دانشکده تولید گیاهی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی‌ارشد در رشته
بیوتکنولوژی در کشاورزی

تجزیه پروتئوم هتروزیس دخیل در مقاومت به بیماری سپتوریوز برگی در گندم نان

پژوهش و نگارش:
علی سعیدی‌پور

اساتید راهنما:
دکتر احد یامچی
دکتر سعید نواب‌پور

اساتید مشاور:
دکتر حسن سلطانلو
دکتر سیده ساناز رمضانپور
دکتر سید رضا زارعی

تابستان ۱۳۹۳

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه‌های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود؛ بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱- قبل از چاپ پایان نامه خود، مراتب را قبلا به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.
۲- قبل از چاپ پایان نامه در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
۳- انتشار نتایج پایان نامه باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **علی سعیدی‌پور** دانشجوی رشته **بیوتکنولوژی در کشاورزی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

نام و نام خانوادگی و امضاء

تقدیم به

خانواده عزیزم

که چگونه زیستن را به من آموختند

استاد بزرگوارم دکتر احد یامچی

تشکر و قدردانی

سپاس پروردگارم را...

میتایم آنانراکه اندیشیدن را به من آموختندنه اندیشه ها را:

جناب آقای دکتر احد یامچی (استاد راهنمای اول)

جناب آقای دکتر سعید نواب پور (استاد راهنمای دوم)

جناب آقای دکتر حسن سلطانلو (مشاور اول)

سرکار خانم سیده سانازرمضانپور (مشاور دوم)

جناب آقای دکتر سید رضا زارعی (مشاور سوم)

از آقای مهندس شعبان کیا کارشناس محترم ایستگاه تحقیقات کشاورزی و آقایان مهندس راعی و مهندس اسلامی مسئولین محترم آزمایشگاه ژنتیک و اصلاح به جهت همکاری صمیمانه شان سپاسگزارم.

از تمامی دوستانم به ویژه خانم ها کیانا کبیر، نسترن عالمی و آقایان داوود کیانی و محمد حسن شکری جهت همکاری هایشان کمال تشکر را دارم...

چکیده

برخی صفات در گندم که در هیبرید نسبت به والدین، تفاوت معنی‌داری را نشان می‌دهند، پدیده هتروزیس را بروز می‌کنند. این پدیده توسط ژن‌ها و یا پروتئین‌هایی کنترل می‌شوند که شناسایی این ژن‌ها و پروتئین‌ها از دیدگاه ملکولی در پروژه‌های اصلاح گیاهان، از اهمیت بسیاری برخوردار است. این تحقیق به منظور بررسی وجود اثر هتروزیس در مقاومت به بیماری سپتوریوز برگ گندم (*Septoria tritici* Rob. Ex Desm.) در رقم تجن (والد حساس)، لاین (BOBWHITE#1/FENGKANG)، (والد مقاوم) و نسل اول حاصل از تلاقی آنها انجام گرفت. بدین منظور در سال ۱۳۹۲، این ژنوتیپ‌ها در واحد گلخانه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان کشت گردیدند. تلقیح ارقام در یک نوبت و به شکل همزمان انجام گرفت، قبل از تلقیح، از بافت برگ پرچم (شاخص مقاومت به قارچ) نمونه‌گیری به عمل آمد، نمونه‌گیری بعدی پس از ظهور علائم بیماری بر روی برگ پرچم انجام شد. جهت بررسی وجود اثر هتروزیس از آنالیز پروتئوم بافت برگ پرچم در مراحل قبل و بعد از اسپورپاشی استفاده گردید. نتایج حاصل از آنالیز ژل‌ها در مرحله قبل از اسپورپاشی نشان داد که دو لکه پروتئینی دارای بیان افتراقی بین هیبرید و والدین می‌باشد، که از این بین یک مورد مربوط به افزایش بیان و مورد دیگر حضور/ عدم‌حضور می‌باشد. تعداد چهار لکه پروتئینی در مرحله بعد از اسپورپاشی شناسایی شدند که از این تعداد یک مورد مربوط به تغییر جایگاه بوده، یک مورد افزایش بیان داشته است و دو مورد به حضور/ عدم‌حضور لکه پروتئینی مربوط می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: هتروزیس، آنالیز پروتئوم، گندم، سپتوریا، هیبرید

