

بِسْمِ اللّٰهِ الرَّحْمٰنِ الرَّحِيْمِ





1981 / 77 14



دانشگاه تبریز
دانشکده کشاورزی
گروه گیاه‌پزشکی

پایان نامه:

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری‌شناسی گیاهی

عنوان:

ارزیابی میزان مقاومت گیاهچه لاین‌های مختلف چغندر قند به *Pythium ultimum* Trow.

017135

استاد راهنمای:

دکتر اسدالله بابای اهری

۱۵

استاد مشاور :

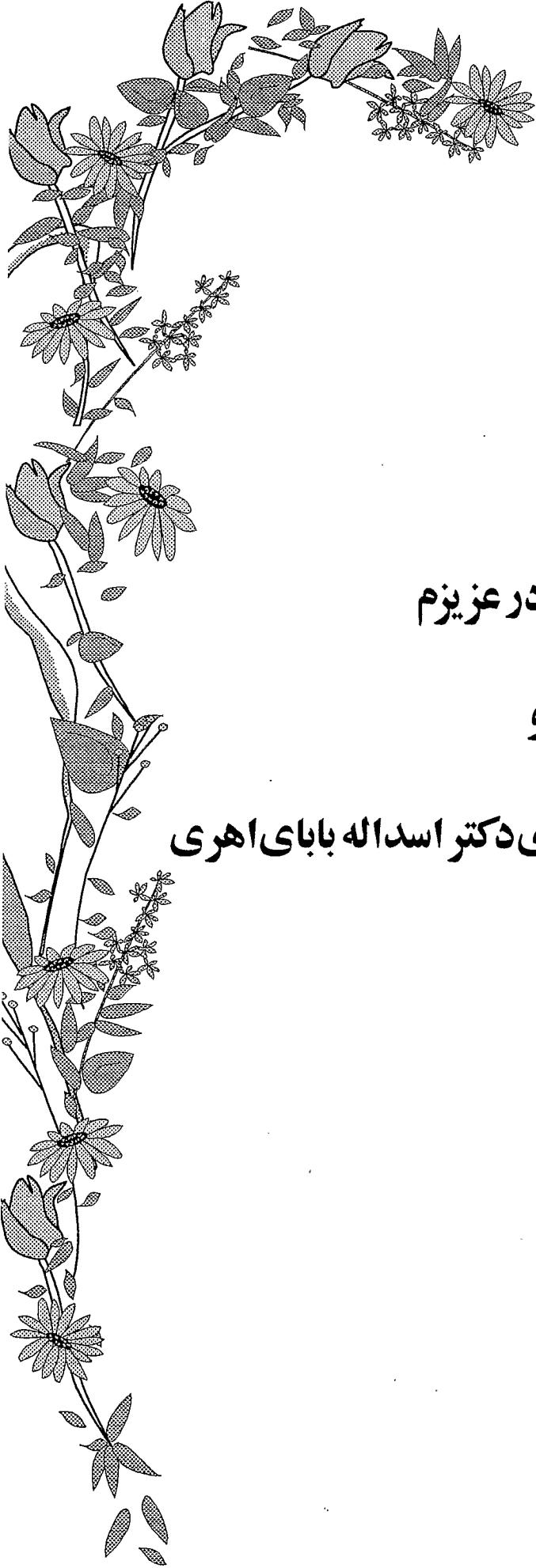
دکتو^r اسلام مجیدی هروان

پڑو ہشگر:

مسعود ابریں نیا

شماره پایان نامه: ۳۵

دیہمن ماه ۱۳۸۰



تقدیم به

پدر و مادر عزیزم

و

استاد ارجمند م جناب آقای دکتر اسدالله بابای اهری

سپاسگزاری

حمد و سپاس خدای را که لذت آموختن را بر من ارزانی داشت و توفيق داد تا مقطع دیگری از تحصیلاتم را به پایان رسانم.

