کد رهگیری ثبت پایان نامه: ۲۱۱۵۰۹۳

کد رهگیری ثبت پروپوزال: ۱۰۳۵۱۰۲

بسم الله الرحمن الرحيم

کلیه امتیازهای این پایان‌نامه به دانشگاه بوعلی سینا تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه بوعلی سینا (یا استاد راهنمای پایان‌نامه) و نام دانشجو با ذکر مأخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر اینصورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت. درج آدرس‌های ذیل در کلیه مقالات خارجی و داخلی مستخرج از تمام یا بخشی از مطالب این پایان‌نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها الزامی می‌باشد.

مقالات خارجی

Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

مقالات داخلی

.....،گروه.....، دانشکده.....، دانشگاه بوعلی سینا، همدان.

دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان‌نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی

عنوان:

بررسی برخی جنبه های هیستوپاتولوژیکی مقاومت به بیماری پوسیدگی ذغالی ساقه برخی گیاهان ناشی از *Macrophomina phaseolina* و تنوع موجود در بین جدایه‌های مختلف

استاد راهنما:
دکتر دوستمراد ظفری

اساتید مشاور:
دکتر سید باقر محمودی
دکتر مجید هاشمی

نگارش :
پریسا همتی

۲۹ بهمن ۱۳۹۱

ماحصل آموخته هایم را تقدیم می کنم به آنان که مهر آسمانی شان آرام بخش آلام زمینی ام است :

به استوارترین تکیه گاهم ، دستان پر مهر پدرم

به سبزترین نگاه زندگیم ، چشمان مهربان مادرم

که هرچه آموختم در مکتب عشق شما آموختم و هرچه بکوشم قطره ای از دریای بی کران مهربانیتان را سپاس نتوانم بگویم .

و برادرهای عزیزم :

محمد مهدی و علیرضای نازنین ، قلبم لبریز از عشق شماست و خوشبختی تان منتهای آرزویم .

سپاسگزاری

سپاس خدای راکه سخنوران، در ستودن او بمانند و شمارندگان، شمردن نعمت‌های او ندانند و کوشندگان، حق او را گزاردن نتوانند. خداوند سبحان را سپاسگزارم که توفیق اتمام این پایان نامه را به من عطا کرد. در پایان وظیفه خود می دانم از تمام عزیزانیکه طی انجام این تحقیق به بنده یاری نموده اند تشکر و قدردانی نمایم.

از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر دو ستمراد ظفری که در طی انجام این تحقیق با حمایتهای بی دریغ و راهنمایی های خود مرا یاری نمودند صمیمانه سپاسگزاری می نمایم، چرا که بدون راهنمایی های ایشان انجام این پایان نامه بسیار مشکل می نمود.

از اساتید مشاور ارجمندم جناب آقای دکتر سید باقر محمودی و جناب آقای دکتر مجید هاشمی که با راهنمایی های ارزنده و صرف وقت فراوان مرا در این تحقیق یاری نمودند کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از اساتید گرامی آقایان دکتر محمد جواد سلیمانی و دکتر غلام خداکرمیان که افتخار شاگردیشان را داشتم و زحمت مطالعه و داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند صمیمانه ممنون و سپاسگزارم.

در نهایت از پدر و مادر عزیزم که با صبر و پشتیبانی همیشگی خود در تمامی دوران زندگی ام امید موفقیت را در من زنده نگه داشتند و از تمامی همکاران و دوستانم در موسسه تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر کرج و اصلاح بذر چغندر قند، همچنین خانم مهندس فاطمه قبادی و مهندس سارا عظیمی (کارشناسان محترم گروه گیاهپزشکی) که در طول این دوره همراهم بودند نهایت قدردانی و سپاسگزاری را دارم.

روزهایی همراه با سعادت، سلامت و موفقیت روزافزون برای همه این عزیزان را از درگاه خداوند متعال خواستارم.

پریسا همتی

بهمن ۱۳۹۱

دانشگاه بوعلی سینا

مشخصات رساله/پایان نامه تحصیلی

عنوان: **بررسی برخی جنبه های هیستوپاتولوژیکی مقاومت به بیماری پوسیدگی ذغالی ساقه ناشی از *Macrophomina phaseolina* و تنوع موجود در بین جدایه ها**

نام نویسنده: پریسا همتی

نام اساتید راهنما: دکتر دوستمراد ظفری

نام اساتید مشاور: دکتر سید باقر محمودی- دکتر مجید هاشمی

دانشکده : کشاورزی	**گروه آموزشی: گیاهپزشکی**	
رشته تحصیلی: مهندسی کشاورزی	**گرایش تحصیلی: بیماری شناسی**	**مقطع تحصیلی: کارشناسی ارشد**
تاریخ تصویب: ۱۳۹۰/۸/۲۲	**تاریخ دفاع: ۱۳۹۱/۱۱/۲۹**	**تعداد صفحات: ۱۴۰**