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۱

فصل دوم: کلیات و مرور منابع ۵

۲-۱) مشخصات گندم ٦

۲-۲) بیماری سپتوریوز برگی گندم و عوامل بیماریزا ۷

۲-۲-۱) تاریخچه، مناطق انتشار و اهمیت بیماری ۷

۲-۲-۲) شرح گونه *Septoria tritici* Rob. ex Desm ۸

۲-۲-۳) ظهور علائم و پیشرفت بیماری ۹

۲-۲-٤) چرخه آلودگی بیماری سپتوریوز برگی گندم ۱۱

۲-۲-۵) شرایط محیطی مورد نیاز جهت جوانه‌زنی، نفوذ و آلودگی ۱۱

۲-۳) هتروزیس و هتروبیلتیوسیس ۱۲

۲-۳-۱) اساس ژنتیکی هتروزیس ۱۳

۲-٤) پروتئومیکس ۱٤

۲-٤-۱) جداسازی پروتئین ۱۵

۲-٤-۲) شناسایی پروتئین ۱٦

۲-٤-۳) آنالیز تصویر پروتئین ۱٦

۲-٤-٤) طیف سنجی جرمی ۱۷

۲-۵) مروری بر مطالعات گذشته ۲۰

فصل سوم: مواد و روش‌ها ۲۷

۳-۱) تهیه مواد آزمایش ۲۸

۳-۲) کاشت بذور ۲۹

۳-۳) جداسازی و تکثیر قارچ عامل بیماری لکه برگی سپتوریا ۳۰

۳-۳-۱)کشت و جداسازی قارچ ***S. tritici*** ۳۰

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۳-۲) تهیه مایه تلقیح ۳۰
۳-۳-۳) اسپور پاشی با قارچ ***S. tritici*** ۳۱
۳-٤) نحوه نمونه‌گیری ۳۲
۳-٥) بررسی پروتئوم ۳٤
۳-٥-۱) استخراج پروتئین ۳٤
۳-٥-۲) تعیین کمیت پروتئین ۳٤
۳-٥-۳) الکتروفورز دو بعدی و رنگ‌آمیزی ژل ۳٥
٥-٤) آنالیز نرم‌افزار **۳۸**
فصل چهارم: نتایج و بحث ۳٥
٤-۱) ارزیابی پروتئوم پدیده هتروزیس ٤۰
٤-۱-۱) نتایج بدست‌آمده از مرحله قبل از اسپورپاشی ٤۰
٤-۱-۲) نتایج بدست‌آمده از مرحله بعد از اسپورپاشی ٤٥
٤-۲) نتایج حاصل از طیف سنجی جرمی ٤۸
٤-۲-۱) نتایج بدست آمده از مرحله قبل از اسپورپاشی ٥۰
٤-۲-۲) نتایج بدست آمده از مرحله بعد از اسپورپاشی ٥۱
٤-۳) نتیجه‌گیری کلی ٥۲
٤-۳-۱) بررسی هتروزیس در گندم ٥۲
٤-۳-۲) بررسی هتروزیس در مقاومت به بیماری سپتوریا تریتیسی در گندم ٥۲
٤-٤) پیشنهادات ٥۳
منابع ٥٤

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱- ترکیب شیمیایی بذر گندم..... ۷
جدول ۳-۱- ژنوتیپ‌های مورد استفاده در این تحقیق ۲۸
جدول ٤-۱- بررسی پراکنش نقاط حاصل از نرم‌افزار Image master 2D platenium..... ٤۰
جدول ٤-۲- بررسی الگوی بیان افتراقی پروتئین‌ها بین هیبرید و والدین قبل از اسپورپاشی ٤٤
جدول ٤-۳- بررسی الگوی بیان افتراقی پروتئین‌ها بین هیبرید و والدین بعد از اسپورپاشی ٤٥
جدول ٤-٤-شناسایی لکه‌های پروتئینی بافت برگ پرچم از طریق طیف سنجی جرمی..... ٤۹

