دانشکده کشاورزی

گروه گیاه پزشکی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی اثر بیوکنترلی فنازین- ۱- کربوکسیلیک اسید تولید شده توسط جدایه های *Pseudomonas fluorescens* ریزوسفر روی بیماری مرگ گیاهچه خیار دراثر قارچ *Pythium ultimum* دراستان خراسان رضوی

ابراهیم بهنام

شهریور ۹۱

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد

بررسی اثر بیوکنترلی فنازین- ۱- کربوکسیلیک اسید تولید شده توسط جدایه های *Pseudomonas fluorescens* ریزوسفر روی بیماری مرگ گیاهچه خیار دراثر قارچ *Pythium ultimum* دراستان خراسان رضوی

ابراهیم بهنام

استاد راهنما:

دکتر حمید روحانی

استاد مشاور:

دکتر عصمت مهدیخانی

شهریور ۹۱

دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی

از این پایان نامه کارشناسی ارشد توسط **ابراهیم بهنام** دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی در تاریخ ۱۳۹۱/۶/۲۷ در حضور هیات داوران دفاع گردید. پس از بررسی های لازم، هیات داوران این پایان نامه را با نمره عدد حروف و با درجه مورد تایید قرار داد / نداد.

عنوان پایان نامه : بررسی اثر بیوکنترلی فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید تولید شده توسط جدایه های *Pseudomonas fluorescens* ریزوسفر روی بیماری مرگ گیاهچه خیار دراثر قارچ *Pythium ultimum* دراستان خراسان رضوی

سمت در هیات داوران	نام و نام خانوادگی	مرتبه علمی	گروه	موسسه / دانشگاه	امضاء
استاد داور	دکتر ساره بقایی	استادیار	گیاه پزشکی	فردوسی مشهد	
استاد داور	دکتر مجتبی ممر آبادی	استادیار	گیاه پزشکی	فردوسی مشهد	
نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر محسن مهرور	استادیار	گیاه پزشکی	فردوسی مشهد	
استاد راهنما	دکتر حمید روحانی	استاد	گیاه پزشکی	فردوسی مشهد	
استاد مشاور	دکتر عصمت مهدیخانی مقدم	دانشیار	گیاه پزشکی	فردوسی مشهد	

تعهد نامه

عنوان پایان نامه:: بررسی اثر بیوکنترلی فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید تولید شده توسط جدایه های *Pseudomonas fluorescens* ریزوسفر روی بیماری مرگ گیاهچه خیار دراثر قارچ *Pythium ultimum* دراستان خراسان رضوی

اینجانب **ابراهیم بهنام** دانشجوی دوره کارشناسی ارشد رشته بیماری شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد تحت راهنمایی دکتر حمید روحانی 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

ابراهیم بهنام

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.

چکیده:

بیماری بوته میری با عامل *Pythium ultimum* یکی از مخرب ترین بیماری‌های خانواده کدوئیان (*Cucurbitaceae*) بخصوص خیار در سطح دنیا از جمله در ایران به شمار می رود. سودومو ناس ها به خصوص *Pseudomonas fluorescens* با تولید متابولیت های متنوعی مثل پایولوتئورین و ۲و۴ دی استیل فلوروگلوسینول قادرند قارچ عامل بیماری را تحت کنترل درآورند. برای بررسی اثر آنتی بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید بر روی قارچ عامل بیماری، پس از جداسازی ۱۵۰ جدایه باکتری از رایزوسفر خیار، برترین آنها از نظر جلوگیری از رشد کلنی پیتیوم در آزمون کشت متقابل روی محیط کشت KB+PDA تعیین گردید. از بین آن ها ۲۳ جدایه با قابلیت بازدارندگی ۶۷/۳-۲۵/۵۳ درصد به عنوان جدایه های برتر انتخاب شدند. برای تعیین جدایه های دارای ژن فنازین-۱-کربوکسیلیک (PCA) ازآزمونPCR با دو پرایمرpca2a و pca2b استفاده شد. نتایج آن نشان داد که تنها ۹ جدایهF10 , F141 , Y-21 , 79-2 ,