برخویش لازم می دانم از راهنمایی های ارزنده و مساعدتهای بی دریغ استاد بزرگوار جناب آقای دکتور اسدالله بابای اهری که در اجرای این تحقیق همواره با صبر و بردباری مرا یاری فرمودند از صمیم قلب تشکر و قدردانی نمایم.

از زحمات و محبت های بی شائبه استاد مشاور محترم جناب آقای دکتر اسلام مجیدی هروان کمال تشکر را دارم.

از داور محترم پایان نامه استاد ارجمند جناب آقای دکتر پیغمی که زحمت بازخوانی این پایان نامه را تقبل فرمودند سپاسگزاری می نمایم.

از استاد محترم جناب آقای دکتر محمد مقدم که در تجزیه و تحلیل داده ها مرا یاری فرمودند قدردانی می گردد.

از زحمات و مساعدتهای نماینده محترم تحصیلات تكمیلی جناب آقای دکتر یوسف مجتهدی کمال تشکر را دارم.

از مدیریت محترم گروه گیاهپژشکی جناب آقای دکتر میرجلیل حجازی و سایر اساتید گروه گیاهپژشکی که در تمام دوران تحصیل دانشگاهی از حضورشان کسب فیض کرده ام تشکر و قدردانی می نمایم.

از استاد ارجمند جناب آقای مهندس ترابی که از هیچگونه کمکی در حق اینجانب دریغ نفرموده اند صمیمانه تشکر می کنم.

از اعضای هیئت علمی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندر قند کرج به خصوص آقایان دکتر صادقیان، دکتر رنجی و مهندس ارجمند به پاس مساعدت و همکاری در اجرای این پژوهش تشکر و قدردانی می گردد.

زحمات و کمکهای آقایان زاهدی و شهیم درخور تقدیر و تشکر می باشد. از دوستان عزیز آقایان مهندسین رنجبر، داوری، باغبان، رفیعی، شکرپور، نوروزی، علیزاده، یزدانیان، حسنپور، شبانی، حاجی قبر، نوری نژاد و خانم مهندس سنبله که هر یک به طریقی در اجرای کارهای پایان نامه مرا یاری فرمودند تشکر و قدردانی می نمایم.

در نهایت از خانواده ارجمند، به خصوص پدر و مادرم صمیمانه تشکر و قدردانی می نمایم که بی شک اگر هم موفقیتی کسب کرده ام در زیر سایه حمایت ها و تشویق های آنان بوده است.

نام خانوادگی : ابرین نیا

نام : مسعود

عنوان پایان نامه : ارزیابی میزان مقاومت گیاهچه لاین های مختلف چغندر قند به *Pythium ultimum* Trow در شرایط گلخانه

استاد راهنما : دکتر اسدالله بابای اهری

استاد مشاور : دکتر اسلام مجیدی هروان

مقطع تحصیلی : کارشناسی ارشد رشته : مهندسی کشاورزی - گیاهپژوهشکی گرایش : بیماری‌شناسی گیاهی
دانشگاه : تبریز دانشکده : کشاورزی تاریخ فارغ‌التحصیلی : ۱۳۸۰/۱۱/۱۰ تعداد صفحه : ۱۵۱

کلید واژه‌ها : *Pythium ultimum*, گیاهچه میری، مقاومت، چغندر قند

چکیده :

