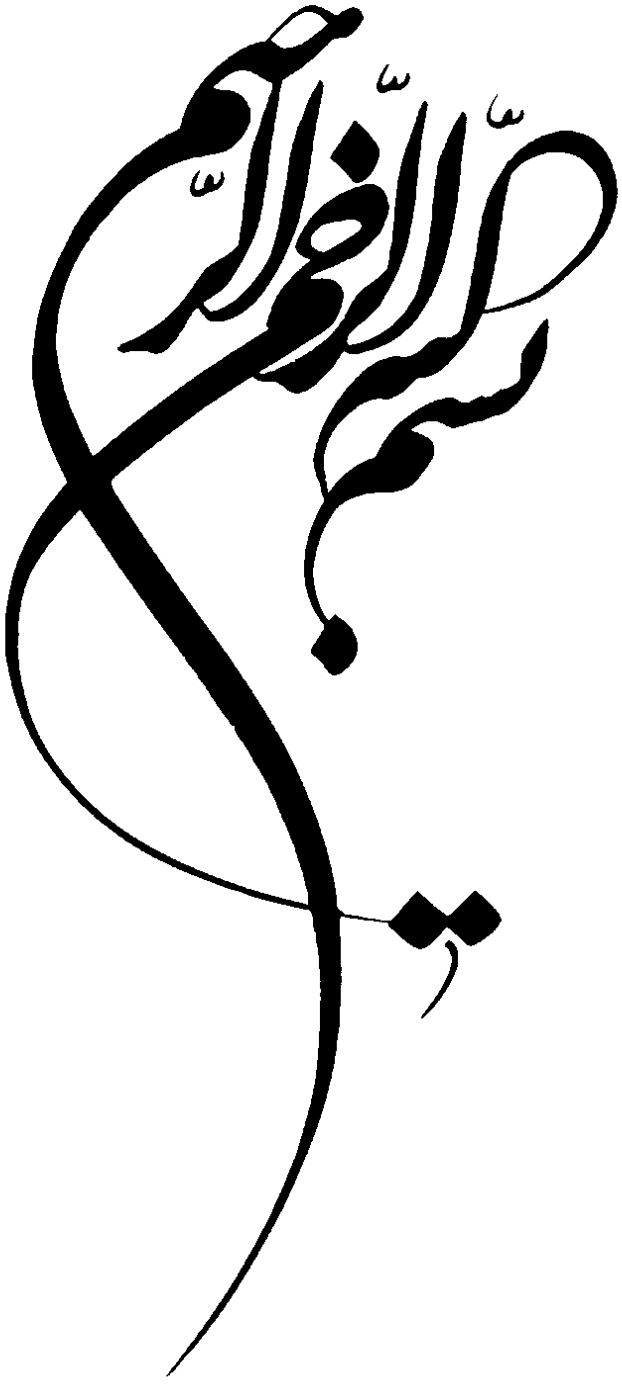

بسم الله الرحمن الرحیم

مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته بیماری شناسی گیاهی

شناسایی عوامل قارچی بوته‌میری گیاهان جالیزی منطقه سیستان و مبارزه با آن‌ها با استفاده از آنتاگونیست‌های منطقه ریزوسفر این گیاهان

استاد راهنما
دکتر ناصر پنجه که

استادان مشاور
دکتر محمد سالاری
دکتر مرتضی قربانی

نگارش
محبوبه نوری
بهمن ماه۱۳۹۱

تقدیم به او

که معنای زندگیم شد و باعث آرامشم...

با بودنش خیالم راحت است که از پس بلندترین دیوارهای سفید دنیا هم می شود روزنی جست برای تماشای زیباترین ضیافت مهتاب...

و تقدیم به دستان پر مهر مادر و پدرم

که تمام خوبی های جهان در دستان مهربانشان شکل میگیرد...

برای:

رهنمودهای پر امیدشان که جان می بخشند خشت های خام زندگی ام را

به:

چشمانشان، که خسته اند اما پر امید... امید به من... که نهراسم از زندگی... دلیلی بودند برای آنچه که امروز از زندگی می خواهم.

محبوبه

سپاسگزاری

حمد و سپاس یگانه نگارنده کتاب هستی را که با الطاف بیکرانش این توفیق را ارزانی ام داشت تا بتوانم در راه ارتقای دانش خویش گامی بردارم. نگاشتن این رساله داعیه شناخت علم نیست، بلکه نشانه دوست داشتن آن است. در هدف پرستش زیبایی به سوی کمال بهتر دیدم که در تار و پود علم به جستجویش باشم.

اکنون که مجال سپاسگزاری فراهم شده به رسم ادب مراتب تقدیر خویش را نثار همه عزیزانی می کنم که در این مسیر همراه لحظاتم بودند و از خداوند متعال کمال بهروزی و موفقیت برای ایشان خواستارم.

از **جناب آقای دکتر ناصر بیجه** که استاد راهنمای پایان نامه ام، که راهنمایی ها و ارشاد ایشان از ابتدای این دوره شامل حال من بوده و در تمام مراحل از حمایت های ایشان بهره مند بوده ام، سپاسگزارم. از اساتید مشاور پایان نامه ام، **جناب آقای دکتر محمد سالاری و جناب آقای دکتر مرتضی قربانی**، به خاطر مساعدت ها و راهنمائی هایشان کمال تشکر را دارم. از جناب آقای دکتر سید کاظم صباغ داور محترم پایان نامه و جناب آقای دکتر عباس خانی نماینده محترم تحصیلات تکمیلی کمال تشکر را دارم.

