دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته کشاورزی گرایش بیماری‌شناسی گیاهی

کنترل بیولوژیکی نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* به وسیله‌ی قارچ *Paecilomyces* sp. در گوجه فرنگی

استادان راهنما

دکتر مجید اولیاء

دکتر بهرام شریف نبی

استاد مشاور

دکتر علی اکبر فدایی تهرانی

پژوهشگر

فرید ثابت

مهرماه ۱۳۹۰

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته کشاورزی گرایش بیماری‌شناسی گیاهی

کنترل بیولوژیکی نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* به وسیله‌ی قارچ *Paecilomyces* sp. در گوجه فرنگی

استادان راهنما

دکتر مجید اولیا

دکتر بهرام شریف نبی

استاد مشاور

دکتر علی اکبر فدایی تهرانی

پژوهشگر

فرید ثابت

مهرماه ۱۳۹۰

دانشکده کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

پایان نامه آقای فرید ثابت جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته کشاورزی گرایش بیماری شناسی گیاهی با عنوان: " کنترل بیولوژیکی نماتد ریشه گرهی *Meloidogyne javanica* به وسیله قارچ *Paecilomyces* sp. در گوجه فرنگی " در تاریخ ۱۳۹۰/۷/۲۷ با حضور هیأت داوران زیر بررسی و با نمره ۱۹/۳۰ مورد تصویب نهایی قرار گرفت.

۱. استادان راهنمای پایان نامه

دکتر مجید اولیاء با مرتبه علمی استادیار **امضاء**

دکتر بهرام شریف نبی با مرتبه علمی استاد **امضاء**

۲. استاد مشاور پایان نامه

دکتر علی اکبر فدایی تهرانی با مرتبه علمی استادیار **امضاء**

۳. استادان داور پایان نامه

دکتر علی تدین با مرتبه علمی استادیار **امضاء**

دکتر عبدالرحمان محمدخانی با مرتبه علمی استادیار **امضاء**

دکتر سیدحسن طباطبایی

معاون پژوهشی و تحصیلات تکمیلی دانشکده کشاورزی

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه شهرکرد است.

تشکر و قدردانی

یارب زره راست نشانی خواهم　　از باده آب و خاک جامی خواهم

از نعمت خود چو بهره‌مندم کردی　　در شکر گذاریت زبانی خواهم

تشکر و سپاس پروردگاری که بالاترین مقام را در ستایش سزاست، او که می داند بدون این که آموخته باشد او که یاریم کرد تا گامی دیگر در مسیر بی انتهای آموختن بردارم.

در برابر پشتوانه و تکیه زندگی، پدر بزرگوارم، مادر دلسوز و فداکارم که دلگرمی من در تمام ناملایمات زندگی هستند، سر تعظیم فرود می آورم و از آنها که عمرشان را توشه راهم کردند، سپاسگزارم.

اکنون که به لطف و عنایت بی بدیل حضرت حق، موفق به اتمام این تحقیق شدم، بر خود فرض می دانم، مراتب تشکر و قدردانی خود را از اساتید بزرگوار و ارجمندم جناب آقای دکتر اولیاء، جناب آقای دکتر شریف نبی و جناب آقای دکتر فدایی که در طول اجرای این پروژه همواره مرا از راهنمایی و مشاوره خویشان بی نصیب نگذاشتند و افتخار شاگردیشان را به اینجانب عطا فرمودند، نهایت تشکر و قدردانی را دارم. آقایان دکتر تدین و دکتر محمدخانی که زحمت باز خوانی و داوری این پایان نامه را پذیرفتند کمال تشکر و قدردانی می نمایم. از کارشناش آزمایشگاه گروه بیماری شناسی دانشگاه شهرکرد، مهندس کبیری و مجموعه کارشناسان آزمایشگاه های گروه گیاهپزشکی دانشگاه صنعتی اصفهان که در طول اجرای پروژه مساعدت لازم را داشتند، تشکر می نمایم. از همکلاسی های بزرگوارم خانم ها مهندس هادی، سهرابی، هاشمی، عسکریان، سیروس، ابن علی که افتخار یادگیری علم و دانش در کنار ایشان را داشته‌ام بسیار سپاسگزارم.

فرید ثابت

دانشگاه شهرکرد

1390

تقدیم به پدر و مادر بزرگوارم، برادر عزیزم و همراه همیشگیم، خانم مهندس هادی

آنان که رسیدن به افق‌های روشن را در دلم شکوفا ساختند

تقدیم به آنان که دوستشان دارم و همیشه با یادشان

دوست داشتن را می‌آموزم.