چغندر قند یکی از دوازده گیاه اصلی بوده و از نظر ارزش غذایی در ردیف برنج، ذرت، گندم، سیب‌زمینی و حبوبات قرار دارد. بیماری گیاهچه میری یکی از تهدیدات جدی برای این گیاه شناخته شده است که بدون شک *Pythium ultimum* از مهمترین عوامل ایجاد این بیماری به شمار می‌رود. به منظور جداسازی گونه‌های *Pythium* عامل گیاهچه میری در چغندر قند، در اردیبهشت ماه ۱۳۷۹ از خاک مزارع چغندر قند شهرستانهای میاندوآب، اردبیل و خوی نمونه‌هایی تهیه و بذور چغندر قند الیت ۷۲۳۳ در شرایط گلخانه در همان نمونه‌ها کشت گردید. گیاهچه‌هایی که در طول مدت ۳ هفته آزمایش علایم گیاهچه میری از خود نشان می‌دادند، گزینش و بر روی محیط کشت انتخابی (آرد ذرت آگار حاوی پنی سیلین، سولفات استرپتومایسین، پیماماریسین و بنومیل) کشت گردیدند. از گیاهچه‌های بیمار مجموعاً ۷۸ ایزوله جداسازی و مورد بررسی تاکسونومیکی قرار گرفت و ۶ گونه و واریته و دو گروه به شرح زیر شناسایی گردید:

P. P.paroecandrum P.ostracodes P.oligandrum P.deliens P.aphanidermatum

ضمناً *Pythium* group HS و *Pythium* group T و دو گروه *ultimum* var. *ultimum* و *P.ultimum* var. *ultimum* شناسایی ۵ ایزوله نیز امکان‌پذیر نبود که به عنوان *Pythium* sp. معرفی گردید. در بین آنها *P.ultimum* var. *ultimum* گونه غالب شناخته شد.

مطالعات بیماریزایی ۳۳ ایزوله منتخب در شرایط گلخانه با استفاده از روش لایه‌ماهیه تلقیح صورت گرفت و درصد جوانه‌زنی بذور و بقای گیاهچه‌ها سه هفته بعد از تاریخ کاشت محاسبه شد و

علوم گردید که از بین ایزووله‌های منتخب، *P. ostracodes*، دو ایزووله *P. oligandrum* و دو ایزووله *P. aphanidermatum* sp. فاقد قدرت بیماریزایی بودند، در حالیکه دوایزووله متعلق به گونه *Pythium* sp. یک ایزووله متعلق به *P. ultimum* var. *ultimum* و یک ایزووله *Pythium* group HS از بیماریزایی بسیار بالا برخوردار بودند، سایر ایزووله‌ها در حد واسطه این دو گروه قرار داشتند. براساس نتایج آزمایشات اثبات بیماریزایی، ۲ ایزووله ۱۳ و ۱۹ از *P. ultimum* که به ترتیب دارای بیماریزایی خیلی شدید و شدید بوده و از خاک مزارع چغندرقند میاندوآب جدا شده بودند، برای انجام آزمایش ارزیابی مقاومت برگزیده شدند.

جهت انجام آزمایش ارزیابی مقاومت، هر ۲ ایزووله منتخب در ظروف پتری حاوی محیط کشت مایع PDB کشت داده شدند. در مرحله بعد برای القاء تولید تورم‌های هیفی، طبق روش نلسون و کرافت (۱۹۸۹) توده‌های میسلیومی با بافر شستشو، شسته شدند. سپس توده‌های میسلیومی حاوی تورم‌های هیفی را با خاک الک‌کرده استریل مخلوط کرده به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از اینکه کاملاً خشک گردیدند، بصورت پودر درآمد.

برای تعیین CFU مایه تلقیح (خاک + تورم‌های هیفی) دو روش کشت سوسپانسیون رقیق شده خاک و قطرات سوسپانسیون خاک مورد بررسی قرار گرفت که براساس روش قطرات سوسپانسیون خاک CFU ایزووله ۱۳، $10^5 \times 3/2$ و ایزووله ۱۹، $10^5 \times 1/4$ تعیین گردید.

محاسبه ED₅₀ به روش چن و همکاران (۱۹۸۷) و با استفاده از شاخص بیماری انجام گرفت که طبق این روش، ED₅₀ دو ایزووله ۱۳ و ۱۹ به ترتیب ۲۰ و ۱۳ تعیین گردید.