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۲-۱- علائم بیماری *S. tritici* روی گندم ۱۰
شکل ۲-۲- چرخه زندگی *S. tritici* در گندم ۱۱
شکل ۲-۳- چرخه آلودگی *S. tritici* ۱۲
شکل ۲-٤- فلوچارت 2D-PAGE ۲۰
شکل ۳-۱- مراحل تلاقی ۲۹
شکل ۳-۲- اسپورپاشی با قارچ *S. tritici* ۳۱
شکل ۳-۳- قرار دادن پوشش‌های پلاستیکی جهت حفظ رطوبت بعد از مایه زنی ۳۲
شکل ۳-٤- الف- مقایسه برگ پرچم قبل از اسپورپاشی ۳۳
شکل ۳-٤- ب- ظهور علائم بیماری بعد از اسپورپاشی ۳۳
شکل ۳-۵- پودر کردن نمونه با ازت مایع ۳٤
شکل ۳-٦- تعیین غلظت پروتئین با دستگاه اسپکتوفتومتر ۳۵
شکل ۳-۷- دستگاه دستگاه بعد اول (IEF) Iso Electric Focusing(GE Healthcare) ۳٦
شکل ۳-۸- دستگاه بعد دوم SDS-PAGE(GE Healthcare) ۳۷
شکل ۳-۹-دستگاه اسکنر IMAGE SCANNER GE HEALTHCARE ۳۷
شکل ٤-۱- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم رقم تجن. مرحله قبل از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا ٤۱
شکل ٤-۲- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم لاین مقاوم. مرحله قبل از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا ٤۱
شکل ٤-۳- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم رقم هیبرید. مرحله قبل از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا.. ٤۲
شکل ٤-٤- مقایسه ژل الکتروفورز رقم‌های تجن (سمت راست)، **لاین مقاوم** (سمت چپ)، هیبرید (وسط)..... ٤۲
شکل ٤-۵-نمودار پراکنش تجن و لاین مقاوم..... ٤۳
شکل ٤-٦-نمودار پراکنش تجن و هیبرید ٤۳

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ٤-٧ نمودار پراکنش نقاط تجن و لاین مقاوم ٤٥
شکل ٤-٨ نمودار پراکنش نقاط تجن و هیبرید..... ٤٥
شکل ٤-٩- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم رقم تجن. مرحله بعد از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا .. ٤٦
شکل ٤-١٠- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم رقم هیبرید. مرحله بعد از اسپورپاشی با قارچ سپتتوریا ٤٦
شکل ٤-١١- الگوی پروتئوم برگ پرچم گندم لاین مقاوم. مرحله بعد از اسپورپاشی با قارچ سپتوریا ٤٦
شکل ٤-١٢- مقایسه ژل الکتروفورز رقم‌های تجن (سمت راست)، **لاین مقاوم** (سمت چپ)، هیبرید (وسط)..... ٤٧
شکل ٤-١٣ مقایسه ژل الکتروفورز رقم‌های تجن (سمت راست)، لاین مقاوم (سمت چپ)، هیبرید (وسط)..... ٤٧