T30-1 , CHN4 , M8-10 , T37 , M80-3 دارای این ژن می باشند. میزان فعالیت این ژنها با استفاده از روش کیفی "ایجاد رسوب سبز در محیط PDA" مورد ارزیابی قرار گرفت و مشخص شد که ۴ جدایه اول قادر به تولید رسوب سبز رنگ می باشند ولی این رسوب در ۵ جدایه آخر مشاهده نشد، این پدیده را می توان به بیان بهتر ژن PCA درآنها نسبت داد. با این حال، نتایج آزمایشهای گلخانه ای نشان داد که هر ۹ جدایه قادر به کنترل کامل مرگ گیاهچه قبل از خروج گیاهجه ها از خاک (Pre-emergence) می باشند، در حالیکه ۴ جدایه اول اثر بهتری در کنترل بیماری در هر دو مرحله قبل و بعد از خروج گیاهجه هااز خاک (Pre and Post emergence) نشان دادند. در بررسی های دیگر استرین CHA89 که تنها قادر به تولید سیدروفور می باشد توانست از مرگ گیاهجه جلوگیری نماید ونشان از تاثیر این متابولیت در جلوگیری از فعالیت قارچ در مرحله pre-emergence دارد.

کلیدواژه ها: کنترل بیولوژیک، فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید، سودوموناس فلورسنت، بوته میری خیار، *Pythium ultimum*، خراسان رضوی

سپاسگزاری:

سپاس شایسته پرودگار بزرگ است که حامی و یاور همیشگی من در همه مراحل زندگی بوده است، در پاسخ به نعمت های بی شماری که به من عنایت فرموده زبانم ناتوان از به جا آوردن شکر است.

از استاد محترم و بزرگم جناب پروفسور روحانی نیز کمال تشکر را دارم که با رهنمودهای خردمندانه خود چه در زمینه درسی چه در زمینه اجتماعی باعث تعالی بیشتر بنده شدند. از خانم دکتر مهدیخانی نیز که به عنوان مشاور در این طرح همراه بنده بودند نیز تشکر می کنم.

تشکری ویژه از جناب دکتر صابری می کنم که همواره بنده را حمایت می کردند.

. از دوستان و همکلاسی های عزیز تشکر می کنم که از هیچ کمکی به من در یغ نکردند.

اما تشکر ویزه از پدر بزرگوار و مادر مهربانم دارم و از ایشان قدردانی میکنم بدین جهت که هیچ گاه از هیچ چیزی در راه رشد من دریغ نکردند و با تمام وجود به من انگیزه ادامه مسیر پیشرفت را می دادند. امیدوارم توانسته باشم گوشه کوچکی از لطف هایشان را جبران کرده باشم.

از مسئول محترم آزمایشگاه بیماری شناسی گیاهی جناب مهندس سبک خیز و اساتید محترم گروه نیز کمال تشکر را دارم.

شاید نتوان به گذشته بازگشت و آغازی زیبا داشت اما می توان از اکنون شروع کرد و پایانی زیبا ساخت. به امید روزهای بهتر برای همه جوانان ایرانی.

فهرست مطالب :