میزان مقاومت گیاهچه‌های ۲۰ لاین چغندرقند به دو ایزووله *P. ultimum* منتخب، در شرایط گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت، برای این کار طبق روش لوتر بچر و همکاران (۲۰۰۰)، از مقیاس صفر تا ۵ با اندازه تغییراتی استفاده شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که از بین ۲۰ لاین مورد آزمایش، ۴ لاین به ذکر است که لاین Rhizofort نیز همراه با ۴ لاین فوق در یک گروه قرار گرفته و ظاهراً نسبت به بیماری متحمل بود ولی چون بذور این لاین در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند با ماده‌ای حاوی قارچکشها ایپرودیون و هایمکسازول و حشره‌کش فورادان پوشش یافته بود بنابراین احتمالاً تحملی که در این لاین نسبت به بیماری دیده شد به دلیل اثر قارچکشها باشد.

فهرست مطالب

صفحه

عنوان

جکندہ

عنوان

صفحه

۳۵	۱-۲-۸-۱-۱- جداسازی عامل بیماری
۳۵	۱-۲-۸-۱-۱- جداسازی از خاک
۳۶	۱-۲-۸-۱-۱-۱- طعمه گذاری
۳۸	۱-۲-۸-۱-۲- کشت سوسپانسیون رقیق شده خاک
۳۹	۱-۲-۸-۱-۳- روش استفاده از قطرات سوسپانسیون خاک
۴۰	۱-۲-۸-۱-۴- روش استفاده از ذرات خاک
۴۱	۱-۲-۸-۲- جداسازی از بافت گیاهی
۴۲	۱-۲-۹-۱- تولید مایه تلقیح
۴۲	۱-۲-۹-۱-۱- تولید مایه تلقیح در محیط کشت مایع
۴۲	۱-۲-۹-۱-۱-۱- تولید اسپرانثر
۴۴	۱-۲-۹-۱-۲- تولید آسپور
۴۶	۱-۲-۹-۲- تولید مایه تلقیح در سوبسترای جامد
۴۷	۱-۲-۱۰- مقاومت چغندرقند به بیماری مرگ گیاهچه ناشی از <i>P.ultimum</i>
۴۷	۱-۲-۱۱-۱- کنترل
۴۸	۱-۲-۱۱-۱-۱- کنترل زراعی
۴۸	۱-۲-۱۱-۱-۱-۱- زهکشی خاک
۴۸	۱-۲-۱۱-۱-۱-۲- تناوب زراعی
۵۰	۱-۲-۱۱-۱-۳- تغییر زمان کشت
۵۰	۱-۲-۱۱-۱-۲- کنترل شیمیایی
۵۲	۱-۲-۱۱-۳- کنترل بیولوژیکی
۵۳	۱-۲-۱۱-۴- ارقام مقاوم
۵۴	هدف

فصل دوم: مواد و روشها

۱-۲- محل اجرای آزمایش ۵۵
۲-۲- مواد گیاهی ۵۶
۳-۲- عامل بیماریزا ۵۶
۱-۳-۲- تهیه ایزوله های پیتیوم عامل بیماری مرگ گیاهچه ۵۶
۲-۳-۲- جداسازی پیتیومها از گیاهچه های بیمار ۶۰
۳-۲-۲- تشخیص ایزوله های پیتیوم ۶۱
۴-۲- اثبات بیماریزایی ایزوله های پیتیوم و گزینش ایزوله های <i>P.ultimum</i> ۶۵
۱-۴-۲- تهیه مایه تلکیح ۶۵
۲-۴-۲- تلکیح خاک گلدانها ۶۵
۳-۴-۲- طرح آزمایشی و نحوه اجرا ۶۶
۴-۴-۲- تعیین بیماریزایی ایزوله ها ۶۸
۵-۴-۲- رعایت اصول کُنخ ۶۸
۵-۲- آزمایش ارزیابی واکنش لاین های چغندرقند نسبت ۶۸
۱-۵-۲- تهیه مایه تلکیح ۶۸
۲-۵-۲- تعیین CFU مایه تلکیح ۷۱
۱-۵-۲-۱- کشت سوسپانسیون رقیق شده خاک (Soil dilution plating) ۷۱
۲-۵-۲-۲- استفاده از روش قطرات سوسپانسیون خاک (Soil drop technique) ۷۲
۳-۵-۲- تعیین ED ₅₀ ایزوله های مورد مطالعه ۷۴
۴-۵-۲- روش محاسبه ED ₅₀ ۷۵
۵-۵-۲- ارزیابی میزان مقاومت گیاهچه لاین های چغندرقند ۷۶
۱-۵-۲-۱- نحوه انجام آزمایش ۷۶