و شاکرم خدایی را که نشانم داد این روزها... این حوالی ها... هنوز هستند کسانی که تکه های دل را به هم میدوزند، تنها برای خدا... نه برای مال دنیایش. بدینوسیله صمیمانه ترین سپاس خود را به **جناب آقای مهندس ابوالقاسم قاسمی**، عرضه میدارم. بی شک بدون همراهی این عزیز هیچگاه این تحقیق به سرانجام نمی رسید. و نیز صمیمانه از **جناب آقای مهندس الیاس آرزمجو** که دلسوزانه در بحبوبه مشکلات به یاری ام شتافتند، سپاسگزارم.

همچنین به رسم ادب خود را ملزم می دانم که با تواضع تام و از صمیم قلب تشکر و سپاس خالصانه خود را از اساتید گرانقدر **جناب آقایان دکتر مصطفی درویش نیا و دکتر حمید روحانی** برای همکاری صمیمانه شان، عرضه دارم.

اکنون که به مدد الهی به این مرحله از کسب دانش دست یافته ام، شایسته است قدردان وجود گوهرانی مهربان، پدر و مادرم، آنانی که در تمام این دوران زیر چتر مهربانی و حمایت هایشان گام برداشتم، باشم. همچنین سپاس می گویم همه بودن ها، همراهی ها و همدلی های خانواده عزیزم را که در تمام این مدت قدم به قدم تنهایم نگذاشتند و مشوقان من در این راه بودند، برای تمام روزهایی که گذشت و

به پاس تحمل تمام دغدغه ها و نگرانی هایم. مرا یارای سپاس از زحماتشان نیست، مگر آرزوی شکوفا شدن لحظه به لحظه ی غنچه های خوشبختی شان.

در پایان از دوستان عزیزم خانم ها مرضیه حداد، فاطمه خسروی، حلیه حسینی، سپیده بیک طاش، مریم رمضانی، زینب ولیزاده، معصومه وطن خواه، آرزو عزیزیان، ملیکا کمالی، پریسا شرف خواه و آقایان هادی شیرزاد، سید یوسف بهروز، امیر صابریان، پیام محمودی، آزاد لاوا و شاهو ولیزاده و تمامی دوستانی که طی این مدت با شکیبایی تمام از ابراز محبت و همکاری دریغ ننموده اند و به عناوین مختلف یار و یاورم بودند، برای مهربانیشان و به یاد خاطرات خوبی که با این عزیزان در صفحه زندگیم رقم خورد، سپاسگزارم.

این پروژه در آزمایشگاه بیماری شناسی گروه گیاه پزشکی انجام گرفته و مجریان این تحقیق مراتب سپاسگزاری خود را از مسئول محترم آزمایشگاه سرکار خانم مهندس شیرین نخعی مقدم ابراز می دارند.

محبوبه نوری

چکیده

خربزه در اکثر مناطق ایران کشت می‌شوند. از بیماری‌های خاکزاد و مخرب این گیاه، بیماری بوته‌میری است. بوته‌میری یک اصطلاح عمومی است که برای گروهی از بیماری‌هایی با علائم مشابه ولی عامل ایجاد کننده متفاوت به کار می‌رود. روش‌های مختلفی برای کاهش خسارت این بیمارگرها بکار گرفته شده‌اند. علاوه بر استراتژی‌های مدیریت کشت، تحقیقات بیشتر برای استفاده از عوامل بیوکنترل جهت کنترل بوته‌میری درکدوئیان و دیگر محصولات می‌باشد. این تحقیق به منظور شناسایی قارچ‌های عامل بوته‌میری خربزه در سیستان و جداسازی عوامل آنتاگونیست کنترل کننده این قارچ‌ها، در سال زراعی ۹۰-۹۱ صورت گرفت. نمونه‌های مشکوک به بوته‌میری به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها ابتدا با آب شستشو داده شدند، سپس از حد فاصل بافت سالم و آلوده قطعات ۱ سانتی‌متری جدا گردید و پس از ضدعفونی سطحی با محلول ۱ درصد هیپوکلریت سدیم به مدت ۱ تا ۳ دقیقه، روی محیط کشت PDA کشت داده شدند و در شرایط استاندارد نگهداری شدند. پرگنه‌های قارچ‌ها به روش نوک ریسه خالص شده و با استفاده از کلیدهای شناسایی تا سطح گونه شناسایی گردیدند. سپس آزمون اثبات بیماری‌زایی انجام شد. در این تحقیق، قارچ‌های *Rhizoctonia solani*، *Macrophomina phaseolina*، *Monosporascus cannonballus*، *Fusarium proliferatum* و *Fusarium solani* به عنوان عوامل بوته‌میری خربزه در سیستان شناسایی شدند وگونه‌های *F. proliferatum* و *F. solani* برای اولین بار به عنوان عامل بوته‌میری خربزه از روی جالیز در منطقه سیستان جداسازی گردید. در مرحله دوم نمونه‌های ریزوسفر گیاه خربزه سالم و آلوده جمع آوری شد و با کشت نمونه‌های خاک روی محیط آگار غذایی و محیط مک فادن و ساتِن به ترتیب، گونه‌های باکتری باسیلوس و قارچ تریکودرما جداسازی گردید. در مرحله سوم اثرات آنتاگونیستی *Trichoderma harzianum* و جدایه‌هایی از *Bacillus subtilis* و *Bacillus tequilensis* روی رشد میسلیوم قارچ‌های عامل بیماری در آزمایشگاه به روش کشت متقابل بررسی گردید. همچنین توانایی دو جدایه‌ی *B. subtilis* و یک جدایه‌ی *T. harzianum* برای کاهش شیوع پوسیدگی ریشه و ساقه خربزه در گلخانه بررسی گردید. آزمایش در قالب طرح بلوک کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده با استفاده از نرم افزار SAS انجام شد و مقایسه میانگین صفات با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ صورت گرفت. نتایج آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد که در تیمار خاک با *T. harzianum* شدت بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گیاهان خربزه آلوده شده با *R. solani*، *F. proliferatum*، *F. solani*، *M. phaseolina* و *M. cannonballus* به ترتیب به میزان ۱۸/۳، ۴۲، ۳۰/۳، ۱۸/۳ و ۲۰ درصد و در تیمار خاک با *B. subtilis* B_1 و *B. subtilis* B_8 آلوده شده با *R. solani*، *F. proliferatum*، *F. solani*، *M. phaseolina* و *M. cannonballus* به ترتیب به میزان ۰، ۱/۶، ۲۹، ۳۴/۷، ۱۷، ۲۶/۳، ۲۰، ۲۱/۶، ۱۳/۳ و ۱۶/۶ درصد نسبت به شاهد آلوده کاهش یافت. در این بررسی جدایه‌های باکتری نتوانستند بوته‌میری ایجاد شده توسط *R. solani* را کاهش دهند.