چکیده

نقش قارچ‌ها در کنترل نماتدهای انگل گیاهی به طور وسیع مورد مطالعه قرار گرفته است. در این پژوهش، اثر آنتاگونیستی قارچ های *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* روی نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای مورد بررسی واقع شد. با استفاده از نقوش کوتیکولی انتهای بدن ماده، مشخصات جوان سن دوم (J_2) و استفاده از آغازگرهای اختصاصی، نماتد مورد شناسایی قرار گرفت. جدایه‌های قارچی هم با استفاده از مشخصات م رفولوژیک و آغازگرهای اختصاصی شناسایی شدند . در مطالعات آزمایشگاهی توانایی ریشه‌های جدایه های مختلف قارچی در آلوده کردن توده های تخم نماتد ریشه گرهی و اثر عصاره کشت تیمارهای قارچی روی مرگ و میر جوان سن دوم (J_2) و جلوگیری از تفریخ تخم ها مورد بررسی واقع شد. به این صو رت که، توده‌های تخم در حاشیه پرگنه قارچ در حال رشد روی محیط کشت آب-آگار قرار داده‌شد و درصد انگلی شدن تخم‌ها تعیین گردید. جهت مقایسه خاصیت نماتدکشی و جلوگیری از تفریخ تخم ها از محیط کشت مایع عصاره سیب زمینی-دکستروز استفاده و در صد مرگ و میر جوان سن دوم (J_2) و تعداد تخم تفریخ شده در غلظت های استاندارد (S)، 10^{-1} و 10^{-2} عصاره کشت قارچ در زمان های مورد نظر تعیین شد . آزمایش به صورت فاکتوریل با طرح پایه کاملا تصادفی اجرا شد. در شرایط گلخانه‌ای اثر *P. lilacinus* و *I. farinosa* روی فاکتورهای رشدی گیاه گوجه‌فرنگی و جمعیت نماتد مورد آزمون قرار گرفت، جهت این ارزیابی از مایه تلقیح قارچ رشد یافته روی دانه گندم و مخلوط شده با خاک سترون گلدان استفاده گردید. آزمایش به صورت طرح کاملا تصادفی اجرا شد و مقایسه میانگین های شاخص‌های رشدی و آلودگی گیاه گوجه فرنگی براسا س آزمون LSD صورت گرفت. نتایج مطالعات آزمایشگاهی نشان داد، اثر جدایه‌های مختلف قارچ روی مرگ و میر جوان سن دوم (J_2) و جلوگیری از تفریخ تخم‌های نماتد متفاوت بوده و جدایه ۳ قارچ *P. lilacinus* موثرتر تشخیص داده‌شد. براساس نتایج آزمایشات گلخانه‌ای هم مشخص شد، جدایه ۳ قارچ *P. lilacinus* کمترین آلودگی و بیشترین افزایش شاخص های رشدی گیاه گوجه فرنگی آلوده به نماتد را نشان می ده‌د، جدایه‌های ۱ و۴ هم تا حدی آلودگی ناشی از نماتد را کاهش دادند . جدایه های ۳ ، ۱ و ۴ از قارچ *P. lilacinus* به ترتیب ۶۵، ۴۳ و ۴۱ درصد جمعیت نماتد را کاهش دادند، که نشان از توانایی آن ها در کنترل موفق نماتد ریشه‌گرهی دارد.

واژگان کلیدی: کنترل بیولوژیکی، عصاره‌کشت قارچ، قارچ‌های آنتاگونیست، آغازگرهای اختصاصی

فهرست مطالب

عنوان	شماره صفحه
فصل اول- مقدمه	۷
فصل دوم- پیشینه تحقیق و بررسی منابع	۹
۲-۱- نماتدهای ریشه‌گرهی	۹
۲-۱-۱- اهمیت نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne* spp.	۹
۲-۱-۲- تاریخچه نماتد ریشه‌گرهی	۱۰
۲-۱-۳- نماتد ریشه‌گرهی در ایران	۱۰
۲-۱-۴- شرح جنس نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.)	10
۲-۱-۴-۱- مشخصات جوان سن دوم (J_2)	10
۲-۱-۴-۲- مشخصات نماتد ماده	۱۱
۲-۱-۴-۳- مشخصات نماتد نر	۱۱
۲-۱-۵- بیواکولوژی نماتد ریشه‌گرهی	۱۲
۲-۱-۶- علائم وخسارت نماتد مولد گره ریشه	۱۲
۲-۲- کنترل بیولوژیکی	۱۳
۲-۲-۱- تاریخچه کنترل بیولوژیک	۱۳
۲-۲-۲- تعریف کنترل بیولوژیک	۱۳
۲-۲-۳- کنترل زیستی نماتدها	۱۳
۲-۲-۴- اهمیت و ضرورت توسعه کنترل بیولوژیکی نماتدها	۱۴
۲-۲-۵- مثال‌هایی از کنترل بیولوژیک نماتدها از گذشته تاکنون	۱۴
۲-۳- قارچ *Paecilomyces* sp.	۱۵
۲-۳-۱- آشنایی مختصری با قارچ *Paecilomyces* sp.	۱۵
۲-۳-۲- معرفی گونه معروف *P. lilacinus*	۱۶
۲-۳-۳- معرفی قارچ *Isaria farinosa*	17
۲-۳-۴- کنترل نماتدهای پارازیت گیاهی با قارچ *P. lilacinus*	17
۲-۳-۵- نحوه آلودکنندگی تخم‌های نماتد ریشه‌گرهی به وسیله *Paecilomyces lilacinus*	17
۲-۴- مختصری از تحقیقات بیوکنترلی نماتد ریشه‌گرهی به وسیله *Paecilomyces* sp.	۱۸
۲-۵- تحقیقات انجام شده در رابطه با قارچ *Paecilomyces* sp. در ایران	۱۹
فصل سوم- مواد و روش اجرا	۲۰
۳-۱- نمونه برداری از گلخانه‌های آلوده گوجه‌فرنگی	۲۰
۳-۲- کشت و تکثیر نماتد *Meloidogyne javanica* روی ریشه گوجه‌فرنگی	۲۰
۳-۳- شناسایی مرفولوژیک و مولکولی نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica*	۲۱
۳-۳-۱- تهیه برش انتهایی بدن ماده‌ها جهت شناسایی مرفولوژیکی	۲۱
۳-۳-۲- شناسایی مولکولی نماتد	۲۱