چکیده:

قارچ *Marophomina phaseolina* (Tassi) Goid عامل پوسیدگی ذغالی، یک بیمارگر خاکزاد با پراکنش جهانی و دامنه میزبانی با بیش از ۵۰۰ گونه در۷۵ خانواده گیاهی می باشد. برای بررسی برخی جنبه‌های هیستوپاتولوژیکی مقاومت به بیمارگر، ۳۲ جدایه قارچ از محصولات متفاوت و از مناطق مختلف خالص‌سازی شد. شدت بیماریزائی جدایه‌ها روی بذر سویا، رقم حساس ویلیامز در شرایط گلخانه با استفاده از روش مایه‌زنی ساقه با پلاگ حاوی بیمارگر اندازه‌گیری شد. بر اساس آزمون بیماریزائی، جدایه‌ها دارای سطوح مختلفی از پرآزاری بودند و درجه پرآزاری جدایه‌ها مستقل از منشا جغرافیائی بود. بررسی میزان مقاومت ژنوتیپ‌های مختلف سویا به بیماری با استفاده از بیماریزاترین جدایه و سه روش مختلف سنجش مقاومت (روش درون شیشه، آلوده سازی ساقه با خلال دندان و بریدن ساقه) ارزیابی شد. ژنوتیپ‌های سویا در سه روش، اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ نشان دادند. ژنوتیپ‌های هاچستون و ویلیامز به ترتیب با کمترین و بیشترین میزان آلودگی، به عنوان ارقام مقاوم و حساس انتخاب شدند. بررسی‌های هیستوپاتولوژیکی پیشرفت بیماری، اختلافات چشمگیری را بین ارقام مقاوم و حساس نشان داد. ارقام مقاوم و حساس از نظر مدت زمان لازم برای نفوذ قارچ به داخل سلول ها، نحوه پیشروی قارچ در داخل سلول، مدت زمان لازم برای تولید میکرواسکلروت و درصد کلنیزاسیون ریشه‌ها با یکدیگر متفاوت بودند. تخصص یافتگی میزبانی در قارچ *M. phaseolina* ، از طریق آلوده‌سازی گیاهان با جدایه‌های به دست آمده از همان گیاه و جدایه‌های حاصل از سایر محصولات و بررسی میزان کلنیزاسیون ریشه‌های آنها در سطح میکروسکوپی تائید شد. خصوصیات ریخت شناسی جدایه‌ها شامل سرعت رشد در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، رنگ و شکل پرگنه، تراکم میسلیوم هوائی و فنوتیپ کلرات ثبت گردید. تنوع بسیار زیادی در خصوصیات ریخت‌شناسی جدایه‌ها مشاهده شد. اغلب جدایه‌ها حساس به کلرات بودند. فراوانی آناستوموز در بین تمامی جدایه‌ها بررسی شد. فراوانی پائینی از نظر امکان انجام آناستوموز موفق در بین جدایه‌های مختلف قارچ مشاهده شد. جدایه‌ها از نظر وجود ژن‌های اندوگلوکاناز ۱ و۲ مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور با استفاده از توالی‌های این دو ژن، پرایمر اختصاصی آنها طراحی شد. نتایج واکنش زنجیره ای پلی مراز (PCR) وجود این دو ژن در اکثر جدایه‌ها را تائید نمود. بین بیماریزائی جدایه‌ها و ژن‌های اندوگلوکاناز ارتباط مشخصی وجود نداشت.

واژه‌های کلیدی: **پوسیدگی ذغالی، بیماریزائی، مقاومت، هیستوپاتولوژی، تخصص یافتگی میزبانی، تنوع مورفولوژیک، آناستوموز، اندوگلوکاناز**