فصل اول: ۱

مقدمه: ۱

اهداف تحقیق: ۶

فصل دوم: ۷

بررسی منابع: ۷

۲-۱-قارچ *Pythium ultimum*: ۷

۲-۱-۱- خصوصیات ریخت شناسی: ۸

۲-۱-۲- دامنه میزبانی و پراکنش: ۹

۲-۱-۳- اکولوژی: ۱۰

۲-۱-۴-تنوع درون گونه ای: ۱۱

۲-۱-۵-مدیریت: ۱۲

۲-۱-۵-۱کنترل زراعی: ۱۲

۲-۱-۵-۲کنترل بیولوژیک: ۱۳

۲-۱-۵-۳کنترل شیمیایی: ۱۴

۲-۲-کنترل بیولوژیک: ۱۴

۲-۲-۱-تاریخچه کنترل بیولوژیک : ۱۵

۲-۲-۲فرا ریشه : ۱۷

۲-۲-۳طبقه بندی جنس سودوموناس : ۱۷

۲-۲-۴تاریخچه کاربرد سودوموناس های فلورسنت: ۱۹

۲-۲-۴-۲تولید آنتی بیوتیک: ۲۰
۲-۲-۴-۳تولید سیدروفور: ۲۱
۲-۲-۴-۴تولید سیانید هیدروژن: ۲۲
۲-۲-۴-۵آنتی بیوتیک فنازین: ۲۳
۲-۲-۴-۶چگونگی تولید آنتی بیوتیک فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید: ۲۴
۲-۳-اهمیت بیوکنترلی سودوموناس های فلورسنت درکنترل بیولوژیک مرگ گیاهچه پیتیومی: ۲۶
فصل سوم: ۲۹
مواد و روش ها: ۲۹
۳-۱-نمونه برداری از گلخانه ها ی خیار: ۲۹
۳-۲-جداسازی سودوموناس های فلورسنت: ۲۹
۳-۳-شناسایی سودوموناس های فلورسنت: ۳۰
۳-۴-اثبات بیماری زایی قارچ*pythuim ultimum var. ultimum* روی گیاه خیار: ۳۲
۳-۵-بررسی قابلیت بازدارندگی سودوموناس های فلورسنت از رشد قارچ *pythium ultimum*: ۳۲
۳-۶-انجام واکنش ها زنجیره ای پلیمر از (PCR) جهت رد یابی ژن آنتی بیوتیک فنازین: ۳۳
۳-۶-۱-اندازه گیری غلظت DNA توسط اسپکتروفتومتری: ۳۵
۳-۶-۲-اندازه گیری غلظت DNA توسط ژل آگاروز: ۳۵
۳-۶-۳-مراحل انجام تکنیک PCR: ۳۵
۳-۶-۴-ترکیب واکنش PCR: ۳۶
۳-۶-۵- برنامه حرارتی در تکنیک PCR ۳۷
۳-۶-۶-الکتروفوز فرآورده های تکثیر شده در آزمون PCR: ۳۷
۳-۶-۷-تجزیه و تحلیل داده های حاصل از PCR: ۳۸
۳-۷-سنجش کیفی تولید آنتی بیوتیک فنازین ۱- کربوکسیلیک اسید در محیط کشت: ۳۸

۳-۸- بررسی تولید برخی متابولیتهای ضد قارچی موثر در جدایه های بدست آمده: ۳۸
۳-۸-۱-تولید سیدروفور: ۳۸
۳-۸-۲-تولید سیانید هیدروژن: ۳۹
۳-۸-۳-تولید آنتی بیوتیک: ۴۰
۳-۹-بررسی های گلخانه ای: ۴۰
۳-۹-۱تعیین قوه نامیه بذر ها: ۴۰
۳-۹-۲-ضدعفونی سطحی بذور: ۴۱
۳-۹-۳-تهیه مایع تلقیح استرین های باکتری جهت تیمار بذور: ۴۱
۳-۹-۴-خاک و سترون کردن آن: ۴۱
۳-۹-۵-تهیه ایناکولوم قارچ عامل بیماری: ۴۱
۳-۹-۶-بررسی گلخانه ای اثر باکتری *pseudomonas fluorescens* بر روی قارچ *P. ultimum* ۴۲
۳-۱۰-برداشت و شاخص های ارزیابی: ۴۲
۳-۱۱-تجزیه و تحلیل داده ها: ۴۲
فصل چهارم: ۴۳
نتایج و بحث : ۴۳
نتایج: ۴۳
۴-۱-شناسایی جدایه های باکتری بر اساس خصوصیات مرفولوژی، فیزیولوژی و بیوشیمیایی: ۴۳
۴-۲-اثبات بیماری زایی قارچ*p. Ultimum* بر روی خیار ۴۳
۴-۳-بررسی اثر بازدارندگی جدایه های *pseudomonas flourecsens* بر روی رشد قارچ *p. Ultimum* در شرایط ازمایشگاه: ۴۴
۴-۴-ردیابی ژن تولید کننده انتی بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید در جدایه های برتر: ۴۶
۴-۵-اندازه گیری توانایی تولید ترکیبات ضد قارچی جدایه ها بر علیه *p. Ultimum* در شرایط آزمایشگاه: ۴۶