عنوان	شماره صفحه
۳-۳-۲-۱- استخراج DNA از توده‌های تخم	۲۱
۳-۳-۲-۲- بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده	۲۲
۳-۳-۲-۳- مواد لازم جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز	۲۲
۳-۳-۲-۴- تهیه شرایط واکنش PCR	23
۳-۳-۲-۵- الکتروفورز محصول PCR	۲۴
۳-۴- جداسازی نماتدها	۲۴
۳-۴-۱- جداسازی نماتدها از خاک	۲۴
۳-۴-۲- جداسازی تخم‌ها از ریشه‌های آلوده	۲۵
۳-۴-۳- جداسازی تخم‌ها از توده‌های تخم	۲۵
۳-۴-۴- شمارش تخم و جوان سن دوم (J_2)	۲۵
۳-۵- جداسازی و شناسایی قارچ *Paecilomyces* sp	۲۶
۳-۵-۱- نمونه برداری از فراریشه گیاهان جهت جداسازی قارچ *Paecilomyces* sp	2۶
۳-۵-۲- جداسازی قارچ از خاک	۲۶
۳-۵-۳- خالص سازی قارچ	۲۶
۳-۵-۴- شناسایی مرفولوژیک قارچ *Paecilomyces* sp	۲۶
۳-۵-۵- شناسایی مولکولی قارچ *Paecilomyces* sp	27
۳-۵-۵-۱- تولید انبوه میسلیوم‌های قارچ جهت استخراج DNA	27
۳-۵-۵-۲- استخراج DNA میسلیوم‌های قارچ	۲۷
۳-۵-۵-۳- تنظیم شرایط واکنش PCR	۲۷
۳-۵-۵-۴- الکتروفورز فرآورده های PCR	۲۹
۳-۶- مطالعات آزمایشگاهی اثر چهار جدایه قارچ *P. lilacinus* و یک جدایه قارچ *I. farinosa* روی نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica*	۲۹
۳-۶-۱- بررسی اثر نماتد کشی عصاره کشت قارچ ها روی جوان سن دوم (J_2)	۲۹
۳-۶-۲- بررسی اثر عصاره کشت قارچ ها روی تفریخ تخم نماتد	۲۹
۳-۶-۳- تعیین درصد پارازیته کردن توده‌های تخم به وسیله میسلیوم‌های قارچ‌ها	۲۹
۳-۷- آزمایش گلخانه‌ای	۳۰
۳-۷-۱- تکثیر قارچ بر روی بذر گندم	۳۰
۳-۷-۲- تهیه خاک سترون	۳۰
۳-۷-۳- تهیه نشا گوجه‌فرنگی	۳۰
۳-۷-۴- تلقیح نشاهای گوجه فرنگی با مایه‌های قارچی	۳۰
۳-۷-۵- مایه زنی نشاهای گوجه‌فرنگی با نماتد در خاک آلوده به قارچ	۳۰
۳-۷-۶- ارزیابی اثر جدایه‌های قارچ روی نماتد ریشه‌گرهی	۳۱
۳-۸- نقشه طرح‌های گلخانه‌ای انجام شده	۳۲
۳-۹- آنالیز آماری	۳۲
فصل چهارم- نتایج و بحث	۳۳
۴- ۱- شناسایی مورفولوژیک و مولکولی نماتد	۳۳

عنوان **شماره صفحه**

۴-۱-۱- مشخصات نماتد ماده ۳۳
۴-۱-۲- مشخصات جوان سن دوم (J_2) ۳۳
۴-۱- ۳- شناسایی مولکولی نماتد ریشه‌گرهی در سطح گونه ۳۵
۴-۱-۳-۱- بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده از نماتد ۳۵
۴-۱-۳- ۲- الکتروفورز محصول PCR ۳۶
۴-۲- شناسایی قارچ *Paecilomyce* sp ۳۷
۴-۲-۱- شناسایی مرفولوژیک قارچ ۳۷
۴-۲-۲- شناسایی مولکولی قارچ ۳۸
۴-۳- نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی ۳۹
۴-۳-۱- اثر ریسه‌های قارچ روی تخم‌های *M. javanica* ۳۹
۴-۳-۱-۱- اثر ریسه‌های قارچی روی توده‌های تخم ۳۹
۴-۳-۱-۲- اثر ریسه‌های قارچی روی تخم‌های داخل توده‌های تخم ۳۹
۴-۳-۲- اثر عصاره کشت چهار جدایه قارچ *P. lilacinus* و یک جدایه قارچ *I. farinosa* روی مرگ‌ومیر جوان سن دوم (J_2) نماتد *M. javanica* ۴۰
۴-۳-۲-۱ اثر عصاره کشت جدایه‌های مختلف قارچ‌ها روی مرگ‌ومیر جوان سن دوم (J_2) نماتد *M. javanica* با در نظر گرفتن زمان به عنوان یک فاکتور ۴۰
۴-۳-۲-۲- اثر عصاره کشت قارچ‌ها روی مرگ‌ومیر جوان سن دوم (J_2) نماتد *M. javanica* به تفکیک زمان ۴۳
۴-۳-۳- اثر عصاره کشت چهار جدایه قارچ *P. lilacinus* و یک جدایه قارچ *I. farinosa* روی توده‌های تخم نماتد *M. javanica* ۴۸
۴-۳-۳-۱- اثر عصاره کشت جدایه‌های مختلف قارچ‌ها روی تفریخ تخم‌های داخل توده‌های تخم با در نظر گرفتن زمان به عنوان یک فاکتور ۴۸
۴-۳-۳-۲- اثر عصاره کشت جدایه‌های مختلف قارچ‌ها روی تفریخ تخم‌های داخل توده‌های تخم به تفکیک زمان ۵۱
۴-۴- نتایج آزمایش گلخانه‌ای ۵۶
۴-۴-۱- اثر جدایه‌های مختلف قارچ *P. lilacinus* و یک جدایه قارچ *I. farinosa* روی رشدگیاه گوجه فرنگی ۵۶
۴-۴-۲- اثر جدایه‌های مختلف قارچ *P.lilacinus* و یک جدایه قارچ *I. farinosa* روی رشد گیاه گوجه فرنگی در خاک آلوده به نماتد *M. javanica* ۵۶
۴-۴-۳- اثر جدایه‌های گوناگون قارچ *P.lilacinus* و یک جدایه قارچ *I. farinosa* در کاهش آلودگی گیاه گوجه فرنگی آلوده به نماتد *M. javanica* ۵۸
۴-۴-۴- اثر جدایه‌های مختلف قارچ *P.lilacinus* و یک جدایه قارچ *I. farinosa* روی شاخص‌های جمعیت نماتد *M. javanica* ۶۰
۴-۵- نتیجه گیری و پیشنهادات ۶۳
منابع ۶۴