۷۷	۲-۵-۵-۲- طرح آزمایشی و نحوه اجرا
۷۷	۲-۵-۵-۳- نحوه ارزیابی مقاومت
۸۰	۲-۶- تجزیه آماری

فصل سوم: نتایج و بحث

۸۱	۱-۳- پتانسیل وقوع بیماری مرگ گیاهچه در خاک مزارع
۸۱	۱-۱-۳- تجزیه واریانس
۸۱	۱-۱-۳- مقایسه میانگین ها
۸۲	۱-۳- گونه های پیتیوم جدا شده از بذور پوسیده و گیاهچه های بیمار چغندر قند
۸۷	۱-۳- توصیف گونه ها و ایزوله های جدا شده
۸۷	۱-۳-۱- <i>P.aphanidermatum</i> (Edson) Fitzp.
۹۰	۱-۳-۲- <i>P.deliens</i> Meurs
۹۱	۱-۳-۳- <i>P.oligandrum</i> Drechsler
۹۳	۱-۳-۴- <i>P.ostrachodes</i> Drechsler
۹۹	۱-۳-۵- <i>P.paroecandrum</i> Drechsler
۱۰۰	۱-۳-۶- <i>P.ultimum</i> Trow var. <i>ultimum</i>
۱۰۱	۱-۳-۷- <i>Pythium</i> group HS
۱۰۲	۱-۳-۸- <i>Pythium</i> group T
۱۰۴	۱-۳-۹- ایزوله های شناسائی نشده
۱۰۴	۱-۳-۴- اثبات بیماریزایی ایزوله های پیتیوم
۱۰۶	۱-۳-۴-۱- مقایسه درصد جوانه زنی بذور پس از تلقیح با عامل بیماری
۱۰۶	۱-۳-۴-۱- تجزیه واریانس

۱۰۶	۱-۴-۳- مقایسه میانگین ها.....	۲
۱۰۶	۲-۴-۳- مقایسه درصد بقاء گیاهچه ها پس از تلکیح با عامل بیماری.....	۲
۱۰۶	۱-۴-۲-۳- تجزیه واریانس.....	۱
۱۱۰	۲-۴-۳- مقایسه میانگین ها.....	۲
۱۱۰	۳-۴-۳- مقایسه میانگین درصد جوانه زنی و درصد بقاء گیاهچه ها.....	۳
۱۱۰	۴-۳- تجزیه کلاستر بیماریزایی ایزوله های پیتیوم براساس.....	۴
۱۱۵	۵-۳- رعایت اصول کخ.....	۵
۱۱۵	۵-۳- گزینش ایزوله های <i>P.ultimum</i> برای آزمایش ارزیابی مقاومت.....	۵
۱۱۶	۶-۳- تهیه مایه تلکیح	۶
۱۱۶	۷-۳- تعیین CFU مایه تلکیح	۷
۱۱۶	۱-۷-۳- کشت سوسپانسیون رقیق شده خاک	۱
۱۱۷	۲-۷-۳- استفاده از قطرات سوسپانسیون خاک	۲
۱۱۸	۸-۳- ایزوله های <i>P.ultimum</i> مورد مطالعه	۸
۱۲۱	۹-۳- ارزیابی واکنش گیاهچه لاین های چغندر قند نسبت به ایزوله های <i>P.ultimum</i>	۹
۱۲۱	۱-۹-۳- اعمال تغییرات در مقیاس صفر تا ۵.....	۱
۱۲۷	۲-۹-۳- تجزیه واریانس مقیاس لاین ها	۲
۱۲۷	۳-۹-۳- مقایسه میانگین مقیاس لاین ها.....	۳
۱۲۹	۴-۹-۳- تجزیه کلاستر میانگین مقیاس لاین ها.....	۴
۱۳۳	نتیجه گیری	
۱۳۴	پیشنهادات	
۱۳۵	منابع مورد استفاده	