مقدمه ۱
بررسی منابع ۶
۱-۱- تاریخچه و منشا سویا ۶
۱-۲- مشخصات مورفولوژیکی و گیاه شناسی سویا ۶
۱-۳- مراحل رشد و نمو سویا ۷
۱-۴-سطح زیر کشت، تولید و عملکرد سویا در ایران و جهان ۸
۱-۵- بیماری های سویا ۹
۱-۶- بیماری پوسیدگی ذغالی سویا ۹
۱-۷- رده بندی و نامگذاری شبه جنس *Macrophomina* ۱۰
۱-۸- دامنه میزبانی و پراکنش ۱۱
۱-۹-علائم بیماری ۱۲
۱-۱۰- خسارت بیماری ۱۳
۱-۱۱- عوامل موثر بر آلودگی و شدت بیماری پوسیدگی ذغالی ۱۴
۱-۱۲- زیست شناسی و اکولوژی *M. phaseolina* ۱۶
۱-۱۳- مکانیسم بیماریزائی ۱۹
۱-۱۴- مدیریت بیماری ۲۰
۱-۱۵- تنوع ریخت شناسی و بیماریزائی ۲۴
۱-۱۶- تنوع فنوتیپ های کلرات پتاسیم ۲۷
۱-۱۷- بررسی تخصص یافتگی میزبانی در قارچ *M. phaseolina* ۲۸
۱-۱۸- بررسی امکان ترکیب هیف در بین جدایه های مختلف ۲۹
۱-۱۹- آنزیم های اندوگلوکاناز ۳۰
۲- مواد و روشها ۳۴
۲-۱-جمع آوری جدایه های قارچ ۳۴
۲-۲- جداسازی، تشخیص و خالص سازی جدایه های *M. phaseolina* ۳۴
۲-۲-۱- محیط کشت های استفاده شده ۳۵
۲-۳- نگهداری دراز مدت جدایه های خالص شده ۳۵
۲-۴- بررسی نحوه جوانه زنی میکرواسکلروت ۳۶
۲-۵- بررسی ساختار میکرواسکلروت ها ۳۶
۲-۶- بررسی تنوع بیماریزائی جدایه های مختلف *M. phaseolina* در شرایط گلخانه ۳۷
۲-۷- ارزیابی مقاومت ژنوتیپ های مختلف سویا به *M. phaseolina* ۳۸
۲-۷-۱-تنوع بیماریزائی جدایه ها در شرایط درون شیشه ۳۸
۲-۷-۲- ارزیابی مقاومت ژنوتیپ های سویا در شرایط گلخانه ۳۹
۲-۷-۳- تجزیه و تحلیل های آماری ۴۰

۲-۸- بررسی برخی جنبه های هیستوپاتولوژیکی مقاومت به قارچ *M. phaseolina* ۴۱
۲-۸-۱- بررسی اختلاف بین ارقام مقاوم و حساس در مرحله بذری و گیاهچه ای ۴۱
۲-۸-۲- علائم بیماری روی گیاهان بالغ ۴۱
۲-۸-۳- بررسی روند پیشرفت آلودگی در بافت میزبان حساس و مقاوم ۴۱
۲-۹- بررسی درصد کلونیزاسیون ریشه های آفتابگردان و کنجد با استفاده از جدایه های آفتابگردان، کنجد، سویا و چغندرقند ۴۵
۲-۱۰- مطالعه تنوع موجود در بین جدایه های قارچ *M. phaseolina* ۴۵
۲-۱۰-۱- بررسی تنوع مورفولوژیکی جدایه ها بر روی محیط های کشت متفاوت ۴۵
۲-۱۱- بررسی امکان آناستوموز جدایه های مختلف *M. phaseolina* ۴۷
۲-۱۲- بررسی وجود ژن های اندوگلوکاناز در جدایه های *M. phaseolina* ۴۹
۲-۱۲-۱- تهیه توده میسلیومی ۴۹
۲-۱۲-۲- استخراج DNA ژنومی ۴۹
۲-۱۳- تعیین کیفیت و کمیت دی.ان.ای ۵۰
۲-۱۴- طراحی جفت آغازگرهای اختصاصی برای ژنهای اندوگلوکاناز ۱ و ۲ با روش PCR ۵۲
۲-۱۵- انجام PCR به منظور اطمینان از کارایی و عملکرد اختصاصی آغازگرها ۵۴
۳- نتایج و بحث ۵۷
۳-۱- جداسازی و خالص سازی جدایه ها ۵۷
۳-۲-تشخیص قارچ با استفاده از خصوصیات ریخت شناسی ۵۹
۳-۳- بررسی نحوه جوانه زنی و تشکیل میکرواسکلروت ها ۵۹
۳-۴-بررسی ساختار میکرواسکلروت ۶۱
۳-۵- بررسی تنوع بیماریزائی بین جدایه های مختلف *M. phaseolina* در شرایط گلخانه ۶۲
۳-۶- ارزیابی مقاومت ژنوتیپهای مختلف سویا به *M. phaseolina* ۶۵
۳-۷- همبستگی روش های مختلف ارزیابی مقاومت ژنوتیپ های سویا ۶۸
۳-۸- بررسی برخی جنبه های هیستوپاتولوژیکی مقاومت به قارچ *M. phaseolina* ۶۹
۳-۸-۱- بررسی اختلاف بین ارقام مقاوم و حساس در مرحله بذری و گیاهچه ای ۶۹
۳-۸-۲- علائم بیماری روی گیاهان بالغ ۷۲
۳-۹- روند پیشرفت بیماری در بافتهای سویا در ارقام حساس و مقاوم ۷۴
۳-۱۲- برخی جنبه های هیستوپاتولوژیکی تخصص یافتگی میزبانی در جدایه های مختلف *M. phaseolina* ۸۵
۳-۱۳- بررسی تنوع مورفولوژیک در بین جدایه های مختلف *Macrophomina phaseolina* ۹۰
۳-۱۳-۱- بررسی تنوع ریخت شناسی جدایه ها روی محیط کشت PDA ۹۰
۳-۱۳-۲- خصوصیات شکل شناسی جدایه های مختلف قارچ روی محیط کشت مینیمال و کلرات پتاسیم ۹۹
۳-۱۳-۳- فنوتیپ های کلرات ۱۰۱
۳-۱۴- بررسی امکان ترکیب بین هیف های جدایه های مختلف *M. phaseolina* ۱۰۸