فهرست جداول

عنوان **شماره صفحه**

جدول ۳-۱- مشخصات و توالی یک جفت آغازگر اختصاصی نماتد *Meloidogyne javanica* ۲۲

جدول ۳-۲- اجزاء واکنش PCR ۲۳

جدول ۳-۳- برنامه دمایی PCR جفت آغازگرهای اختصاصی OPAFjav وOPARjav ۲۴

جدول ۳-۴- مشخصات و توالی یک جفت آغازگر اختصاصی قارچ *Paecilomyces lilacinus* ۲۸

جدول ۳-۵- مخلوط واکنش PCR ۲۸

جدول ۳-۶- برنامه دمایی PCR جفت آغازگرهای اختصاصی PaeF و PeaR ۲۸

جدول ۳-۷- سیستم درجه بندی شاخص گال بر اساس روش جوناتان (۲۰۰۰) ۳۱

جدول ۴- ۱- تجزیه واریانس درصد انگلی شدن تخم‌های محصور در توده‌های تخم توسط جدایه‌های مختلف *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* ۴۰

جدول ۴- ۲- مقایسه میانگین درصد انگلی شدن تخم‌های محصور در توده‌های تخم توسط جدایه‌های مختلف *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* ۴۰

جدول ۴-۳- جدول تجزیه واریانس درصد مرگ‌ومیر جوان‌های سن دوم *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف عصاره کشت جدایه‌های مختلف قارچ با در نظر گرفتن زمان به عنوان یک فاکتور ۴۲

جدول ۴-۴- مقایسه میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم(J_2) *Meloidogyne javanica* در عصاره‌کشت جدایه‌های مختلف قارچ *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* با در نظر گرفتن زمان به عنوان یک فاکتور ۴۳

جدول ۴-۵- مقایسه میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم (J_2) *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف تیمارهای قارچی با در نظر گرفتن زمان به عنوان یک فاکتور ۴۳

جدول ۴-۶- مقایسه میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم *Meloidogyne javanica* در زمان‌های مختلف ۴۳

جدول ۴-۷- تجزیه واریانس درصد مرگ‌ومیر جوان‌های سن دوم (J_2)*Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف عصاره کشت جدایه‌های مختلف قارچ به تفکیک زمان ۴۵

جدول ۴-۸- مقایسه میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم (J_2) *Meloidogyne javanica* در عصاره‌کشت جدایه‌های مختلف *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* بعد از گذشت ۲۴ ساعت ۴۶

جدول ۴-۹- مقایسه میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم (J_2) *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف قارچ بعد از گذشت ۲۴ ساعت ۴۹

جدول۴-۱۰- مقایسه میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم (J_2) *Meloidogyne javanica* در عصاره‌کشت جدایه‌های مختلف *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* بعد از گذشت ۴۸ ساعت ۴۸

جدول ۴-۱۱- مقایسه میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم (J_2) *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف قارچ بعد از گذشت ۴۸ ساعت ۴۸

جدول۴-۱۲- مقایسه میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم (J_2) *Meloidogyne javanica* در عصاره‌کشت جدایه‌های مختلف *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* بعد از گذشت ۷۲ ساعت ۴۸

جدول۴-۱۳- مقایسه میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم (J_2) *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف قارچ بعد از گذشت ۷۲ ساعت ۴۸

عنوان **شماره صفحه**

جدول ۴-۱۴- جدول تجزیه واریانس تعداد تخم تفریخ شده *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف عصاره کشت جدایه های متفاوت قارچ با در نظر گرفتن زمان به عنوان یک فاکتور ۴۹

جدول ۴-۱۵- مقایسه میانگین تعداد تخم تفریخ شده *Meloidogyne javanica* در عصاره‌کشت جدایه‌های مختلف *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* ۴۹

جدول ۴-۱۶- مقایسه میانگین تعداد تخم تفریخ شده *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف عصاره کشت قارچ‌ها ۵۰

جدول ۴-۱۷- مقایسه میانگین تعداد تخم تفریخ شده *Meloidogyne javanica* در زمان‌های مختلف ۵۰

جدول ۴-۱۸- تجزیه واریانس تعداد تخم تفریخ شده نماتد *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف عصاره کشت جدایه‌های مختلف قارچ به‌تفکیک زمان ۵۲

جدول ۴-۱۹- مقایسه میانگین تعداد تخم تفریخ شده نماتد *Meloidogyne javanica* در عصاره‌کشت جدایه‌های مختلف *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* بعد از گذشت ۲ روز ۵۲