کلمات کلیدی: آنتاگونیست، بوته‌میری، خربزه، گیاهان جالیزی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه ۲

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱- خربزه ۷

۲-۱-۱- تاریخچه و اهمیت خربزه ۷

۲-۱-۲- اکولوژی و مشخصات کشاورزی ۷

۲-۱-۳- سطح زیر کشت خربزه ۸

۲-۱-۴- اهمیت کشت خربزه در سیستان ۸

۲-۲- بیماری بوته‌میری خربزه ۹

۲-۳- مشخصات برخی از قارچ‌های عامل بیماری بوته‌میری ۱۱

۲-۳-۱- بوته‌میری ناشی از *Rhizoctonia* ۱۱

۲-۳-۱-۱- تاریخچه و اهمیت بیماری ۱۱

۲-۳-۱-۲- جایگاه تاکسونومیکی *Rhizoctoia* ۱۲

۲-۳-۱-۳- مرفولوژی *Rhizoctonia* ۱۲

۲-۳-۲- بیماری پژمردگی فوزاریومی ۱۳

۲-۳-۲-۱- علائم و نشانه‌های بیماری ۱۳

۲-۳-۲-۲- اپیدمیولوژی و زیست شناسی *Fusarium* ۱۴

۲-۳-۳- بیماری پوسیدگی زغالی خربزه ۱۵

۲-۳-۳-۱- جایگاه تاکسونومیکی قارچ عامل بیماری ۱۵

۲-۳-۳-۲- مرفولوژی قارچ عامل بیماری ۱۶

۲-۳-۳-۳- اپیدمیولوژی بیماری ۱۷

۲-۳-۴- بیماری پوسیدگی ریشه و زوال بوته‌های خربزه ۱۷

۲-۳-۴-۱- تاریخچه و اهمیت بیماری ۱۸

۲-۳-۴-۲- جایگاه تاکسونومیکی قارچ عامل بیماری ۱۹

۲-۳-۴-۳- چرخه بیماری ۱۹

۲-۳-۴-۴- مرفولوژی قارچ عامل بیماری ۱۹

۲-۳-۴-۵- بیولوژی بیماری ۲۰

۲-۳-۴-۶- اپیدمیولوژی بیماری ۲۱

۲-۴-کنترل بیولوژیک ۲۱

۲-۴-۱- مفاهیم و مکانیسم‌های کنترل بیولوژیک بیماری‌های گیاهی ۲۳

۲-۵- کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری بوته‌میری با عوامل آنتاگونیست ۲۵

۲-۵-۱- کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری بوته‌میری با باکتری‌های آنتاگونیست ۲۵