۴-۶-تست کیفی اثبات بیان ژن تولید کننده آنتی بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید: ۴۷
۴-۷-نتایج سنجش سیانید هیدروژن تولید شده توسط سودوموناس های فلورسنت: ۴۹
۴-۸-نتایج حاصل از تست سیدروفور: ۵۱
۴-۹-بررسی های گلخانه ای قابلیت گلخانه ای تیمار بذور خیار توسط جدایه های برتر روی بیماری مرگ گیاهچه: ۵۲
۴-۱۰-بررسی همبستگی بین تولید متابولیت های ضدقارچی و میزان ایندکس بیماری: ۵۴
۴-۱۱-بررسی تولید آنتی بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسیدوکنترل بیماری damping off: ۵۴
۴-۱۲-بررسی همبستگی بین وزن تر ریشه، وزن تر بوته و وزن کل گیاه با میزان بیماری: ۵۴
۴-۲-بحث: ۵۵
فصل پنجم: ۶۰
نتیجه گیری کلی و پیشنهادات: ۶۰
۵-۱-نتیجه گیری: ۶۰
۵-۲-پیشنهادات: ۶۳
منابع و مآخذ: ۶۴
فهرست اسامی لاتین: ۷۲

فهرست شکل ها

عنوان شکل | صفحه

شکل۲-۱:قارچ *P. ultimum* روی محیط کشت PDA ۹

شکل۲-۲:مسیر بیوسنتز آنتی بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید ۲۶

شکل۳-۱:جدول شناسایی سودوموناس ها ۳۱

شکل ۴-۱:علایم بوته میری روی خیار، گیاه آلوده (سمت چپ) گیاه سالم (سمت راست) ۴۴

شکل ۴-۲:بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه های سودوموناس فلورسنت بر روی قارچ *P. ultimum* در روش کشت متقابل ۴۴

شکل۴-۳:جدایه های باکتری سودوموناس فلورسنت بر اساس میزان هاله بازدارندگی در محیط KB+PD ۴۵

شکل ۴-۴ :باند ۱۵۰ جفت بازی حاصل از وجود ژن تولید کننده آنتی بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید در جدایه های باکتریایی سودوموناس فلورسنت ۴۶

شکل ۴-۵:میزان رشد قارچ *p. Ultimum* در تشتک پتری در مقابل آنتی بیوتیک های نفوذ کرده سودوموناس های فلورسنت در محیط کشت PDA ۴۶

شکل۴-۶:درصد بازدارندگی از رشد قارچ *p. Ultimum* در تشتک پتری در مقابل آنتی بیوتیک های نفوذ کرده سودوموناس های فلورسنت در محیط کشت PDA ۴۷

شکل ۴-۷:تشکیل رسوب سبز فنازین-۱-کربوکسیلیک سید در مرکز کلنی های باکتریایی ۴۷

شکل۴-۸:تولید متابولیت سیانید هیدروژن و تغییر رنگ کاغذ صافی ۴۸

شکل۴-۹:تولید سیدروفور در محیط مایع سوکسینات وتغییر رنگ محیط ۵۰

شکل۴-۱۰:میزان تولید سیدروفور در جدایه های باکتریایی سودوموناس فلورسنت بر حسب میکرومول بر لیتر ۵۰

شکل۴-۱۱: بررسی اثر گلخانه ای جدایه های سودوموناس:از راست به چپ:ch-uوشاهد سالم، 2-79وشاهد آلوده، sh-1وf10، sh-2-11وpf5 ..... ۵۱