جدول ۴-۲۰- مقایسه میانگین تعداد تخم تفریخ شده نماتد *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف عصاره کشت قارچ‌ها بعد از گذشت ۲ روز ۵۳

جدول ۴-۲۱- مقایسه میانگین تعداد تخم تفریخ شده نماتد *Meloidogyne javanica* در عصاره‌کشت جدایه‌های مختلف *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* بعد از گذشت۴ روز ۵۳

جدول ۴-۲۲- مقایسه میانگین تعداد تخم تفریخ شده نماتد *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف عصاره کشت قارچ‌ها بعد از گذشت ۴روز ۵۴

جدول ۴-۲۳- مقایسه میانگین تعداد تخم تفریخ شده نماتد *Meloidogyne javanica* در عصاره‌کشت جدایه‌های مختلف *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* بعد از گذشت ۶ روز ۵۴

جدول ۴-۲۴- مقایسه میانگین تعداد تخم تفریخ شده نماتد *Meloidogyne javanica* در غلظت‌های مختلف عصاره کشت قارچ‌ها بعد از گذشت ۶ روز ۵۵

جدول ۴-۲۵- تجزیه واریانس اثر جدایه‌های مختلف تیمارهای قارچی روی شاخص‌های رشدی گیاه گوجه فرنگی ۵۶

جدول ۴-۲۶- تجزیه واریانس اثر جدایه‌های مختلف قارچ‌ها و نماتد ریشه‌گرهی روی شاخص‌های رشدی گیاه گوجه فرنگی ۵۷

جدول ۴-۲۷- اثر جدایه های قارچ *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* روی رشد گیاه گوجه فرنگی در خاک آلوده به نماتد *Meloidogyne javanica* ۵۸

جدول ۴-۲۸- تجزیه واریانس اثر جدایه‌های مختلف قارچ روی شاخص‌های آلودگی نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* ۵۹

جدول ۴-۲۹- مقایسه میانگین شاخص‌های آلودگی نماتد *Meloidogyne javanica* تحت تاثیر جدایه‌های *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* ۵۹

جدول ۴-۳۰- تجزیه واریانس اثر جدایه‌های مختلف قارچ روی شاخص‌های جمعیتی نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne javanica* ۶۰

جدول ۴-۳۱- مقایسه میانگین شاخص‌های جمعیتی *Meloidogyne javanica* تحت تاثیر قارچ‌های جدایه‌های *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* ۶۱

فهرست اشکال

عنوان **شماره صفحه**

شکل ۴-۱- ترسیم قسمت سر جوان سن دوم (J_2) نماتد *Meloidogyne javanica* ۳۴

شکل ۴-۲- ترسیم قسمت انتهایی دم جوان سن دوم نماتد(J_2) *Meloidogyne javanica* ۳۴

شکل۴-۳- ترسیم برش انتهایی بدن نماتد ماده *Meloidogyne javanica* ۳۴

شکل ۴-۴- الکتروفورز DNA استخراج شده ۳۵

شکل۴-۵- تکثیر قطعه ۶۷۰ جفت بازی به وسیله واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی OPAFjav و OPARjav. ۳۶

شکل ۴-۶- الف) پرگنه درحال رشد قارچ *farinosa Isaria farinosa* ب) نمای پرگنه قارچ از پشت پتری ج) کنیدی و کنیدیوفور ۳۷

شکل ۴-۷- الف)پرگنه درحال رشد قارچ *Paecilomyces lilacinus* ب) نمای پرگنه قارچ از پشت پتری ج) کنیدی و کنیدیوفور ۳۷

شکل ۴-۸- الکتروفورز DNA استخراج شده از جدایه‌های قارچ *Paecilomyces lilacinus* ۳۸

شکل ۴-۹- تکثیر قطعه ۱۳۰ جفت بازی با استفاده از جفت آغازگر اختصاصی PaeF و PaeR ۳۸

شکل ۴-۱۰- اثر متقابل غلظت و قارچ روی میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم(J_2) *Meloidogyne javanica* با در نظر گرفتن زمان به عنوان یک فاکتور ۴۴

شکل ۴-۱۱- اثر متقابل غلظت و قارچ روی میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم(J_2) *Meloidogyne javanica* بعد از گذشت ۲۴ ساعت ۴۶

شکل ۴-۱۲- اثر متقابل غلظت و قارچ روی میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم(J_2) *Meloidogyne javanica* بعد از گذشت ۴۸ ساعت ۴۷

شکل ۴-۱۳- اثر متقابل غلظت و قارچ روی میانگین درصد مرگ و میر جوان سن دوم(J_2) *Meloidogyne javanica* بعد از گذشت ۷۲ ساعت ۴۸

شکل ۴-۱۴- اثر متقابل قارچ و غلظت روی میانگین تعداد تخم تفریخ شده *Meloidogyne javanica* در عصاره‌های کشت قارچ‌های *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* با در نظر گرفت زمان به عنوان یک فاکتور ۵۰

شکل ۴-۱۵- اثر متقابل قارچ و غلظت روی میانگین تعداد تخم تفریخ شده نماتد *Meloidogyne javanica* در عصاره‌های کشت قارچ‌های *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* بعد از گذشت ۲ روز ۵۳

شکل ۴-۱۶- اثر متقابل قارچ و غلظت روی میانگین تعداد تخم تفریخ شده نماتد *Meloidogyne javanica* در عصاره‌های کشت قارچ‌های *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* بعد از گذشت ۴ روز ۵۴