فصل اول

مقدمه

گندم غذای اصلی مردم بسیاری از کشورها می‌باشد. به طور متوسط سالیانه ۱۶-۱۵ درصد زمین‌های زیر کشت جهان به این گیاه اختصاص داده می‌شود و بیش از ۲۰ درصد کالری مورد نیاز جمعیت جهان را تأمین می‌کند (بوشاک و رسپر، ۱۹۹۴). در ایران نیز گندم به‌عنوان منبع تأمین کالری و پروتئین مورد نیاز جمعیت کشور بوده و حدود ۷۵ درصد پروتئین و ۶۱ درصد کالری دریافتی روزانه هر فرد از نان تأمین می‌شود (عبدمیشانی و بوشهری، ۱۳۷۶). بوته‌های گندم در مراحل مختلف رشد در تمام محیط‌های طبیعی در معرض تنش‌های گوناگون قرار دارند. شرایط آب و هوایی، عناصر غذایی، آفات، عوامل بیماری‌زا گیاهی و علف‌های هرز از جمله عواملی هستند که تولید گندم را تهدید می‌کنند. عوامل بیماری‌زا شامل قارچ‌ها، ویروس‌ها، باکتری‌ها، نماتدها و غیره می‌باشند که در بین آنها قارچ‌ها از اهمیت بیشتری برخوردارند. تعداد بیماری‌های گندم نامعلوم است اما بیش از ۵۰ بیماری شناخته شده است که دارای اهمیت اقتصادی هستند (وایز، ۱۹۷۷). در حال حاضر سپتوریوز برگی گندم[1] در بسیاری از مناطق دنیا شایع می‌باشد که باعث کاهش عملکرد از ۳۱ تا ۵۴ درصد می‌شود (ایال و همکاران، ۱۹۸۵). علائم بیماری ابتدا در برگ‌های پایینی و به‌صورت لکه‌های سفید و آب‌سوخته ظاهر شده، حاشیه لکه‌ها به رنگ زرد تا قرمز قهوه‌ای در آمده و در مرکز آن دانه‌های ریز سیاه‌رنگ فرورفته در بافت پدید می‌آید. بروز این لکه‌ها روی قاعده پهنک برگ‌ها باعث خشکیدگی آن می‌شود. در اثر آلودگی میزان دانه‌بندی کاهش یافته، پر شدن دانه‌ها ضعیف می‌شود و دانه‌های چروکیده هنگام برداشت همراه کاه از بین می‌روند. علت گسترش بیماری به‌طور عمده ناشی از متداول شدن ارقام نیمه کوتاه، زودرس و حساس به بیماری و جایگزینی سریع و استفاده گسترده از آن‌ها به‌جای ارقام محلی گندم می‌باشد (ایال و همکاران، ۱۹۸۵). مقاومت در گیاه باعث جلوگیری از رشد عامل بیماری و یا کند شدن سرعت رشد آن می‌شود. کنترل مقاومت به وسیله یک ژن بزرگ‌اثر در بعضی از مواد گیاهی و همچنین چندین ژن نیز شناسایی شده است. آگاهی از مبنای شیمیایی و ساختمانی مقاومت به *Septoria tritici* به‌منظور فهم اینکه چگونه گندم در اثر متقابل میزبان- پاتوژن از خود دفاع می‌نماید، مهم می‌باشد.گیاهان به منظور دفاع در مقابل آلودگی قارچی، مکانیسم‌های دفاعی گوناگونی را در پیش می‌گیرند که اولین آنها مرگ سلول یا واکنش فوق حساسیت می‌باشد، تقویت دیواره سلولی با لیگنین در مکانی که نفوذ صورت گرفته و تولید مواد ضد میکروبی مانند فیتوالکسین‌ها از مهمترین مکانیسم‌های دفاعی می‌باشد. تنوع در بیان ژن های گیاه باعث تفاوت در مقاومت گیاه نسبت به

1- Septoria tritici blotch (STB)