۳-۱۷- ردیابی و تکثیر ژن های اندوگلوکاناز ۱ و ۲ در جدایه های مختلف *M. phaseolina* ۱۱۰
دستاوردها ۱۱۲
پیشنهادات ۱۱۲
منابع ۱۱۵

شکل۱-۲- - مراحل رشد و نمو متفاوت در گیاه سویا: Vمراحل رویشی ۸
شکل۱-۲- چرخه زندگی قارچ Macrophomina phaseolina روی گیاه سویا، (راتر و همکاران، ۲۰۰۷).....۱۹
شکل ۲-۱- انتقال اسکلروت های قارچ به سطح خلال دندان ۳۶
شکل۲-۲- مراحل انجام آزمون سنجش شدت بیماریزائی جدایه ها در شرایط گلخانه. ۳۸
شکل۲-۳-آلوده سازی گیاهان سه هفته ای با پلاگ های کشت سه روزه قارچ به روش آلوده سازی بریدن ساقه گیاه. .۴۰
شکل ۲-۴- توده میکرواسکلروت های تولید شده روی سطح محیط کشت مایع، ۱۴ روز بعد از کشت. ۴۲
شکل ۲-۵- مراحل آلوده سازی ریشه ها با میکرواسکلروت های قارچ M. Phaseolina ۴۴
شکل ۲-۶- نحوه آماده سازی ژل الکترفورز افقی و load نمودن نمونه ها در چاهک ها ۵۱
شکل ۲-۷- کیفیت دی.ان.ای های استخراج شده از ریسه تعدادی از جدایه های M. phaseolina.....۵۲
شکل ۲-۸- توالی های هم ردیف شده ژن های اندوگلوکاناز ۱ و۲.....۵۳
شکل ۲-۹- مراحل چرخه تکثیر واکنش PCR ۵۵
شکل ۳-۱: ریسه و میکرواسکلروت های رشد کرده قارچ روی محیط کشت PDA ۵۹
شکل۳-۲-مراحل تشکیل میکرواسکلروت در قارچ Macrophomina phaseolina ۶۰
شکل۳-۳- تماس دو هیف برای تشکیل اسکلروت.....۶۰
شکل۳-۴. مراحل مشاهده ساختار اسکلروت، ۱) یک اسکلروت M. phaseolina، ۶۱
شکل ۳-۵- علائم پوسیدگی ذغالی روی گیاه سویا،.....۶۲
شکل ۳-۶- تنوع در شدت بیماریزائی جدایه های مختلف Macrophomina phaseolina با روش دانکن. ۶۳
شکل ۳-۷- تجزیه خوشه ای آزمون بیماریزائی ۳۲ جدایه M. phaseolina در شرایط گلخانه و با روش UPGMA, Euclidean Distance. ۶۴
شکل ۳-۸- علائم ایجاد شده روی گیاهان آلوده شده با M. phaseolina در سه روش متفاوت ارزیابی مقاومت، ۶۵
شکل ۳-۹- علائم بیماری پوسیدگی ذغالی روی بذر و نشاهای رقم حساس سویا. ۷۱
شکل ۳- ۱۰- علائم بیماری روی سطح ساقه و بذرها در رقم حساس.. .....۷۴
شکل ۳-۱۱- جوانه زنی میکرواسکلروت نزدیک سطح ریشه ها و تولید ریسه در سطح بافت گیاه، ۷۵
شکل ۳-۱۲- اختلافات موجود بین ارقام مقاوم و حساس از نظر نحوه پیشروی بیمارگر در بافت گیاه.. .....۷۸
شکل ۳-۱۳- اختلاف ارقام مقاوم و حساس از نظر نحوه پیشروی ریسه های قارچ در بافت گیاه. ۷۹
شکل ۳-۱۴، علائم اندام های هوائی و علائم ظاهری ریشه و اختلاف آن در رقم حساس و رقم مقاوم ۸۰
شکل ۳-۱۵- تفاوت ظاهری ریشه های آلوده در ارقام مقاوم و حساس ۸۲
شکل ۳-۱۶- مراحل شکل گیری اسکلروت در بافت ریشه گیاه. ۸۲
شکل ۳-۱۷- اختلاف ارقام مقاوم و حساس در میزان کلنیزاسیون ریشه توسط ریسه های بیمارگر ۸۴
شکل ۳-۱۸- نمای کلی از ساختار ریشه اولیه. ۸۵
شکل ۳-۱۹- میزان کلنیزاسیون ریشه های آفتابگردان.....۸۸
شکل ۳-۲۰- بررسی میزان کلنیزاسیون ریشه کنجد ۸۹
شکل ۳-۲۱- درصد فراوانی رنگ پرگنه جدایه های M. phaseolinaروی محیط کشت PDA ۹۱
شکل ۳-۲۲- درصد فراوانی رنگ پرگنه در بین جدایه های مختلف M. phaseolina.....۹۱