شکل ۴-۱۷- اثر متقابل قارچ و غلظت روی میانگین تعداد تخم تفریخ شده نماتد *Meloidogyne javanica* در عصاره‌های کشت قارچ‌های *Paecilomyces lilacinus* و *Isaria farinosa* بعد از گذشت ۶ روز ۵۵

فصل اول

مقدمه

زندگی انسان ها در دنیا به حیات گیاهان وابستگی شدید دارد، این موجودات زنده بخش عمده ای از غذای بشر را تامین می کنند. گیاهان تا زمانی که از خاک تغذیه می کنند و رطوبت، حرارت و نور کافی دریافت می‌نمایند، به خوبی رشد می‌کنند، ولی در صورت اختلال در دریافت هر یک از عوامل ذکر شده، بیمار گشته و این بیماری بر رشد و تولید آنها موثر است، عوامل بیماریزای گیاهی به طور متوسط ۱۷ درصد محصولات کشاورزی را از بین می برند. حفظ محصولات کشاورزی برای تامین غذای جمعیت رو به فزونی جهان با مبارزه با عوامل بیماریزای گیاهی از طریق کم خطرترین روش های کنترل برای انسان و محیط زیست ، ضروری به نظر می رسد. یکی از این عوامل بیماریزا، نماتدهای انگل گیاهی می‌باشد (اکا و همکاران، ۲۰۰۰).

نماتدهای ریشه‌گرهی .*Meloidogyne* spp از نظر اقتصادی مهمترین نماتدهای پارازیت گیاهی در سطح جهان محسوب می‌شوند. پراکندگی جهانی، دامنه وسیع میزبانی و تعامل با سایر بیمارگرهای گیاهی، آن ها را به عنوان یکی از عوامل درجه اول بیماری‌زا که تامین غذای جهان را تهدید می کند قرار داده است . نماتدهای مذکور ارتباط غذایی پیچیده و اختصاصی را با میزبانش بر قرار می کنند و تشکیل ساختارهای اختصاصی در ریشه میزبان به نام سلول غول آسا (Giant cell) را سبب می‌شوند. نماتدهای ریشه‌گرهی باعث ایجاد گال روی ریشه، ضعف، کاهش رشد و پژمردگی در اندام های هوایی می شوند . چهار گو نه از نماتد مذکور از اهمیت بیشتری برخوردار است که در ایران گونه *Meloidogyne javanica* بیشترین خسارت و پراکندگی را دارد (پری و همکاران، ۲۰۱۰).

انواع روش‌های کنترل برای مبارزه با نماتدها استفاده می‌شود، که هدف این روشهای کنترل رساندن جمعیت نماتد به حد آستانه اقتصادی می‌باشد، در مبارزه با نماتدها، استفاده از ارقام مقاوم و روش‌های زراعی از جمله آیش، غرقاب، تناوب زراعی، گیاهان تله، استفاده از سموم شیمیایی مطرح است، که بعضی از این روش‌های کنترل، کارایی لازم را نداشته و یا در برخی موارد نظیر مبارزه شیمیایی برای س لامتی انسان و محیط زیست مضر شناخته شده‌اند. در این راستا کنترل بیولوژیکی (Biological control) می‌تواند به عنوان روش جایگزین و یا مکمل سایر روش‌ها به کار گرفته شود . کنترل بیولوژیکی، استفاده از آنتاگونیست ها (Antagonist) جهت مبارزه با بیماری‌های گیاهی می‌باشد که در بین روش های کنترل سازگاری بیشتری با محیط زیست دارد (آهون منش، ۱۳۸۵).

کاهش جمعیت نماتدها از طریق فعالیت میکروارگانیسم های زنده که ممکن است به طور طبیعی وجود داشته و یا با وارد کردن آنتاگونیست ها به محیط انجام می شود، را کنترل بیولوژیک گویند (استیرلینگ، ۱۹۹۱). برخی از ویژگی‌های یک عامل کنترل بیولوژیک موفق را اینگونه ذکر کرده اند : ۱- به میزان زیاد توانایی انگلی کردن یا شکار نماتد را داشته باشد. ۲- برای نماتد اختصاصی و برای گیاهان مضر نباشد . ۳- قدرت رشد و بقا در دامنه قابل قبولی از اسیدیته خاک و دما را داشته باشد . ۴- امکان تکثیر روی محیط کشت مصنوعی باشد. ۵- قدرت رقابت با سایر میکروارگانیسم ها را دارا باشد (جاتالا، ۱۹۸۶).