۲-۵-۱-۱- کنترل بیولوژیکی *Rhizoctonia solani* با باکتری‌های آنتاگونیست ۲۵

۲-۵-۱-۲- کنترل بیولوژیکی *Fusarium* sp با باکتری‌های آنتاگونیست ۲۵

۳-۱-۵-۲- کنترل بیولوژیکی *Macrophomina phaseolina* با باکتری‌های آنتاگونیست ۲۶
۴-۱-۵-۲- کنترل بیولوژیکی *Monosporascus cannonballus* با باکتری‌های آنتاگونیست ۲۷
۲-۵-۲- کنترل بیولوژیک عوامل بیماری با قارچ‌های آنتاگونیست ۲۷
۱-۲-۵-۲- کنترل بیولوژیکی *Rhizoctonia solani* با قارچ‌های آنتاگونیست ۲۷
۲-۲-۵-۲- کنترل بیولوژیکی *Fusarium* sp با قارچ‌های آنتاگونیست ۲۸
۳-۲-۵-۲- کنترل بیولوژیکی *Macrophomina phaseolina* با قارچ‌های آنتاگونیست ۲۸
۴-۲-۵-۲- کنترل بیولوژیکی *Monosporascus canoonballus* با قارچ‌های آنتاگونیست ۲۹
فصل سوم: مواد و روش‌ها
۱-۳- نمونه‌برداری از بوته‌های آلوده به بیماری بوته‌میری خربزه ۳۱
۱-۱-۳- جداسازی عوامل بیماریزای قارچی از طوقه و ریشه ۳۱
۲-۳- خالص سازی و شناسایی قارچ‌ها ۳۱
۱-۱-۲-۳- تعین ویژگی‌های پرگنه ۳۲
۲-۱-۲-۳- تعیین قطر ریسه و تعداد هسته ۳۲
۲-۲-۳- خالص سازی و شناسایی گونه‌های *Fusarium* ۳۳
۳-۲-۳- خالص سازی و شناسایی *Macrophomina* ۳۴
۱-۳-۲-۳- تعیین ویژگی‌های پرگنه ۳۵
۲-۳-۲-۳- بررسی تولید پکنیدیوم ۳۵
۴-۲-۳- خالص سازی و شناسایی قارچ *Monosporascus* ۳۵
۳-۳- نگهداری نمونه‌ها ۳۶
۱-۳-۳- نگهداری کوتاه مدت ۳۶
۲-۳-۳- نگهداری طولانی مدت ۳۶
۱-۲-۳-۳- نگهداری *Rhizoctonia solani* ۳۶
الف) نگهداری زیر پارافین مایع ۳۶
ب) نگهداری زیر آب مقطر ۳۷
۲-۲-۳-۳- نگهداری *Fusarium* sp ۳۷
الف) نگهداری جدایه¬ها در لوله¬های حاوی مخلوط ماسه، پرلیت و کلش ۳۷
ب) نگهداری جدایه¬های قارچ روی کاغذ صافی سترون ۳۸
ج) نگهداری در محیط کشت Sucarose Nutrient Agar (SNA) ۳۸
۳-۲-۳-۳- نگهداری *Macrophomina phaseolina* ۳۹
۴-۲-۳-۳- نگهداری *Monosporascus cannonballus* ۳۹
۴-۳- اثبات بیماری‌زایی ۴۰
۱-۴-۳- اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های *Rhizoctoia solani* ۴۰
۲-۴-۳- اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Fusarium* sp ۴۱
۳-۴-۳- اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های *Macrophomina phaseolina* ۴۲
۴-۴-۳- اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های *Monosporascus cannonballus* ۴۳
۵-۳- جداسازی میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست ۴۴

۱-۵-۳- جداسازی و خالص سازی باکتری‌های آنتاگونیست ۴۴
۱-۱-۵-۳- جداسازی باکتری‌ها از خاک ۴۵
۲-۱-۵-۳- جداسازی باکتری‌ها از طوقه و ریشه ۴۵
۲-۵-۳- جداسازی قارچ‌های آنتاگونیست ۴۶
۱-۲-۵-۳- شناسایی جدایه‌ی تریکودرما ۴۷
۶-۳- بررسی اثر آنتاگونیستی عوامل قارچی و باکتریایی ریزوسفر در آزمایشگاه ۴۷
۱-۶-۳- انتخاب مقدماتی جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست ۴۷
۲-۶-۳- ارزیابی اثرات آنتاگونیستی عوامل باکتریایی ۴۷
۳-۶-۳- ارزیابی اثرات آنتاگونیستی عوامل قارچی ۴۸
۷-۳- بررسی اثر آنتاگونیستی عوامل قارچی و باکتریایی ریزوسفر در گلخانه ۴۹
۱-۷-۳- آماده سازی مایه تلقیح ۴۹
۱-۱-۷-۳- مایه تلقیح عوامل بیماری‌زا ۴۹
۲-۱-۷-۳- آماده سازی مایه تلقیح جدایه‌های باکتریایی ۵۰
۳-۱-۷-۳- تهیه مایه تلقیح قارچ *Trichoderma* ۵۰
۲-۷-۳- بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در پیشگیری از بوته‌میری خربزه ۵۱
۱-۲-۷-۳- بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در پیشگیری از بوته‌میری ناشی از *Rhizoctonia solani* ۵۱
۲-۲-۷-۳- بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در پیشگیری از بوته‌میری ناشی ازگونه‌های *Fusarium* ۵۲
۳-۲-۷-۳- بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در پیشگیری از بوته‌میری ناشی از *Macrophomina phaseolina* ۵۳
۴-۲-۷-۳- بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در پیشگیری از بوته‌میری ناشی از *Monosporascus cannonballus* ۵۳
۳-۷-۳- بررسی اثر قارچ تریکودرما در پیشگیری از بوته‌میری خربزه ۵۴
۱-۳-۷-۳- بررسی اثر قارچ تریکودرما در پیشگیری از بوته‌میری ناشی از *Rhizoctonia solani* ۵۴
۲-۳-۷-۳- بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در پیشگیری از بوته‌میری ناشی ازگونه‌های *Fusarium* ۵۵
۳-۳-۷-۳- بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در پیشگیری از بوته‌میری ناشی از *Macrophomina phaseolina* ۵۵
۴-۳-۷-۳- بررسی اثر باکتری‌های آنتاگونیست در پیشگیری از بوته‌میری ناشی از *Monosporascus cannonballus* ۵۵
۸-۳- شناسایی باکتری¬های آنتاگونیست ۵۶
۱-۸-۳- شناسایی باکتری¬های آنتاگونیست بر اساس آزمون بیوشیمیایی ۵۶
۱-۱-۸-۳- واکنش گرم ۵۶
۲-۱-۸-۳- تعیین تحرک باکتری (motility) ۵۶
۳-۱-۸-۳- آزمون اکسیداز ۵۶
۴-۱-۸-۳- آزمون کاتالاز ۵۷
۵-۱-۸-۳- آزمون رشد هوازی و بی هوازی ۵۷
۶-۱-۸-۳- آزمون تولید اندول ۵۷