بیماری می‌شود. دانش ما در رابطه با اساس مولکولی هتروزیس[1] بسیار اندک و ناچیز است، لذا اطلاعات بیشتری در رابطه با مکانیسم‌های مولکولی و فرایندهای بروز این پدیده مورد نیاز است. در سال‌های اخیر توجه خاصی به روش‌هایی می‌شود که محققین را در ارزیابی کمی بیان هزاران ژن به‌طور همزمان میسر می‌سازد اما اطلاعات حاصل از ژنوم به تنهایی بیانگر عملکرد ژن در یک مرحله خاص از زندگی گیاه و وقایع بیولوژیکی و شیمیایی که در هر مرحله رخ می‌دهد، نیست. علاوه بر ژنومیکس حتی اطلاعات حاصل از ترانسکریپتوم و متابولوم هم هیچکدام به تنهایی درک درستی ایجاد نمی‌کنند (مانس، ۲۰۰۵). امروزه با گسترش تکنیک‌هایی چون ژل الکتروفورز دو بعدی امکان آنالیز الگوی بیان ژن‌ها در سطح پروتئین میسر گردیده است و در حقیقت پروتئومیکس دانشی است که امکان بررسی الگوی بیان کل ژن-های بیان شده توسط سلول یا بافت تحت شرایط محیطی ویژه را فراهم می‌کند (گیگی و همکاران، ۲۰۰۰). آنالیز الگوی بیان ژن‌ها در سطح پروتئین علاوه بر اینکه تکمیل‌کننده داده‌های حاصل از ژنومیکس[2] و ترنسکریپتومیکس[3] می‌باشد، مزیت‌های ویژه‌ای دارد زیرا پروتئین‌ها، به‌عنوان اجزا کلیدی بطور مستقیم مسئول اعمال سلولی هستند در حالیکه ژنوم دارای اطلاعات کدکننده است که برای رشد و نمو جاندار کفایت می‌کند. علاوه بر این مقدار پروتئین اغلب از روی میزان mRNA[4] تولید شده در سلول قابل پیش بینی نیست و تغییرات پس از ترجمه‌ای که در ساختار پروتئین‌ها رخ می‌دهد، برای کنش بیولوژیکی آنها ضروری می‌باشد، لذا مطالعه فعالیت پروتئین‌ها در بافت‌های خاص یا در پاسخ به شرایط محیطی از اهمیت بالقوه‌ای برخوردار است (زیوی و دوین، ۲۰۰۰). در گذشته بهره‌گیری از هتروزیس را برای تولید محصول بیشتر به طور گسترده‌ای وابسته به گیاهان دگرگشن می‌دانستند اما امروزه در گندم مدارکی مبنی بر تایید حضور اثرات هتروزیس در دسترس است (فریمن، ۱۹۱۹). افزایش تولید در هیبرید در مقایسه با والدینش به اثرات هتروتیک نسبت داده می‌شود که در F_1 و نسل‌های بعد بیان می‌شوند. هیبریدها با اثرات هتروتیک بالا فرصت‌های بهتری را برای تشخیص لاین‌های اینبرد در طی نسل‌های در حال پیشرفت، در مقایسه با هیبریدهای با هتروزیس کم فراهم می‌کنند (شریف و همکاران، ۲۰۰۱). این پدیده می‌تواند باعث بهره گیری تجاری از این گیاه شود. در صورت افزایش اطلاعات مولکولی در مورد پدیده هتروزیس و در پی آن شناسایی ژن‌های مربوط به این صفات می‌توان پدیده هتروزیس را با دیدگاه مولکولی و موثر در

1- Heterosis
2- Genomics
3- Transcriptomics
4- Messenger RNA

پروژه‌های اصلاح واریته‌های گندم با تمرکز بر اکثر صفات زراعی و فیزیولوژیک که پدیده هتروزیس را نشان می‌دهند، وارد کرد.

۱-۱) فرضیات

پروتئین‌های مربوط به صفاتی که پدیده هتروزیس را از خود نشان می‌دهند باید به صورت افتراقی در جمعیت F1 نسبت به والدین بیان شوند.

۱-۲) اهداف

تجزیه پروتئوم برگ پرچم به منظور ارزیابی پدیده هتروزیس برای مقاومت به بیماری *Septoria tritici* در گندم‌های F1 نسبت به والدین.