در کنترل بیولوژیک ی نماتدهای ریشه گرهی *Meloidogyne* spp. از باکتری هایی چون *Pasturia penetranse*، *Bacillus thuringiensis*، *Burkholderia cepacia* استفاده شده است (شارون و همکاران ، ۲۰۰۱). در مبارزات بیولوژیک علیه نماتدها، قارچ‌ها اهمیت بیشتری داشته و بعضی از آنها پتانسیل بالایی در کنترل نماتدها دارند. اولین دسته از این قارچ ها، انگل داخلی نماتدها هستند، اینها اغلب پارازیت اجباری بوده و چرخه زندگی را درون بدن میزبان کامل می کنند، *Catenaria anguillulae* و *Hirsutella rhossiliensis* مثال‌هایی از این گروه هستند (بارون، ۱۹۷۷). دسته دوم قارچ‌هایی هستند که ساختارهای به عنوان تله ایجاد می‌کنند و نماتد را به دام می‌اندازند. از این گروه به قارچ‌های *Monacrospora cinopagum*، *Arthrobotrys oligospora* و *Dactylella candida* می‌توان اشاره کرد. دسته سوم قارچ‌های انگل تخم و ماده‌ها هستند که به صورت انگل‌های اجباری و اختیاری عمل می‌کنند . از انگل های اجباری *Nematophthora gynophila* را می‌توان نام برد (کری و کرامپ، ۱۹۷۷). انگل‌های اختیاری هم گونه ه ایی از *Verticillium* و *Paecilomyces* هستند (جاتالا، ۱۹۸۶). قارچ *P. lilacinus* یک قارچ فرصت طلب ساپروفیت (Saprophyte) بوده که قادر به انگلی کردن ماده بالغ و تخم نماتدهای ریشه‌گرهی می‌باشد. این قارچ اولین بار در ارتباط با تخم های نماتد توسط لیسک (۱۹۷۶) مشاهده و سپس توسط جاتالا (۱۹۸۶) توانایی انگلی کردن تخم های نماتد *Meloidogyne incognita* توسط این قارچ به اثبات رسیده است . کابانیلاس و همکاران (۱۹۸۸) اثر چند جدایه *P. lilacinus* روی فاکتورهای رشدی گیاه گوجه فرنگی آلوده به نماتد *M. incognita* را مطالعه کردند و به این نتیجه رسیدند که بعضی از جدایه‌ها، بیشترین تاثیر روی افزایش رشد گیاه گوجه فرنگی آلوده به نماتد ریشه‌گرهی را دارد.

هدف از اجرای این پژوهش، مطالعه تاثیر جدایه هایی از قارچ *P. lilacinus* و *Isaria farinosa* درکنترل نماتد ریشه‌گرهی *M. javanica* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای می‌باشد.

فصل دوم

پیشینه تحقیق و بررسی منابع

۲-۱- نماتدهای ریشه‌گرهی

۲-۱-۱- اهمیت نماتد ریشه‌گرهی *Meloidogyne* spp.

نماتدهای ریشه گرهی *Meloidogyne* spp. از نظر اقتصادی ، یکی از مهمترین نماتدهای خسارت‌زای کشاورزی در جهان هستند . پراکندگی جهانی، دامنه وسیع میزبانی و تعامل با سایر بیمارگرهای گیاهی آن ها را به عنوان یکی از عوامل درجه اول بیماری زا که تامین غذای جهان را تهدید می کند قرار داده است . این نماتدها، انگل داخلی ریشه، پلی فاژ و غیر مهاجر بوده و در دنیا ۸۰ گونه مختلف دارد که بعضی از این گونه‌ها دارای نژادهای مختلف می باشند (پری و همکاران، ۲۰۱۰). مهمترین گونه‌های نماتد ریشه‌گرهی عبارتند از، *Meloidogyne javanica*، *M. incognita*، *M.arenaria*، *M. hapla* که این گونه ها عامل بیش از ۹۵ درصد آلودگی‌های حاصل از نماتدهای ریشه‌گرهی در زمین‌های کشاورزی را شامل می‌شوند. در دنیا نماتد *M. incognita* بیشترین خسارت و پراکندگی را دارد در حالی که در ایران گونه *M. javanica* از اهمیت بیشتری برخوردار است (اخیانی و همکاران، ۱۳۶۳). این بیمارگر گیاهی باعث کاهش حدود پنج درصدی در تولید محصولات کشاورزی در سطح جهان شده است و یکی از عمده ترین موانع تولید غذای مناسب در بسیاری از کشورهای در حال توسعه به شمار می آید. این نماتد به بیش از ۲۰۰۰ گونه گیاهی حمله می کند و اغلب ارتباط غذایی پیچیده و اختصاصی را با میزبان‌هایش ایجاد می‌کند (هوسی و بارکر، ۱۹۷۳).

۲-۱-۲- تاریخچه نماتد ریشه‌گرهی

نماتد ریشه‌گرهی، دومین جنس از نماتدهای انگل گیاهی بود که توسط برکلی سال ۱۸۸۵ میلادی در کشور انگلستان شناسایی شد و آن را Vibrio نامید. در سال ۱۸۷۹، کورنو این نماتد را تحت عنوان *Anguillia marion* تشریح نمود. گولدی در سال ۱۸۷۷ گونه‌ای خاص از این نماتد را تحت نام *Meliodogyne exigua* از روی ریشه درخت قهوه گزارش کرد. سپس در ۱۸۸۹ میلادی آلکینسون با توضیح چرخه زندگی این نماتد ، نام *Heterodera radicola* را انتخاب نمود که این نام چند دهه مورد استفاده قرار گرفت و سرانجام نام پیشنهادی *Meloidogyne* spp. که توسط گولدی در سال ۱۸۹۲ عنوان شد مقبولیت عمومی پیدا کرد (پری و همکاران، ۲۰۱۰).

۲-۱-۳- نماتد ریشه‌گرهی در ایران

در ایران اولین بار این نماتد در سال ۱۳۳۵، توسط قوام الدین شریف، روی ریشه گوجه فرنگی در باغ کشاورزی قصرشیرین مشاهد و به نام *Heteroderan marioni* نامگذاری شد. سپس در سال ۱۹۶۸، امیدوار آنرا از سایر مناطق کشاورزی ایران گزارش و پراکندگی سه گونه از نماتدهای ریشه‌گرهی *M. arenaria*، *M. incognita* و *M. hapla* را مشخص کرد (باروتی، ۱۳۵۳).