شکل ۳-۲۴- خصوصیات شکل شناسی جدایه های مختلف M. phaseolina روی محیط کشت PDA..... ۹۳
شکل ۳-۲۵- اختلاف انحراف معیار سرعت رشد متوسط جدایه های مختلف M. phaseolina..... ۹٤
شکل ۳-۲۶- خصوصیات شکل شناسی جدایه های مختلف M. phaseolina روی محیط کشت مینیمال ۱۰۱
شکل ۳-۲۷: نحوه رشد جدایه های مختلف قارچ روی محیط کشت مینیمال حاوی کلرات پتاسیم..... ۱۰۵
شکل ۳-۲۸: تنوع فنوتیپ های مختلف جدایه ها روی محیط کلرات،..... ۱۰۸
شکل ۳-۲۹- ترکیب هیف های رویشی بین جدایه های مختلف قارچ M. phaseolina..... ۱۱۰
شکل ۳-۳۰- نتیجه واکنش PCR با آغازگر Egl1..... ۱۱۱
شکل ۳-۳۱- نتیجه واکنش PCR با آغازگر Egl2..... ۱۱۱

جدول ۲-۱- شاخص های سنجش بیماریزائی جدایه های مختلف *M. phaseolina* ۳۹
جدول ۲-۲- مواد و مقادیر مورد نیاز برای تهیه یک لیتر محلول اصلی محیط کشت حداقل ۴۷
جدول ۲-۳: مواد و مقادیر مورد نیاز برای تهیه محلول عناصر کم مصرف ۴۷
جدول ۲-۴- فهرست جفت آغازگرهای مورد استفاده در بررسی وجود ژنهای اندوگلوکاناز ۱ و ۲ در جدایه های *M. phaseolina* ۵۳
جدول ۲-۵- مقادیر حجمی مواد مورد استفاده برای انجام یک واکنش پی.سی.آر ۵۴
جدول ۳-۱: جدایه های *M. phaseolina* مورد مطالعه ۵۸
جدول ۳-۲- تجزیه واریانس آزمون بیماریزائی جدایه های مختلف *M. phaseolina* روی گیاه سویا. ۶۳
جدول۳-۳-تجزیه واریانس واکنش ژنوتیپهای سویا به بیمارگر در شرایط درون شیشه ۶۶
جدول۳-۴- تجزیه واریانس واکنش ژنوتیپهای سویا به بیمارگر با روش خلال دندان ۶۶
جدول۳-۵- تجزیه واریانس واکنش ژنوتیپهای سویا به بیمارگر با روش بریدن ساقه..... ۶۶
جدول ۳-۶- مقایسه میانگین و گروهبندی ژنوتیپهای سویا بر اساس شدت حساسیت به بیماری با سه روش ارزیابی. ۶۷
جدول۳-۷- همبستگی موجود بین روشهای مختلف آلوده سازی با قارچ *M. phaseolina*..... ۶۹
جدول ۳-۹- سرعت رشد متوسط جدایه های مختلف *M. phaseolina*..... ۹۵
جدول ۳-۱۰: خصوصیات رشدی پرگنه بر روی محیط کشت PDA ۹۸
جدول ۳-۱۲- بررسی امکان امتزاج هیف های رویشی بین جدایه های مختلف *M. phaseolina* ۱۰۹