۳-۸-۱-۷- آزمون هیدرولیز ژلاتین (ژلاتیناز) ۵۷
۳-۸-۱-۸- آزمون هیدرولیز نشاسته ۵۸
۳-۸-۱-۹-آزمون تولید لوان ۵۸
۳-۸-۱-۱۰-آزمون استفاده از قندها، الکل ها، اسیدهای آلی و اسیدهای آمینه ۵۸
۳-۸-۱-۱۱- استفاده از سیترات ۵۹
۳-۸-۱-۱۲- رنگ آمیزی اسپور ۵۹
۳-۸-۲- شناسایی باکتری¬های آنتاگونیست بر اساس تعیین ترتیب توالی DNA ۶۰
۳-۸-۲-۱- استخراج DNA برای انجام PCR ۶۰
۳-۸-۲-۲- آزمون PCR ۶۰
۳-۸-۲-۳- چرخه حرارتی ۶۱
۳-۸-۲-۴-تهیه ژل و انجام الکتروفورز DNA تکثیری ۶۱
۳-۸-۲-۵- تعیین توالی نوکلئوتیدی (Sequencing) برای تعیین جایگاه فیلوژنتیکی ۶۲
۳-۸-۲-۶- آنالیز کامپیوتری توالی¬ها ۶۲
۳-۸-۲-۷- تجزیه و تحلیل نتایج ۶۳
فصل چهارم: نتایج
۴-۱- جدایه‌های قارچ عامل بیماری ۶۵
۴-۲- عوامل شناسایی شده بوته‌میری خربزه در سیستان بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی ۶۸
۴-۲-۱- مشخصات *Rhizoctonia solani* ۶۸
۴-۲-۲- مشخصات *Fusarium proliferatum* ۷۰
۴-۲-۳- مشخصات *Fusarium solani* ۷۲
۴-۲-۴- مشخصات *Macrophomina phaseolina* ۷۴
۴-۲-۵- مشخصات *Monosporascus cannonballus* ۷۵
۴-۳- نتایج آزمون بیماری‌زایی ۷۶
۴-۳-۱- بیماری‌زایی جدایه‌های *Rhizoctonia solani* در خربزه ۷۶
۴-۳-۲- اثبات بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *Fusarium spp* در خربزه ۷۷
۴-۳-۳- بیماری‌زایی جدایه‌های *Macrophomina phaseolina* در خربزه ۷۹
۴-۳-۴- بیماری‌زایی جدایه‌های *Monosporascus cannonballus* در خربزه ۸۰
۴-۴- انتخاب میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست ۸۱
۴-۴-۱- انتخاب جدایه‌های باکتریایی آنتاگونیست ۸۱
۴-۴-۲- انتخاب قارچ آنتاگونیست تریکودرما ۸۱
۴-۴-۳- مشخصات جدایه تریکودرما ۸۲
۴-۵- ارزیابی اثر آنتاگونیستی میکروارگانیسم‌های ریزوسفر در آزمایشگاه ۸۳
۴-۵-۱- ارزیابی اثر آنتاگونیستی عوامل باکتریایی ریزوسفر در آزمایشگاه ۸۳
۴-۵-۱-۱- خاصیت بازدارندگی از رشد *Rhizoctonia solani* توسط باکتری‌های آنتاگونیست ۸۳
۴-۵-۱-۲- خاصیت بازدارندگی از رشد *Fusarium proliferatum* توسط باکتری‌های آنتاگونیست ۸۵
۴-۵-۱-۳- خاصیت بازدارندگی از رشد *Fusarium solani* توسط باکتری‌های آنتاگونیست ۸۵