در سال ۱۹۷۲، خیری *M. arenaria* را از گیلان گزارش نمود . خیری ، باروتی و ابیوردی ، گونه *M. incognita* را از گیلان، اصفهان و فارس گزارش کرده اند. گونه *M. hapla* توسط ابیوردی و همکاران در سال ۱۹۷۹ از فارس گزارش شده است، بررسی‌های بیشتر نشان داده است که گونه *M. javanica* به طور وسیعتری پراکندگی دارد و از گیلان، مغان، اصفهان و فارس گزارش شده است (مجتهدی و باروتی، ۱۳۵۵). اخیانی و همکاران (۱۳۶۳) تحقیقاتی در مورد گونه ها و نژاد های نماتد ریشه‌گرهی در ایران انجام داد ند، که طی این پژوهش مشخص شد که نماتد *M. javanica* رایج‌ترین گونه در سطح کشور و پس از آن به ترتیب گونه های *M. incognita*، *M.arenaria* و *M. hapla* غالب هستند.

۲-۱-۴- شرح جنس نماتد ریشه‌گرهی (*Meloidogyne* spp.)

این جنس متعلق به خانواده *Heteroderidae* و زیر خانواده *Meloidogyninae* بوده و به علت ایجاد گال در روی ریشه گیاهان، نماتد ریشه‌گرهی نامیده می‌شود، این نماتدها دارای دو شکل جنسی می‌باشند.

۲-۱-۴-۱- مشخصات جوان سن دوم (J_2)

لاروهای سن اول در داخل تخم تفریخ شده و جوان سن دوم (J_2) از تخم خارج می شود. جوان‌های سن دوم (J_2) کرمی شکل و طولشان به طور معمول بین ۳۰۰ تا ۵۰۰ میکرومتر است. مورفولوژی سر در اکثر گونه‌ها کاملاً مشابه است. دارای استایلت ظریف به طول ۸ تا ۱۸ میکرومتر که نوک آن بسیار نازک می باشد. محل ریزش غده پشتی یکی از شاخص های مهم در تشخیص گونه است . مری بلحباب میانی توسعه یافته و

سه عدد غده که دار ای همپوشانی شکمی با روده است دیده می شود. دم در انتها دارای یک قسمت شفاف کوتیکولی(hyaline) می‌باشد که می‌تواند در گونه‌ها متغیر باشد، جوان‌های سن دوم (J_2) مهاجر و آلوده کننده هستند (ایسنباک و تریاتافیل،۱۹۹۱).

۲-۱-۴-۲- مشخصات نماتد ماده

ماده‌های بالغ این جنس، متورم با بدن کیسه‌ای شکل، به طول ۰/۴۴ تا۱/۳۰ میلی‌متر و عرض۰/۳ تا ۰/۷ میلی‌متر، به رنگ سفید و گردن برآمده می باشند. دارای یک کوتیکول با ضخامت متوسط که در طول زندگی ماده نرم باقی می ماند. شبکه کوتیکولی سر متوسط، استایلت ظریف، باریک و به طول ۱۰ تا ۲۴ میکرومتر می‌باشد. حباب میانی مری بزرگ و ماهیچه ای، با دریچه مشخص و سه غده مری که از سمت پشتی با روده همپوشانی دارد. محل ریزش غده پشتی مری عقب تر از گره های استایلت قرار گرفته است . منفذ ترشحی جلوتر از حباب میان‌ی مری و اندکی عقب تر از پایه استایلت قرار گرفته است . روزنه دفعی و روزنه تناسلی نزدیک به هم در انتهای بدن قرار گرفته‌اند (پری و همکاران،۲۰۱۰). قسمت انتهایی نماتد اغلب هم تراز با بدن و یا بطور جزئی برآمده می باشد (لوک و همکاران، ۱۹۸۸).کوتیکول اطراف روزنه های دفعی و تناسلی در انتهای بدن تشکیل شبکه ای به شکل اثر انگشت به نام Perineal pattern را می‌دهد، که در شناسایی گونه ها حائز اهمیت است. دو لوله تناسلی به طرف جلو بدن کشیده شده‌اند و حجم عمده‌ای از بدن را اشغال می‌کنند. شش غده تک سلولی بزرگ در ناحیه عقبی بدن و جود دارد، که به راست روده متصل هستند و مقدار زیادی ماده ژلاتینی تولید می‌کنند (ایسنباک و تریاتافیل،۱۹۹۱).

۲-۱-۴-۳- مشخصات نماتد نر

نماتدهای نر همگی کرمی شکل بوده، کوتیکول دارای حلقه های عرضی درشت و سطوح جانبی دارای چهار شیار طولی می باشد. طول نرها از ۷۰۰ تا ۲۰۰ میکرومتر متغییر بوده، که بستگی به شرایط موجود در طی دوره رشدی آنها دارد . ناحیه سر کاملاً مشخص و کوتیکولی و دارای یک تا سه حلقه می باشد، وجود یا فقدان حلقه‌ها در آن ممکن است برای تشخیص به کار رود . استایلت به طول ۱۸ تا ۲۴ میکرومتر با گره‌های انتهایی بزرگ که یکی از شاخص های خوب برای تشخیص است . مری دارای لوله اولیه استوانه ای و حباب میانی تخم‌مرغی شکل با ضخامت مشخص و لوله ثانویه کوتاه و غدد مری از سطح شکمی با روده همپوشانی دارد. معمولاً دارای یک لوله تناسلی اما در نرهایی که از برگشت جنسی تکامل یافته اند، دو لوله تناسلی دیده می‌شود. آلت تناسلی نرها (Spicule) کشیده، نسبتاً باریک که طول آن ۱۹ تا ۴۰ میکرومتر و طول بخش هادی آن بین ۷ تا ۱۱ میکرومتر متغییر است . دم گرد، کوتاه و بدون پرده بورسا می باشد (پری و همکاران،۲۰۱۰).