مقدمه

مقدمه

سویا *Glycine max* (L.) Merrill، دانه روغنی با اهمیت اقتصادی بالا است که برای تامین روغن و پروتئین کشت می شود. این محصول در ابتدا در چین شناخته شد و برای سال های متمادی به عنوان منبع غذائی مورد استفاده قرار می گرفت. در حال حاضر سویا به طور گسترده در کشورهای مختلفی کشت می شود. سویا در سال ۱۳۱۰ هجری شمسی وارد ایران شد و از سال ۱۳۱۹ به طور گسترده در کشور کشت شد (مجتهدی، ۱۳۵۰). درحال حاضر سطح زیر کشت سویا در ایران در حدود ۷۰۰۰۰ هکتار می باشد و بطور عمده در استان های شمالی ایران کشت می شود (فائو[1]).

همزمان با افزایش سطح زیر کشت این محصول در دنیا، بیماری های آن هم بیشتر و خسارت‌زاتر شده اند. بیماری پوسیدگی ذغالی ساقه، یکی از بیماری های با اهمیت سویا در تمامی مناطق سویا کاری دنیا محسوب می شود (هارتمن[2] و همکاران، ۱۹۹۹) و خسارت بالائی را به محصول سویا در ایران وارد می سازد (رعیت پناه و همکاران، ۱۳۸۶).

قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid عامل بیماری پوسیدگی ذغالی ساقه سویا است. این بیمارگر بر روی بیش از ۷۰۰ گونه گیاهی (کزوندس[3] و همکاران، ۲۰۰۸)، از محصولات با اهمیت اقتصادی بالا مثل ذرت، آفتابگردان، سویا، پنبه و سورگوم ایجاد بیماری می کند (سو[4] و همکاران، ۲۰۰۱). میکرواسکلروت های تولید شده روی سطح ساقه گیاهان بالغ، ظاهری ذغالی به ساقه ها می دهد، به همین دلیل به آن پوسیدگی ذغالی ساقه گفته می شود. بیماری پوسیدگی ذغالی ساقه، در دمای بالا و شرایط استرس خشکی، که معمولا در مناطق کشت سویا متداول است، شدت بالاتری دارد و به دلیل منطبق بودن شرایط گسترش بیماری با شرایط مناسب برای کشت سویا، خسارت بالائی را به این محصول وارد می نماید (دهینگرا و سینکلر[5]، ۱۹۷۸).

در فاصله زمانی ۱۹۹۶ تا ۲۰۰۹ میزان خسارت کلی ناشی از بیماری پوسیدگی ذغالی به محصول سویا در حدود ۷۲۹۰ میلیون کیلوگرم در هر سال تخمین زده شده است (تویزومانا و همکاران[6]، ۲۰۱۲). متوسط خسارت سالیانه این بیماری به محصول سویا در آمریکا، در حدود ۳۰ تا ۵۰ درصد

[1] FAO (Food And Agricultural Organization)
[2] Hartman
[3] Csondes
[4] Sou
[5] Dhingra and Sinclair
[6] Twizeyimana

است (سنتیل کومار و همکاران[1]، ۲۰۰۹). بیماری پوسیدگی ذغالی سویا، یکی از مهم ترین بیماری های این محصول در ایران می باشد که در مناطق اصلی کشت آن در کشور یعنی استان های مازندران وگلستان در برخی سالها تا حدود ۷۰٪ خسارت وارد نموده و سبب افت محصول سویا تا حدود ۹۹۰ کیلوگرم در هکتار شده است (رعیت پناه، ۱۳۷۰).

بیماری پوسیدگی ذغالی تقریبا در تمامی مراحل رشدی گیاه سویا به آن خسارت می زند. در مزرعه، شروع آلودگی از میکرواسکلروت های موجود در خاک، کنیدی های تولید شده در بافت های آلوده گیاهی و بقایای آلوده رها شده در مزرعه، است (دهینگرا و سینکلر، ۱۹۷۸). تمام بافت های سویا به آلودگی ناشی از ماکروفومینا حساس هستند. هیف های قارچ عامل بیماری در ابتدا به صورت بین سلولی رشد می کنند و سپس به درون استوانه آوندی گیاه نفوذ می کنند. اغلب آلودگی با یک فاز بیوتروفیک شروع می شود که در این مرحله علائم قابل مشاهده ای وجود ندارد. تغییر شرایط محیطی، استرس های گیاه میزبان و بلوغ گیاه سبب شروع فاز نکروتروفیک می شوند و علائم بیماری بروز می کنند. علایم بیماری پوسیدگی ذغالی در اندام های هوائی سویا، بعد از مرحله گلدهی و خصوصا در مراحل زایشی R_5, R_6 و R_7 (مراحل تشکیل غلاف و دانه ها) مشاهده می شود (ویلی[2]، ۱۹۸۹). این علائم شامل پژمردگی گیاه و افتادگی شاخه ها است که به علت مسدود شدن آوندها توسط ساختار های قارچی ایجاد می شود. نکروز بافت های آلوده، هم از دیگر علائم بیماری است (اسمیت و ویلی[3]، ۱۹۹۹).