۴-۱-۵-۴- خاصیت بازدارندگی از رشد *Macrophomina phaseolina* توسط باکتری‌های آنتاگونیست ۸۶
۵-۱-۵-۴- خاصیت بازدارندگی از رشد *Monosporascus cannonballus* توسط باکتری‌های آنتاگونیست..... **۸۷**
۲-۵-۴- خواص بازدارندگی آنتاگونیست‌های قارچی ریزوسفر از رشد عوامل بوته‌میری در آزمایشگاه ۸۸
۶-۴- اثر آنتاگونیستی میکروارگانیسم‌های ریزوسفر روی عوامل بوته‌میری خربزه در گلخانه ۹۱
۱-۶-۴- تأثیر بازدارندگی جدایه‌های *Bacillus* sp در جلوگیری از بوته‌میری خربزه در گلخانه ۹۱
۱-۱-۶-۴- تأثیر بازدارنگی جدایه‌های *Bacillus* sp در جلوگیری از بوته‌میری ناشی از *Rhizoctonia solani* در گلخانه ۹۱
۲-۱-۶-۴- تأثیر بازدارنگی جدایه‌های *Bacillus* sp در جلوگیری از بوته‌میری ناشی از *Fusarium proliferatum* در گلخانه..... ۹۲
۳-۱-۶-۴- تأثیر بازدارنگی جدایه‌های *Bacillus* sp در جلوگیری از بوته‌میری ناشی از *Fusarium solani* در گلخانه ۹۳
۴-۱-۶-۴- تأثیر بازدارنگی جدایه‌های *Bacillus* sp در جلوگیری از بوته‌میری ناشی از *Macrophomina phaseolina* در گلخانه..... ۹۵
۵-۱-۶-۴- تأثیر بازدارنگی جدایه‌های *Bacillus* sp در جلوگیری از بوته‌میری ناشی از *Monosporascus cannonballus* در گلخانه ۹۶
۲-۶-۴- تأثیر بازدارندگی جدایه‌ی *Trichoderma harzianum* در جلوگیری از بوته‌میری خربزه در گلخانه ۹۸
۷-۴- شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست باکتریایی ۱۰۰
۵- فصل پنجم: بحث
۱-۵- عوامل بیماری‌زا..... ۱۰۵
۲-۵- تأثیر عوامل آنتاگونیست جداسازی شده از ریزوسفر خربزه در آمایشگاه..... ۱۰۶
۳-۵- اثر انتاگونیست‌های جداسازی شده از منطقه ریزوسفر خربزه روی عوامل بوته‌میری خربزه در گلخانه ۱۰۸
۴-۵- پیشنهادات..... ۱۰۹
منابع و مآخذ ۱۱۲