شکل۴-۱۲:شدت بیماری مرگ گیاهچه خیار در آلودگی با *P. ultimum* ۵۲

شکل۴-۱۳:وزن تر ریشه، قسمت های هوایی و وزن کل بوته در تیمار بذور با قارچ پیتیوم و جدایه های برتر سودوموناس فلورسنت ۵۳

فهرست جدول ها

عنوان جدول صفحه

جدول ۲-۱ متابولیت های خارج سلولی تولید شده توسط جدایه CHA0 ..... ۲۰

جدول ۳-۱ اسامی و توالی آغاز گر مورد استفاده در تکنیک PCR..... ۳۶

جدول ۳-۲ مقدار و غلظت ترکیبات اضافه شده به کیت در واکنش PCR ۳۶

جدول ۳-۳ – برنامه حرارتی در تکنیک PCR..... ۳۷

جدول ۴-۱:گروه بندی جدایه های سودوموناس فلورسنت بر اساس تولید HCN..... ۴۹

جدول۴-۲:همبستگی بین میزان تولید متابولیت های قارچی و ایندکس بیماری مرگ گیاهچه خیار با عامل *p. Ultimum*..... ۵۳

جدول۴-۳:ضریب همبستگی بین وزن تر ریشه، وزن تر بوته و وزن کل گیاه با میزان بیماری..... ۵۳

فهرست علائم و اختصارها

معادل فارسی	معادل انگلیسی	علامت
میکروگرم برمیکرو لیتر	Microgram/microliter	µg/µl
میکرولیتر	Microliter	µl
نانوگرم برمیکرو لیتر	Nanogram/microliter	ng/µl
سی سی	Cici	CC
گرم	Gram	Gr
گرم بر لیتر	Gram/liter	gr/l
پیکومول	Picomol	pmol

فصل اول

مقدمه:

گیاه خیار با نام علمی *Cucumis sativus* از خانواده کدوئیان می باشد.

به احتمال زیاد خیار بومی آسیا وآفریقاست و هزاران سال کشت می گردیده است. شواهد موجود نشان می دهد که کاشت خیار درقسمت غربی آسیا در سه هزار سال پیش انجام می گرفته است. دکاندول[1] عقیده دارد که خیار بومی آسیاست و شاید هندوستان مرکز اولیه آن باشد، ولی به طور کلی عقیده بر آن است که خیار بومی جنوب آسیا می باشد، در هندوستان از سه هزار سال پیش کشت می گردیده و یونانیان و رومیان از آن استفاده می کردند. بنا بر نظر دکاندول مرکز اولیه خیار هندوستان است، دلیل این موضوع کشف گیاهی خیار مانند به اسم *Cucumis hardwickii* Royle در دامنه‌های کوههای هیمالیاست. از چند نظر این گونه شبیه خیار است با این تفاوت که پوست میوه صاف است و گوشت آن بسیار تلخ.

بنابر اظهار دکاندول و نظریه گیاه شناس مشهور انگلیسی سرژوزف هوکر[2] که نمونه های این خیار وحشی را در دامنهٔ هیمالیا جمع نمود می توان گفت که در حقیقت این گونهٔ وحشی در حوزه تغییرات ارثی و

1 Decandol
2 Sir.josef hoocker

آمیزشی خیار اهلی بوده و جزئی از آن است و تا بحال شواهدی که عکس این ادعا را ثابت کند به دست نیامده است.

دکاندول معتقد است که خیار حداقل بمدت سه هزار سال در هندوستان کشت می شده است از هندوستان خیار به چین برده شد و شاید هم زودتر از رفتن به چین خیار وارد روم و یونان قدیم گردیده است. بنابر اظهارات شارپ در زبان پهلوی کلمه خیار وجود دارد. در کتیبه های میخی ذکری ازخیار نیست ولی بطور مسلم خیار در ایران حداقل ۱۰۰۰ سال پیش از میلاد وجود داشته است.

