لوبیا ـ کلم ـ پنبه ـ کاج ـ گوجه‌فرنگی ـ گندم ـ جو ـ چمن و بیش از ۲۵۰ گیاه دیگر دارای اهمیت اقتصادی می‌باشد. جای تردید است، محصولی را بتوان یافت که نسبت به تمام استرین‌های این پاتوژن بتواند مقاوم باشد (۵۸).

بیماری‌های حاصله توسط این قارچ درگیاهان مختلف شامل:

- پوسیدگی بذر
- مرگ گیاهچه[2]
- پوسیدگی ریشه
- شانکر هیپوکوتیل و ساقه[3]
- پوسیدگی انتهایی درگیاه
- پوسیدگی شاخه، برگ و جوانه
- سوختگی اندام‌های هوایی گیاه
- پوسیدگی قسمت‌های همجوار با خاک
- پوسیدگی در انبار[4]

## ۲-۲ ساختمان داخلی هیف و ضمائم قارچ (۷۳)

ساختمان داخلی هیف شامل: سیتوپلاسم، هسته، میتوکندری، واکوئل، شبکه آندوپلاسمی،

1. Mycelia sterilia.
2. Pre and Post emergence damping off.
3. Stem Canker.
4. Storage rot.

ریبوزوم‌ها، اجسام چربی، گرانول‌ها (گلیکوژن)، میکروتوبولها، لومازوم‌ها، وزیکولهای سیتوپلاسمی، دیواره‌های هیف و محتویات دستگاه دیوارهٔ عرضی می‌باشد، که به‌طور خلاصه به اجزاءمهم آن اشاره می‌شود.

## دیواره سلولی[1]

این دیواره در نزدیکی نوک هیف شامل یک لایهٔ واحد به ضخامت حدود ۸۰ آنگستروم می‌باشد که با افزایش سن سلولها، لایه‌های اضافی دیوارهٔ سلولی به صورت متمایل به مرکز ساخته می‌شوند بعضی دیواره‌ها ضخامت بیشتری پیدا می‌کنند (یک میکرون بیشتر). در این مرحله دیواره‌ها ملانیزه می‌شوند. مقطع عرضی دیوارهٔ سلولی شامل دو صفحهٔ تیره می‌باشد که با دیواره‌های عرضی بصورت پیوسته درمی‌آیند. دیواره‌های عرضی بر اساس سن‌شان از یک تا چندین تیغه (Lamellae) دارا می‌باشند.

## دیوارهٔ عرضی[2]

دیوارهٔ عرضی دراین قارچ از نوع بشکه‌ای است و دارای سوراخی به قطر ۰/۲-۰/۱ میکرون می‌باشد. یک آماس حلقوی، بی‌شکل در نزدیکی مرکز دیواره عرضی وجود دارد و سرحد دیواره عرضی را تشکیل می‌دهد یک کلاهک غشائی مشبک (Parenthosom) در هر دو طرف دیواره بصورت یک ساختمان گنبدی شکل وجود دارد. غشاء پلاسمائی از یک سلول به سلول بعدی بصورت پیوسته است که دور تا دور آماس دیواره کشیده شده و نیز از داخل سوراخ دیوارهٔ عرضی عبور می‌کند.

مرفولوژی کمپلکس دیوارهٔ دولیپور - پارنتزوم و اهمیت تاکسونومیکی آن به وسیلهٔ Moore 1980-1989 مورد بررسی و تجدید نظر قرارگرفت و به تاکسونهای[3] خاصی محدود گردید. لذا مرفولوژی دیوارهٔ عرضی سلول هیف یک مشخصه تاکسونومیکی کلیدی بحساب می‌آید(۴۹).

دیواره‌های عرضی ثانویه در هیف‌های پیرتر ممکن است تشکیل شوند. و تفاوت آنها با نوع اولیه در این است که دیواره‌های عرضی اولیه درمحل اتصال به دیوارهٔ سلولی ضخیم‌تر هستند، درحالیکه دیواره‌های عرضی ثانویه نازک‌تر بوده و یا هم‌ضخامت با دیوارهٔ سلولی می‌باشند.

1. Cell wall. 2. Crosswall. 3. Taxon.