فهرست شکل‌ها

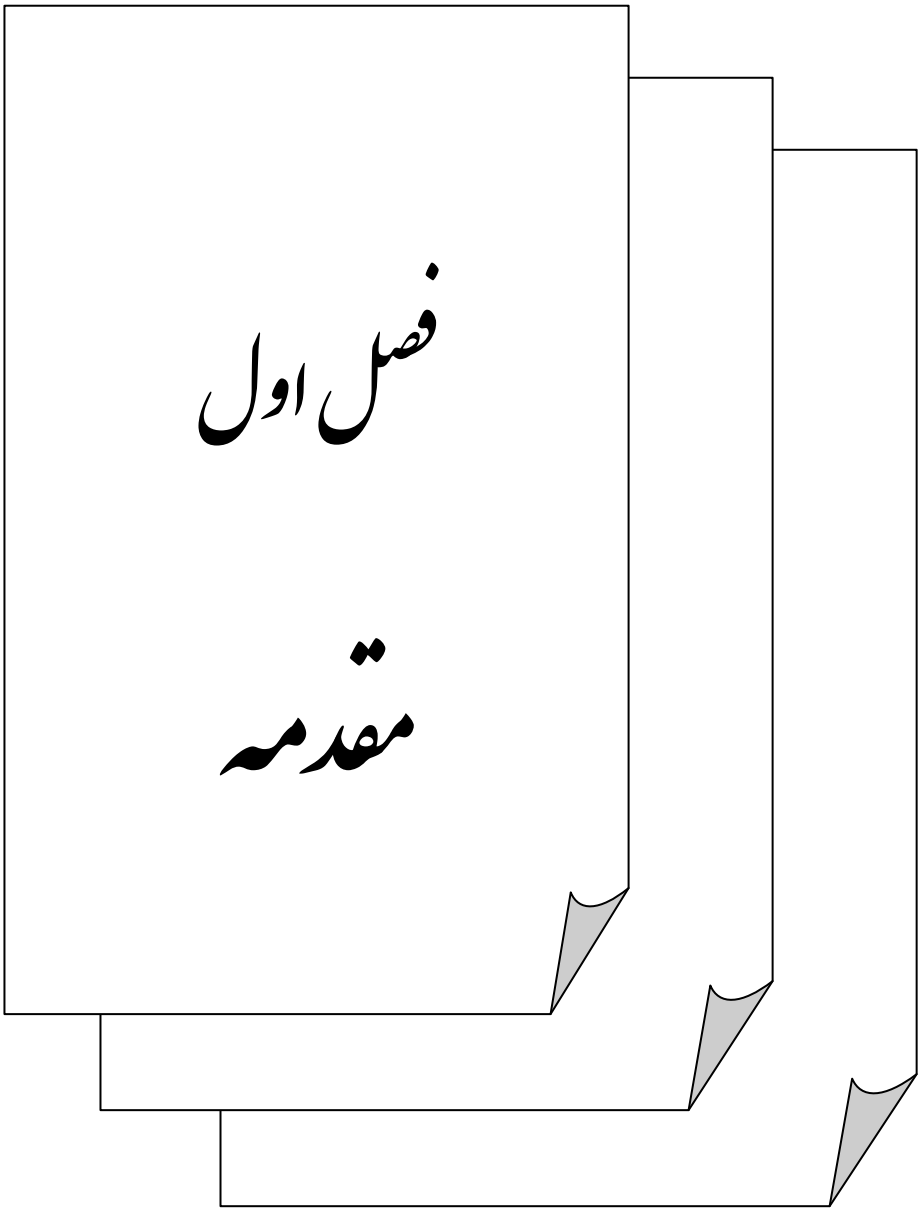
شکل.....صفحه

شکل ۱-۱- نمای کلی ریزوسفر و تعاملات موجود بین عوامل بیوکنترلی PGPR، گیاهان، بیمارگرها و خاک ۵
شکل ۱-۲- علائم ایجاد شده توسط *Monosporascus cannonballus* در مزرعه..... ۱۸
شکل ۲-۲- چرخه زندگی پوسیدگی ریشه توسط *Monosporascus* ۱۹
شکل ۱-۴- زردی عمومی در برگ‌های خربزه در اثر بیماری بوته‌میری ۶۵
شکل ۲-۴- علائم خسارت به ریشه و طوقه خربزه در بیماری بوته‌میری ۶۵
شکل ۳-۴: پرگنه و هیف‌های *Rhiaoctonia solani*.....۶۹
شکل ۴-۴: کلنی و اسپور¬های غیر¬جنسی *Fusarium proliferatum* ۷۱
شکل ۵-۴: پرگنه و اسپور¬های غیر¬جنسی *Fusarium solani*..... ۷۳
شکل ۶-۴: قارچ *Macrophomina phaseolina*..... ۷۴
شکل ۷-۴: پرگنه و تولید مثل جنسی *Monosporascus cannonballus*..... ۷۵
شکل ۸-۴: گیاهچه¬های آلوده تلقیح شده با جدایه¬ی *Rhizoctonia solani* و گیاهچه شاهد..... ۷۷
شکل ۹-۴: گیاهچه¬های آلوده تلقیح شده با جدایه¬های *Fusarium proliferatum* و *Fusarium solani* وگیاهچه¬های شاهد..... ۷۸
شکل ۱۰-۴: گیاهچه¬های آلوده تلقیح شده با جدایه¬ی *Macrophomina phaseolina* و گیاهچه شاهد..... ۷۹
شکل ۱۱-۴: گیاهچه¬های آلوده تلقیح شده با جدایه¬ی *Monosporascus cannonballus* و گیاهچه شاهد... ۸۰
شکل۱۲-۴: جداسازی باکتری آنتاگونیست ۸۱
شکل ۱۳-۴- قارچ *Trichoderma harzianum*..... ۸۲
شکل ۱۴-۴: اثر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ *Rhizoctonia solani* نسبت به شاهد در بررسی کشت متقابل با ۱۰ جدایه¬ی باکتری آنتاگونیست..... ۸۳
شکل ۱۵-۴: اثر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ *Fusarum proliferatum* نسبت به شاهد در بررسی کشت متقابل با ۱۰ جدایه¬ی باکتری آنتاگونیست..... ۸۵
شکل ۱۶-۴: اثر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ *Fusarium solani* نسبت به شاهد در بررسی کشت متقابل با ۱۰ جدایه¬ی باکتری آنتاگونیست.....۸۶
شکل ۱۷-۴: اثر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ *Macrophomina phaseolina* نسبت به شاهد در بررسی کشت متقابل با ۱۰ جدایه¬ی باکتری آنتاگونیست..... ۸۷
شکل ۱۸-۴- اثر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ *Monosporascus cannonballus* نسبت به شاهد در بررسی کشت متقابل با ۱۰ جدایه¬ی باکتری آنتاگونیست..... ۸۸
شکل ۱۹-۴- تأثیر *Trichoderma harzianum* در جلوگیری از رشد میسلیوم *Rhizoctonia solani* در روزهای مختلف بعد از کشت..... ۸۹
شکل ۲۰-۴- تأثیر *Trichoderma harzianum* در جلوگیری از رشد میسلیوم *Fusarium proliferatum* در روزهای مختلف بعد از کشت..... ۸۹
شکل ۲۱ -۴- تأثیر *Trichoderma harzianum* در جلوگیری از رشد میسلیوم *Fusarium solani* در روزهای مختلف بعد از کشت..... ۹۰