طبق آمار فائو سطح زیر کشت جهانی این محصول در سال ۲۰۰۵، ۲۴۸۸۶۰۰ هکتار با عملکرد متوسط ۱۶/۷ تن درهکتار و تولید ۴۱۷۴۳۸۴۰ تن می باشد که بالاترین تولید متعلق به کشور چین با ۲۶۵۵۹۶۰۰ تن (۶۳/۵٪) بوده که از سطحی معادل ۱۵۵۳۱۰۰ هکتار بدست می آید متوسطعملکرد این کشور ۱۷/۱ تن می باشد. ایران باتولید ۱۴۰۰۰۰۰ تن حدود ۳/۳٪ از تولید را در اختیار داشته که از سطحی معادل ۸۰۰۰۰ هکتار بدست می آید.

خیار در مقابل سرما حساس و طالب گرما ست. چنانچه دمای شب پائین تر از $^{\circ}C$ ۵ باشد میوه ها بحد کافی تشکیل نمی شوند و یا اینکه اختلالات فیزیولوژیکی در آنها ظاهر می گردد. دمای بالا برای جوانه زنی، مرحله رویشی و مراحله زایشی لازم است حداقل دما برای جوانه زدن بذر خیار $^{\circ}C$ ۱۲ و برای رشد و نمو بالای $^{\circ}C$ ۱۰ است گلها ابتدا در دمای $^{\circ}C$ ۱۵ به بالا و گرده ها در دمای $^{\circ}C$ ۱۷ به بالا باز می شوند عمل لقاح در دمای ۲۶ تا ۲۹ درجه سانتی گراد انجام می گیرد. طبق آخرین آمارنامه منتشره در سال ۸۳، سطح زیر کشت خیار در ایران ۷۸۱۹۷ هکتار و بیشترین سطح زیر کشت متعلق به منطقه جیرفت و کهنوج بوده که در سطحی حدود ۱۵۰۰۰ هکتار کاشته می شود که حدود ۲۰٪ از سطح کل کشور را شامل می‌شود. ایران حدود ۳/۲از سطح زیر کشت جهان را بخود اختصاص داده است.

متوسط عملکرد خیار در ایران ۲۲ تن و بیشترین عملکرد مربوط به استان کهکیلویه و بویر احمد به میزان ۳۵/۵ تن می باشد.

کل تولید خیار در کشور ۱۷۱۵۰۲۴ تن و استانهای مهم تولیدکننده منطقه جیرفت و کهنوج، لرستان، خوزستان وایلام می باشند منطقه جیرفت و کهنوج ۲۶٪ از تولید کشور را در اختیار دارد.

ارقام کشت شده در ایران عبارتند از: هیبرید سوپرمیراکس[۱]، ۷۵۷ و سوپردومینوس داما[۲]، سوپر هیدارس[۳]، ارلی گرین[۴]، دیوومین گرنیدیو[۵]، وایت مکتی دومینوس[۶]، خیارهای هیبرید و گلخانه ای (دومینوتن جی آرسی[۷]، جی آراچ[۸]، پریموکا[۹] ۹۸۱۱، کا ۸۷۵۶[۱۰]، مینی بار[۱۱]، کا ۹۸۲۵[۱۲] و فرسکو[۱۳]) .

کاشت، داشت و برداشت خیار در ایران بصورت سنتی بوده و در برخی مناطق برای زودرس نمودن محصول و افزایش درآمد اقدام به زیر کشت نمودن آن در زیر پلاستیک نموده و تاریخ کاشت را حدود یک تا یک و نیم ماه جلو می کشند و محصول زودرس به بازار عرضه می دارند.

بیماریهای مهم خیار عبارتند از :

سفیدک دروغی *Pseudoperonospora cubensis*

Pseudomonas syringae pv. Lachrymans

لکه زاویه ای

بوته میری *Phytophthora drechsleri , Pythium aphanidermatum , P. ultimum P. irrigular , P. splendens , and……*

سفیدک سطحی *Phytophthora capsisi*

[1] Super mirax hybride
[2] Super dominus dama
[3] Super hydrax
[4] Early green
[5] Divumin gernidiv
[6] White mctie dominus
[7] Dominus G. R. C.
[8] G. R. H.
[9] Primo K. 9811
[10] K. 8756
[11] Mini bar
[12] K. 9825
[13] Fresco