جدایه های مختلف *M. phaseolina* تنوع مورفولوژیکی، بیماریزایی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی بالایی دارند. بنابراین توانائی بالائی برای تحمل شرایط مختلف محیطی و سازگاری با میزبان های مختلف را دارند و دامنه وسیعی از گیاهان حساس را آلوده می کنند. اغلب روش های کنترل این بیماری، به علت خاکزاد بودن بیمارگر، توانائی بالای تولید میکرواسکلروت و دامنه میزبانی وسیع، تاثیر چندانی در کاهش خسارات ناشی از آن را ندارند. به عنوان مثال، استفاده از روش های کنترل زراعی مانند تناوب و اعمال اقدامات بهداشت مزرعه ای در بیشتر موارد تاثیری در کاهش خسارت ناشی از این قارچ ندارد (اسمیت و ویلی، ۱۹۹۹). استفاده از قارچ کش ها نیز علاوه بر خطر ظهور نژادهای متحمل پاتوژن و آلودگی محیط زیست، اثرات ناچیزی در کنترل این بیماری

[1] Senthilkumar
[2] Wyllie
[3] Smith and Wyllie

داشته اند (صدیق و محمود[1]، ۱۹۹۳). بنابراین مقاومت میزبانی تنها روش ممکن برای کنترل بیماری است (اسمیت و ویلی، ۱۹۹۹). تنوع بالای موجود در بین جدایه های مختلف *Macrophomina phaseolina* امکان شناسائی ژنوتیپ های مقاوم به بیماری پوسیدگی ذغالی را با مشکل مواجه می کند (تاد و همکاران[2]، ۱۹۸۷). نبود اطلاعات کامل از تنوع قارچ، برنامه های اصلاحی را با مشکل مواجه می کند. هر گونه برنامه مدیریتی برای کاهش خسارت بیماری های خاکزاد از جمله استفاده از ارقام مقاوم، نیاز به شناخت کافی از ساختار ژنتیک، رفتار بیماریزایی (محمودی، ۱۳۸۳) و تشخیص پراکنش جمعیتی (ریز-فرانکو و همکاران[3]، ۲۰۰۶) بیمارگر دارد. اصولا در مطالعات مربوط به مقاومت گیاهان به بیمارگرها، باید از تنوع جدایه ها شناخت کافی داشت و در صورت وجود تنوع در بیماریزایی نیاز به انتخاب جدایه های نماینده غالب می باشد تا نتایج حاصل از برنامه های اصلاحی و انتخاب ژرم پلاسم مقاوم (متحمل) با مشکل مواجه نشود (محمودی، ۱۳۸۳).

مشاهدات میکروسکوپی نفوذ قارچ به دیواره سلولی، نشان می دهد که فشارهای مکانیکی به تنهایی در نفوذ قارچ موثر نمی باشند و علاوه بر فشار مکانیکی، ترشحات آنزیمی هم در این فرایند موثر هستند (ونگ و دبلیو-جونز[4]، ۱۹۹۵). تجزیه دیواره های سلولی گیاه توسط بیمارگر، در نتیجه ترشح آنزیم های پلی گالاکتوروناز و سلولاز صورت می گیرد. فعالیت پلی گالاکتوروناز‌ها باتوسعه میسلیوم بین سلولی قارچ و ارتباط نزدیک آن با دیواره سلولی در کورتکس ارتباط مستقیم دارد (ویلر[5]، ۱۹۷۵). دو نوع آنزیم بتا- ۱و۴ اندوگلوکاناز (سلولاز) egl_1 و egl_2 در قارچ ماکروفومینا شناسایی شده است (ونگ و دبلیو.جونز، ۱۹۹۵). ارتباط دقیق بین این ژن ها با بیماریزائی جدایه های قارچ بطور کامل بررسی نشده است. به منظور تدوین و اجرای برنامه های بهنژادی، شناخت ساختار جمعیت عامل بیماریزا، آگاهی از جنبه های مختلف مقاومت و دقت و سهولت ارزیابی مقاومت از اهمیت ویژه ای برخوردار است.

شناخت تنوع مورفولوژیکی و بیماریزائی بالای موجود در بین جدایه های مختلف قارچ، امکان افزایش موفقیت در برنامه معرفی ژنوتیپ های میزبان مقاوم به بیماری را افزایش می دهد.