فصل دوم

کلیات و مرور منابع

۲-۱) مشخصات گندم

غلات مهمترین گیاهان غذایی کره زمین و تأمین کننده ۷۰ درصد غذای مردم کره زمین بوده و پایه اصلی تغذیه و بقای بشر به شمار می‌روند. گندم و برنج تقریبا ۶۰ درصد انرژی مورد نیاز بشر را تأمین می‌کنند (امام، ۱۳۸۳). گندم مهمترین گیاه زراعی روی زمین است و اجداد وحشی آن در منطقه خاورمیانه، غرب ایران، شرق ترکیه، شمال عراق پیدا شده و هم اکنون نیز در این مناطق وجود دارد، منشاء گندم را منطقه هلال حاصلخیز می‌دانند (امام، ۱۳۸۳). بر اساس آمار سازمان FAO[1] تولید جهانی گندم در سال ۲۰۱۳ معادل ۶۹۰ میلیون تن بوده است. بر طبق این آمار، عمده‌ترین تولیدکنندگان گندم در سال ۲۰۱۳ را اروپا، چین، هند و ایالات متحده آمریکا و همچنین بیشترین صادرکننده و واردکننده گندم را به ترتیب ایالات متحده و مصر تشکیل داده‌اند (فائو،۲۰۱۳). گندم به خانواده گندمیان (پوآسه[2])، طایفه هوردیه[3] و جنس تریتیکوم[4] تعلق دارد. گونه‌های اهلی و وحشی آن از لحاظ تعداد کروموزوم به سه گروه دیپلوئید، تتراپلوئید و هگزاپلوئید تقسیم می‌شود. گندم گیاهی است تک‌لپه، خودگشن، یکساله و معمولا روز بلند، از خانواده گندمیان که دارای گونه‌های بسیار زیاد اهلی و وحشی است. دمای بهینه رشد گندم در حدود ۲۵ درجه سانتیگراد می‌باشد. گندم گیاهی سازگار است و در محدوده وسیعی از شرایط مرطوب از مناطق گرم و خشک تا مدیترانه‌ای و محیط‌هایی با میزان بارندگی ۱۷۵۰-۲۵۰ میلی‌متر رشد می‌کند. گندم خاک‌های دارای pH در محدوده ۷/۵-۶ را که در آن عناصری مانند نیتروژن، فسفر و پتاسیم زیاد است را ترجیح می‌دهد (کلانتری، ۱۳۷۳). بهترین آب برای آبیاری گندم آبی است که EC آن کمتر یا مساوی ۰/۲۵ دسی زیمنس بر متر املاح باشد. از لحاظ کارایی استفاده از آب، گندم یکی از پربازده‌ترین گیاهـــــان زراعی سه کربنه می‌باشد. عمق مناسب کاشت بذر گندم ۷-۳ سانتیمتر می‌باشد. در کاشت دیم و در مناطق خشک و در خاک‌های با بافت سبک‌تر کشت عمیق‌تر توصیه می‌شود (امام، ۱۳۸۳). کمترین رطوبت مورد نیاز برای آغاز جوانه‌زنی معادل ۴۰-۳۰ درصد وزن خشک بذر است. گندم مهمترین منبع کربوهیدرات در اکثر کشورها می‌باشد. ترکیب شیمیایی بذر گندم در جدول (۲-۱) آورده شده است:

1 -The United Nations Food and Agriculture Organization
2-Poaceae
3-Hordeae
4-Triticum

جدول ۲-۱ ترکیب شیمیایی بذر گندم.

نشاسته	٪ ٦٤-٦٨	چربی	٪ ۱/۵-۲
پروتئین	٪ ۷-۱۸	سلولز	٪ ۲-۲/۵
مواد معدنی	٪ ۱/۵-۲	رطوبت	٪ ۷-۱۸

گندم معمولی یا گندم نان با نام علمی *Triticum aestivum* ، جزء گندم‌های هگزاپلوئید بوده و دارای گسترش و پراکندگی زیادی در جهان می‌باشد و غالب‌ترین گونه به حساب می‌آید. این گونه دارای چندین هزار رقم زراعی است که در مناطق مختلف دنیا و تحت شرایط اقلیمی متفاوت کشت می‌شود (خدابنده، ۱۳۶۹).

۲-۲) بیماری سپتوریوز برگی گندم و عوامل بیماری‌زا

بیش از ۲۰۰۰ شبه گونه از جنس‌های *Septoria* و *Stagonospora* به‌عنوان پارازیت گیاهی شناخته شده‌اند که دو شبه‌گونه از آنها به‌عنوان عوامل بیماری‌زا در گندم از بقیه مهم‌تر هستند، یکی سپتوریوز برگی گندم (STB) با عامل *Septoria tritici* و دیگری سپتوریوز سنبله گندم[1] (SNB) با عامل *Septoria nodurum* که اولی فقط به برگ حمله می‌کند اما دومی هم برگ و هم گلوم‌های سنبله را آلوده می‌کند (شارن، ۱۹۹۹). فرم جنسی این قارچ‌ها به‌ترتیب در جنس‌های *Mycosphaerella* و *Phaeosphaeria* قرار دارد. بیماری سپتوریوز برگی گندم، تحت عناوین *leaf spot blotch*، *nebular leaf spotch*، *speckled leaf blotch* و *S.tritici blotch* در مقالات مختلف نامگذاری شده است و خسارت ناشی از آن در اکثر کشورهای دنیا روی گندم گزارش شده است (کینگ و همکاران، ۱۹۸۳).