مقدمه

چغندرقند یکی از دوازده گیاه اصلی و در عین حال جدیدترین آنهاست که غذای مردم جهان را تأمین می‌کند و از نظر ارزش غذایی در ردیف برج، ذرت، گندم، سیب‌زمینی و حبوبات قرار دارد. فرآورده‌های قند یکی از عمده‌ترین و ارزانترین مواد غذایی است که جایگاه خاصی در تغذیه انسان دارد و بعنوان سرچشمه انرژی، و غذایی خالص با جنبه‌های حیاتی محسوب می‌شود (۹). چغندرقند یکی از دو محصولی است (همراه با نیشکر) که از مهمترین منابع تأمین کننده قند می‌باشد (۴). غده چغندرقند در گذشته‌های دور نیز مورد استفاده انسان بوده است بطوریکه بخشی از غذای ویژه مصریان را در طی ساختن اهرام مصر تشکیل می‌داده است (۹).

سازگاری وسیع چغندرقند و پتانسیل‌های بالای آن در تولید شکر با هزینه‌کم موجب شده است که این زراعت در اوایل قرن نوزدهم از مبدأ خود در اروپای مرکزی به سرتاسر جهان گسترش یابد. هم‌اکنون این محصول بجز استرالیا در تمام قاره‌های مسکونی کشت گردیده و به صورت یک محصول مهم از نظر اقتصادی درآمده است (۴).

از چغندرقند و نیشکر در هر سال حدود ۱۱۰ میلیون تن شکر در جهان استحصال می‌شود و میزان قند و شکر استحصالی از این دو گیاه در ایران، سالانه ۷۸۰۰۰ تن است که ۷۵ درصد آن از چغندرقند بدست می‌آید (۹).

با اینکه مدت زیادی از زمان کشت چغندرقند بعنوان یک گیاه صنعتی نمی‌گذرد اما تا سال ۱۹۸۰ مواد قندی استحصالی از این گیاه توانست ۴۰ درصد از بازار جهانی قند و شکر را به خود اختصاص دهد (۹).

سطح زیر کشت چغندرقند در ایران در حدود ۱۷۰ هزار هکتار است که تولیدی معادل ۴/۳ میلیون تن را به همراه دارد (۲۳). مصرف قند و شکر در ایران حدود ۱/۵ میلیون تن در سال است که حدود ۸۰۰۰۰ تن آن از خارج وارد می شود (۹).

تولید چغندرقند خالی از مخاطره و در دسر نبوده و انواع بیماریها همواره از تهدیدات جدی این محصول به شمار می روند. بیماریهای مختلف گیاهچه‌ای نظیر پوسیدگی بذر، مرگ گیاهچه قبل و یا پس از سبز شدن و آلو دگی ریشه و محور زیر لپه تهدید جدی برای این گیاه شناخته شده است. بیماریهای گیاهچه‌ای، توسط قارچهای مختلفی ایجاد می شود که بدون شک *P. ultimum* از مهمترین آنها بشمار می رود (۷۱). *P. ultimum* در سطح بسیار وسیع خاکهای زراعی وجود داشته و در هر زمینی که چغندرقند کشت شود جمعیت آن و در نتیجه میزان بیماریهای گیاهچه‌ای در آن زمین نیز به شدت افزایش می یابد (۴۵، ۷۱ و ۱۱۰).