---

[1] Siddique and Mahmood
[2] Todd
[3] Reyes-Franco
[4] Wang and W. Jones
[5] Wheeler

برهمکنش گیاه با بیمارگر در سطح میکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفته است. این بررسی نحوه گسترش بیماری در گیاه را مشخص می کند و اطلاعات مناسبی از روند پیشرفت بیماری در اختیار ما قرار می دهد.

پژوهشی که در پیش رو دارید با اهداف زیر به اجرا در آمده است.

۱. اختلاف بین ارقام مقاوم و حساس از نظر نحوه پیشروی بیمارگر در گیاه در سطح میکروسکوپی بررسی شد.
۲. تنوع بیماریزائی و مورفولوژیک موجود در بین جدایه های مختلف قارچ و ارتباط آن با بیماریزائی بررسی شد.
۳. تنوع جدایه ها روی محیط کشت حاوی کلرات پتاسیم و ارتباط آن با بیماریزائی بررسی شد.
۴. کارائی و اعتماد برخی از روش‌های بررسی مقاومت ژنوتیپ های سویا به منظور انتخاب مناسب ترین و مطمئن ترین روش برای ارزیابی مقاومت ژنوتیپ های مختلف سویا به بیمارگر با یکدیگر مقایسه شدند.
۵. مقاومت نسبی تعدادی از ژنوتیپ های سویا نسبت به بیماری پوسیدگی ذغالی بررسی شد.
۶. تخصص یافتگی میزبانی قارچ ماکروفومینا در آفتابگردان و کنجد بررسی شد.
۷. وجود ژن اندوگلوکاناز در جدایه های مختلف قارچ و ارتباط بیماریزائی با این ژن بررسی شد.
۸. تاثیر نوع میزبان و منطقه جغرافیائی در ترکیب هیف های جدایه های مختلف و امکان تشکیل جدایه های جدید بررسی شد.

فصل اول

بررسی منابع

۱- بررسی منابع

۱-۱-تاریخچه و منشا سویا

سویا *Glycine max* (L.) Merrill، یا لوبیای روغنی، از نباتات قدیمی و بومی آسیا است که در سال ۲۸۳۸ قبل از میلاد در چین شناخته شد و کشت آن متداول گردید. در طول هزاران سال، سویا به عنوان یک منبع غذائی، خوراک دام و دارو برای درمان تعدادی از بیماری های انسانی استفاده شده است. زراعت سویا به تدریج از کشور چین به کره، ژاپن و سراسر آسیای جنوب شرقی کشیده شد تا اینکه در اواخر قرن نوزدهم به آمریکا راه یافت (سینکلر و بکمن[1]، ۱۹۸۹) .

در سال ۱۳۱۰ و ۱۳۱۶ چند رقم از ارقام سویا به وسیله مهندس مهدوی رئیس وقت دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران از چین به ایران آورده شد و مورد آزمایش قرار گرفت. همچنین در طی سال های ۱۳۱۸ و ۱۳۱۹ ارقام مختلفی از آلمان وارد کشور شد و در مرکز تحقیقات اصلاح و تهیه نهال وبذر کرج کشت شد (مجتهدی، ۱۳۵۰). در سال ۱۳۴۲ شرکت توسعه کشت دانه های روغنی اقدام به گسترش کشت این محصول و انعقاد قرارداد با کشاورزان نمود و از آن سال به بعد، کشت این محصول به طور گسترده در کشور شروع شد.

۱-۲-مشخصات مورفولوژیکی و گیاه شناسی سویا

سویا [*Glycine max* (L.) Merrill]گیاهی یک ساله، دولپه ای و علفی از خانواده بقولات (Fabaceae) است، که به دو صورت دانه ای و علوفه ای کشت می شود.

ریشه سویا مستقیم و دارای انشعاب زیاد است. ریشه عمودی سویا دارای طولی در حدود ۱/۵ متر می باشد. ریشه های فرعی سویا تا عمق حدود ۴۰ سانتی متری خاک پراکنده می شوند، اما در شرایط ایران ریشه در عمق ۳۰ سانتی متر خاک پراکنده است. حجم عمده ریشه های سویا در عمق کمتر از ۶۰ سانتی متری خاک پراکنش می یابد. رشد ریشه در مرحله رویشی سریع‌تر از رشد قسمت‌های هوائی گیاه است ولی وزن خشک ریشه کمتر از اندام‌های هوایی است. روی ریشه سویا بعد از تشکیل ریشه های موئین، گرهک ها و یا غده هائی تشکیل می شود که حاوی کلنی های باکتری تثبیت کننده ازت *Rhizobium japonicum* است. رشد ریشه تا زمان تشکیل دانه

[1] Sinclair and Backman