[1]-*Septoria nodurum blotch* (SNB)

۲-۲-۱) تاریخچه، مناطق انتشار و اهمیت بیماری

در طول ۳۰ سال گذشته مطالعات فراوانی بر روی شناسایی و تاکسونومی قارچ‌های عامل بیماری‌های سپتوریایی در غلات دانه‌ریز انجام گرفته است (کانفر و یونج، ۱۹۹۹). خسارت ناشی از هر دو جنس سپتوریا در گندم ۳۱ درصد (بابادوست و هبرت، ۱۹۸۴) تا ۵۳ درصد (ایال، ۱۹۸۱) گزارش شده است. کاهش سالانه محصول گندم ناشی از خسارت مجموعه سپتوریوز بین یک تا هفت درصد تخمین زده شده است (ایال و لویی، ۱۹۸۷). در اولین تحقیقات صورت گرفته، تمام بیمارگرهای مذکور در شبه‌گونه‌های *Septoria* قرار گرفتند. اولین گزارش از خسارت جدی بیماری در دهه ۱۸۹۰ از ایتالیا بوده است همچنین گزارش‌هایی مبنی بر آلودگی محصولات زراعی توسط شبه‌گونه‌های *Septoria* در اروپا، آمریکای شمالی و جنوبی، آفریقا، آسیا، استرالیا و نیوزیلند ارائه شده است (شیپون و همکاران، ۱۹۷۱). در ایران پتراک و اسفندیاری در سال ۱۳۲۰ این بیماری را با عامل *Septoria graminis* گزارش نمودند (ترابی، ۱۳۵۹). به دلیل مساعد بودن شرایط محیطی و حساسیت شدید ارقام تجاری، در حال حاضر در تعداد زیادی از استان‌ها از جمله اردبیل، فارس، ایلام و کرمانشاه هر ساله با وقوع اپیدمی خسارات زیادی به محصول وارد می‌آید (عظیمی، ۱۳۷۶). از سال ۱۳۴۴ به بعد با کشت ارقام مکزیکی در ایران گسترش بیماری افزایش یافت به‌طوری‌که این بیماری روی گندم‌های مکزیکی مکزی‌پک و توباری مقاوم به زنگ، و ارقام اصلاح شده داخلی مانند امید، روشن، شعله، خزر، اروند (ترابی، ۱۳۵۹)، فلات، اترک و داراب ۲ با شدت نسبتا زیادی مشاهده گردید. ارشاد (۱۳۷۴) در لیست قارچ‌های ایران، ۷۴ گونه *Septoria* را نام برد و فاتحی و همکاران (۱۳۷۲)، پنج گونه جدید دیگر را معرفی کردند. ترابی (۱۳۵۹) با نمونه‌گیری از مزارع گندم استان‌های خوزستان، گلستان، مازندران، آذربایجان شرقی، کرمانشاه، خراسان، فارس، کرمان و بررسی آنها عامل بیماری را *S. tritici* Rob.ex Desm معرفی کرد. به‌طور عمده متداول شدن و جایگزینی سریع ارقام زودرس، نیمه پا کوتاه و پر محصول حساس به بیماری، به جای ارقام محلی باعث افزایش شدت بیماری و اهمیت اقتصادی آن شده است (ایال، ۱۹۸۱؛ کینگ و همکاران، ۱۹۸۳). افزایش اهمیت بیماری و کاهش محصول در رابطه با بیماری از زمانی شروع شد که ارقام مکزیکی با خواص زراعی خوب نظیر عملکرد زیاد، قدرت سازش با محیط‌های مختلف و مقاوم در برابر زنگ‌ها در سطح وسیعی از کشورهای دنیا مورد استفاده قرار گرفتند و به دنبال آن بیماری‌های دیگری، که این ارقام نسبت به آنها حساس بودند مانند سپتوریوز گندم در مزارع ظاهر شدند و با آلودگی‌هایی که روی گندم به وجود می‌آوردند در بعضی از کشورها به‌صورت مسئله مهم و قابل توجهی درآمدند (ترابی، ۱۳۵۹؛ ایال، ۱۹۸۱). شیوع جدی بیماری