خسارت ناشی از *P. ultimum* بر روی گیاهچه‌های چغندرقند از تمام نقاط دنیا گزارش شده است (۳۰، ۴۵، ۶۹، ۷۰، ۹۶، ۹۷، ۱۱۰، ۱۳۰، ۱۳۳، ۱۳۴ و ۱۳۵).

به خاطر قیمت بالا و اثرات منفی آفتکشها بر روی سلامت انسان و محیط زیست، مواضع بشر در مورد آفتکش‌های مورد استفاده در حال تغییر است. در این راستا صنعت چغندرقند نیز در صدد ایجاد مقاومت پایدار نسبت به بیماریها، در ارقام چغندرقند گردیده است. امروزه دسترسی کشاورزان به ارقام چغندرقند مقاوم به بیماریهای گیاهچه‌ای بسیار محدود بوده و ارقام تجاری موجود، مقاومت موثری در مقابل این بیماری از خود نشان نمی دهند. در چند سال اخیر تحقیقاتی در این زمینه در IACR-Broom's Barn^۱ انجام گرفته و منابعی از مقاومت نسبت به

بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *P.ultimum* شناسایی شده است. در حال حاضر، محققین این مرکز در حال بررسی توارث صفت مقاومت ژنی هستند تا تعداد ژنهای موثر آن را تعیین کنند (۷۸ و ۷۹).

تحقيقی که در پیش رو است، با هدف ارزیابی مقاومت تعدادی از لاین‌های چغندرقند نسبت به *P.ultimum* عامل بیماری مرگ گیاهچه تنظیم شده است. در این راستا، مقاومت ۲۰ لاین مختلف پیشنهادی موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه بذر چغندرقند، نسبت به این پاتوژن مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. امید آنکه نتایج حاصل از این تحقیق بتواند در خدمت به کشاورزان که زحمتکش‌ترین قشر جامعه می‌باشند موثر واقع شده و گام موثری در راستای تحقق آرمان خودکفایی کشور قرار گیرد.

فصل اول

بررسی منابع

۱- میزبان (چغندرقند)

۱-۱-۱- معرفی چغندرقند

شواهد و قرائن موجود نشانگر کشت ابتدائی چغندر در سواحل مدیترانه می‌باشد. در مناطق یاد شده گونه‌های متفاوت چغندر به عنوان سبزی زراعت و از برگ آن استفاده می‌گردید و احتمالاً گونه‌های مورد استفاده در آن زمان شبیه گونهٔ امروزی چغندرقند اسفناجی یا سویس چارد^۱ بوده است. این گیاه در تمدن‌های یونان و روم یکی از مکمل‌های با ارزش غذایی به شمار می‌رفت (۴). در قرن پنجم قبل از میلاد نیز از چغندرقند برای مصارف درمانی استفاده می‌کردند (۷۱).

اگرچه هزاران سال از کشت گیاه چغندرقند می‌گذرد لیکن اهمیت آن بعنوان غذا و منبع قند و انرژی در سال‌های اخیر شناخته شده است. خاصیت شیرینی آن برای اولین بار در حدود دهه ۱۵۰۰ گزارش شد اما تا سال ۱۷۴۷ که آندریاس سیگیسموند مارگراف^۲ (رئیس آکادمی علوم فیزیک برلن) توانست کریستال قند را بدست آورد، این گیاه بعنوان منبع قند محسوب نمی‌شد. حدود چهل سال بعد یکی از شاگردان وی بنام کارل آشارد^۳ متوجه شد که چغندرهای پوست سفید حاوی مقدار قند بیشتری هستند. بدنبال تحقیقات مذبور، اولین کارخانه قند در سال ۱۸۰۲

1- Swiss chard
3- Carl Achard

2- Andreas sigismund marggraf