بوته میری یا مرگ گیاهچه:

بیماری بوته میری خیار یا مرگ گیاهچه یکی از بیماری های مخرب خانواده کدوییان به خصوص خیار است. عامل این بیماری *pythium ultimum* می باشد. این شبه قارچ از عوامل مهم بوته میری و مرگ گیاهچه پیش از ظهور می باشد و انواع پوسیدگی طوقه، ریشه، غده وپیاز و پوسیدگی بذر را در بسیاری از میزبان ها ایجاد می کند. این گونه قارچی آب و هوای خنک تا گرم ملایم را ترجیح می دهد، با این حال پراکنش جهانی داشته و از انواع محصولات زراعی مناطق معتدل، سردسیر و گرمسیر گزارش شده است. این قارچ دارای دامنه میزبانی بسیار وسیع در جهان می باشد که از بسیاری از محصولا ت زراعی، باغی زینتی و کشت های گلخانه ای، نشاکاری ها و محصولات مهمی در خانواده کدوئیان، سولاناسه[1]، چتریان، گندمیان، کلم ها، کاکتوس ها و چمن ها گزارش شده است. رطوبت خاک و دمای خاک دو فاکتور محیطی موثر در انتشار این قارچ می باشند. این قارچ می تواند در شرایطی که خاک دائم در شرایط رطوبتی بالا باشد به شدت گسترش پیدا کند و خسارت زیادی را به بار بیاورد. این قارچ با اتمام منابع غذایی و نامساعد شدن شرایط تشکیل ااسپور می دهد که فرم استراحتی قارچ می باشداین ااسپورها دارای دیواره ضخیمی می باشند که رویش آن ها و حمله به گیاه تنها زمانی صورت می گیرد که شرایط محیطی مناسب فراهم گردد.

با مساعد شدن شرایط قارچ به ریشه گیاه حمله می کند که اگر این حمله در هنگامی صورت بگیرد که گیاه در مرحله گیاهچه باشد در شرایط مساعد محیطی برای قارچ این حمله منجر به مرگ گیاهچه می شود اما در صورتی که گیاه مرحله جوانی را رد کرده باشد علایم به صورت زردی شبیه به کمبود ازت، پژمردگی، کاهش محصول و در شرایط بالای رطوبتی نکروزه شدن ریشه و مرگ کامل گیاه را به دنبال دارددر ایران این بیمارگر در محصولاتی چون چغندر قند، خیار، خربزه و اغلب کدوئیان، گیاهان زینتی گلخانه ای، گوجه فرنگی و چمن خسارت زیادی وارد می آورد. کدوئیان حساسیت زیادی به پوسیدگی های پیتیومی دارند و در این بین خیار یکی از میزبان های حساس به این بیمارگر است، که تاکنون رقم مقاومی در بربر این بیمارگر معرفی نشده است. تمام ارقام خیار موجود به این قارچ حساس می باشند.

1 *Solanaceae*

پیشگیری از ورود و توسعه بیماری مهمترین راه مدیریت بیماری می باشد. از بین بردن بقایا، بهداشت زراعی، بهبود زهکشی، استفاده از شیوه های صحیح آبیاری و تهویه مناسب گلخانه از راههای کاهش میزان خسارت بیماری می باشد. استفاد از قارچ کش ها به صورت ضدعفونی بذر، همچنان مهمترین راهکار کشاورزان برای مبارزه با این بیماری می باشد. استفاده از باکتری سودوموناس فلورسنت در کنترل این بیماری با قابلیت های بالایی که دارد از جمله تولید آنتی بیوتیک های موثر، توسط بسیاری از محققین اثبات شده است. لذا در این تحقیق بررسی و شناسایی انتی بیوتیک فنازین و نقش آن در کنترل این بیماری مورد مطالعه قرار گرفته است.