سپتوریوز بیشتر در نواحی پرباران در آمریکای جنوبی و با بارندگی پراکنده در سواحل دریای مدیترانه می‌باشد. به‌طورکلی شدت بیماری در نواحی که میانگین بارندگی سالانه آن‌ها بیشتر از ۳۰۰ میلی‌متر باشد، اتفاق می‌افتد (ایال، ۱۹۸۱).

۲-۲-۲) شرح گونه *Septoria tritici* Rob. ex Desm

Septoria tritici برای اولین بار توسط روبرگ توصیف شد و دزمایر اولین فردی بود که در سال ۱۸۴۳ آن را از روی گندم در فرانسه جدا و گزارش کرد (به نقل از شیپتون و همکاران، ۱۹۷۱؛ کانفر و یونج، ۱۹۹۹). اسپراگ به علت تفاوت در اندازه کنیدیوم‌ها و تعداد دیواره عرضی *S.tritici* را از گونه *S. graminis* جدا دانست (به نقل از حقدل، ۱۳۸۰). *S. tritici* دارای پیکنیدیوسپورهای نخی شکل با طول ۷۵-۴۰ میکرومتر و ۷-۳ دیواره عرضی می‌باشد (کانفر و یونج، ۱۹۹۹).

S. tritici جزء قارچ‌های پیکنیدیوم‌دار می‌باشد. پیکنیدیوم‌ها در بافت‌های مزوفیلی و اپیدرمی در هر دو سطح برگ نفوذ می‌کنند و در قسمت خروجی دارای منفذی به نام دهانه می‌باشد. پیکنیدیوم‌های *S. tritici* بیشتر در محل روزنه‌ها تشکیل می‌شوند. شکل آن‌ها کروی تا بیضوی است و رنگ آن‌ها از قهوه‌ای روشن تا کاملا سیاه متغیر می‌باشد. پیکنیدیوسپورها به دو فرم ماکرو و میکرو می‌باشند و هر دو به یک اندازه توانایی آلودگی گندم را دارند (شیپتون و همکاران، ۱۹۷۱).

۲-۲-۳) ظهور علائم و پیشرفت بیماری

علائم بیماری و چرخه زندگی بیماری *S. tritici* به ترتیب در اشکال (۲-۱ و ۲-۲) نشان داده شده است. قارچ عامل بیماری به صورت میسلیوم، پیکنید یا سودوتسیوم روی گندم‌های خودرو و بقایای گیاهی آلوده باقی می‌ماند. اسپورهای غیر جنسی (پیکنیدیوسپورها) و اسپورهای جنسی (آسکوسپورها) به‌وسیله قطرات باران انتشار می‌یابند. انتشار قارچ عامل بیماری در شرایط مرطوب همراه با وزش باد بهتر صورت می‌گیرد. در شرایط مرطوب، قارچ به سرعت از برگ‌های پایینی به برگ‌های بالایی انتشار می‌یابد در حالی که در شرایط خشک نه تنها از آلودگی جلوگیری می‌گردد، بلکه توسعه لکه‌ها و تولید پیکنید نیز متوقف می‌شود. زمان ظهور اولین علائم به میزان زیادی بستگی به رقم و شرایط محیطی در طی آلودگی دارد. اولین علائم آلودگی روی برگ‌های اولیه گندم که در نزدیکی سطح خاک ویا در تماس با آن هستند و معمولا به صورت لکه‌های کلروزه نامنظم می‌باشند ظاهر می‌شوند. ۶-۳ روز بعد مناطق نکروزه به