نظر به اینکه استفاده از سموم در کشاورزی همواره به مسائل و مشکلاتی همراه است که از آن جمله می توان به خسارات زیاد زیست محیطی، از بین رفتن بوم زیست های جانوری، آلوده شدن منابع آب آشامیدنی، زیان هایی که سموم با وارد شدن به بدن از خود به جای می گذارند و مقاوم شدن تدریجی عوامل بیمارگر به سموم پژوهشگران همواره به دنبال این بودند که بتوانند راهی برای جایگزینی مبارزه شیمیایی پیدا کنند تا مصرف سموم را به حداقل برسانند. امید آن می رود که کنترل بیولوژیک بتواند راهی موثر در راستای جایگزینی سموم باشد. از آنجایی که در این نوع مبارزه یک عامل زنده از خود محیط زیست برای کنترل عوامل بیمارگر به کار می رود و اکثر عوامل کنترل بیولوژیک میکروارگانیسم های بی خطر و حتی مفید برای بوم زیست می باشند می توان گفت این راه کنترل مفید ترین راه موجود برای جلوگیری از خسارات وارده به محصولات می باشد چرا که بر خلاف راههای دیگر همچون دستکاری های ژنتیکی در گیاهان ذات طبیعی گیاه و محصول حفظ می شود و مسائلی چون مقاومت علیه واریته جدید گیاه توسط عوامل عوامل بیماری زا نیز وجود ندارد زیرا در مورد عوامل بیولوژیک اگر عامل بیماری زا تغییری در ژنوم خود در راستای مقابله با عامل بیولوژیک بدهد عامل بیولوژیک نیز در جواب ژنوم خود را دچار تغییر می کند. بنابر این جای بسی امیدواری دارد که با بررسی و کار و پژوهش بر روی برهم کنش های بین عوامل مختلف بیولوژیک و عوامل بیماری زای متعدد بتوان بهترین راه را برای مبارزه با هر عامل بیماری زا به طور اختصاصی و عمومی پیدا کرد.

میکروارگانیسم های بسیاری در این راه آزمایش شدند که چندین گونه قارچی باکتریایی توانستند نتایج خوبی از خود به جای بگذارند از قبیل گونه های تریکودرما، باسیلوس و سودوموناس و چندین گونه قارچی و باکتریایی دیگر که از بین همه اینها سودوموناس ها به دلیل ویژگی های منحصر به فرد از جمله قدرت کلنیزاسیون بالای ریشه، قدرت تکثیر بالا، تولید طیف وسیعی از متابولیت های ضد قارچی از جمله تعداد زیادی آنتی بیوتیک نظیر فنازین ها، ۲و۴ دی استیل فلوروگلوسینول، پایولوتئورین، پیرول نیترین و..، مواد تحریک کننده رشد، مواد سمی موثر علیه عوامل بیمارگر مثل سیاند هیدروژن، متابولیت هایی که قادرند عناصر کمیابی چون آهن را در ریشه از دسترس عوامل بیمارگر خارج کنند مثل انواع سیدروفور ها وچندین متابولیت دیگر همواره در کانون توجه محققانی هستند که بر روی کنترل بیولوژیک کار می کنند. کار بر روی هر یک از این متابولیت ها و بررسی تاثیر هر کدام بر روی عوامل بیمارگر متفاوت جای پژوهش را برای محققینی که روی این موارد کار می کنند را باز گذاشته است که بتوانند بهترین و موفق ترین مکانیسم را برای کنترل به کار ببرند. در همین راستا این تحقیق شکل گرفت تا طی آن گامی هر چند کوچک در راستای پیشرفت این پروسه نوپا و آینده دار برداشت.

اهداف تحقیق:

۱-بازدید از گلخانه های خیار در استان خراسان رضوی

۲-جدا و خالص سازی جدایه های سودوموناس فلورسنت همراه ریشه خیار

۳-بررسی وجود یا عدم وجود ژن مسئول تولید تولیدآنتی بیوتیک فنازین-۱-کربوکسیلیک اسید در جدایه های باکتری

۴-بررسی رابطه بین جدایه های دارای ژن PCA، جدایه های فاقد آن، بیان این ژن و جدایه های رفرانس cha89وCHA0 از یکطرف و کنترل بیماری مرگ گیاهچه طرف دیگر.