شکل ۲۲-۴- تأثیر *Trichoderma harzianum* در جلوگیری از رشد میسلیوم *Macrophomina phaseolina* در روزهای مختلف بعد از کشت ۹۰
شکل ۲۳-۴- تأثیر *Trichoderma harzianum* در جلوگیری از رشد میسلیوم *Monosporascus cannonballus* در روزهای مختلف بعد از کشت ۹۱
شکل ۲۴-۴- تأثیر *Bacillus* sp (B_1) بر شدت بوته¬میری ناشی از *Fusarium prolieratum* نسبت به شاهد سالم و آلوده در روش تیمار خاک ۹۳
شکل ۲۵-۴- تأثیر *Bacillus* sp (B_8) بر شدت بوته¬میری ناشی از *Fusarium prolieratum* نسبت به شاهد سالم و آلوده در روش تیمار خاک ۹۳
شکل ۲۶-۴- تأثیر *Bacillus* sp (B_8) بر شدت بوته¬میری ناشی از *Fusarium solani* نسبت به شاهد سالم و آلوده در روش تیمار خاک ۹۴
شکل ۲۷-۴- تأثیر *Bacillus* sp (B_1) بر شدت بوته¬میری ناشی از *Fusarium solani* نسبت به شاهد سالم و آلوده در روش تیمار خاک ۹۴
شکل ۲۸-۴- تأثیر *Bacillus* sp (B_8) بر شدت بوته¬میری ناشی از *Macrophomina phaseolina* نسبت به شاهد سالم و آلوده در روش تیمار خاک ۹۵
شکل ۲۹-۴- تأثیر *Bacillus* sp (B_1) بر شدت بوته¬میری ناشی از *Macrophomina phaseolina* نسبت به شاهد سالم و آلوده در روش تیمار خاک ۹۶
شکل ۳۰-۴- تأثیر *Bacillus* sp (B_8) بر شدت بوته¬میری ناشی از *Monosporascus cannonballus* نسبت به شاهد سالم و آلوده در روش تیمار خاک ۹۷
شکل ۳۱-۴- شکل ۳۱-۴- تأثیر *Trichoderma harzianum* بر شدت بوته‌میری ناشی از *Fusarium prolieratum* نسبت به شاهد سالم و آلوده در روش تیمار خاک ۹۹
شکل ۳۲-۴- تأثیر *Trichoderma harzianum* بر شدت بوته¬میری ناشی از *Fusarium solani* نسبت به شاهد سالم و آلوده در روش تیمار خاک ۹۹
شکل ۳۳-۴- تأثیر *Trichoderma harzianum* بر شدت بوته¬میری ناشی از *Macrophomina phaseolina* نسبت به شاهد سالم و آلوده در روش تیمار خاک ۹۹
شکل ۳۴-۴- تأثیر *Trichoderma harzianum* بر شدت بوته¬میری ناشی از *Monosporascus cannonballus* نسبت به شاهد سالم و آلوده در روش تیمار خاک ۹۹
شکل ۳۵-۴- شکل ۳۵-۴- نتایج الکتروفورز محصول PCR جدایه¬های آنتاگونیست در ژل اگاروز ۱/۲ دزصد. ۱۰۱
شکل ۳۶-۴- شکل ۳۶-۴- دندروگرام رسم شده توسط نرم افزار Mega 5 و مقایسه توالی¬های بدست آمده با توالی¬های موجود در بانک ژنی ۱۰۳

فهرست جداول

جدول ۱-۳- مواد لازم در هر واکنش PCR..... ۶۱
جدول ۱-۴- منابع و مناطق نمونه برداری از جالیزکاری¬های سیستان ۶۶
جدول ۲-۴- تجزیه واریانس اثر بازدرندگی ۱۰ باکتری آنتاگونیست از رشد قارچ¬های عامل بوته¬میری خربزه ۸۴
جدول۳-۴- میانگین درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ¬های عامل بیماری نسبت به شاهد در بررسی کشت متقابل با باکتری¬های آنتاگونیست..... ۸۴
جدول۴-۴- درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ¬های عامل بیماری نسبت به شاهد در بررسی کشت متقابل با آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* ۸۸
جدول ۵-۴- میانگین تأثیر جدایه¬های *Bacillus* sp روی شدت آلودگی بوته¬میری ایجاد شده توسط *Rhizoctonia solani*..... ۹۲
جدول ۶-۴- میانگین تأثیر جدایه¬های *Bacillus* sp روی شدت آلودگی بوته¬میری ایجاد شده توسط *Fusarium proliferatum*..... ۹۳
جدول ۷-۴- میانگین تأثیر جدایه¬های *Bacillus* sp روی شدت آلودگی بوته¬میری ایجاد شده توسط *Fusarium solani*..... ۹۴
جدول ۸-۴- میانگین تأثیر جدایه¬های *Bacillus* sp روی شدت آلودگی بوته¬میری ایجاد شده توسط *Macrophomina phaseolina*..... ۹۵
جدول ۹-۴- میانگین تأثیر جدایه¬های *Bacillus* sp روی شدت آلودگی بوته¬میری ایجاد شده توسط *Monosporascus cannonballus*..... ۹۶
جدول ۱۰-۴- تأثیر تیمار خاک با عوامل آنتاگونیست قارچی و باکتریایی روی فاکتورهای رشدی گیاهچه¬های خربزه ۹۷
جدول ۱۱-۴- میانگین تأثیر جدایه¬ی *Trichoderma harzianum* روی شدت آلودگی بوته¬میری ایجاد شده توسط هر یک از عوامل بیماری¬زای بوته¬میری خربزه ۹۸
جدول-۱۲-۴- خصوصیات بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی جدایه‌های *Bacillus* ۱۰۰


فصل اول
مقدمه

خربزه .*Cucumis melo* L از خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) است (مظفریان، ۱۳۸۴). ایران از تولید کنندگان عمده گیاهان جالیزی بویژه خربزه و طالبی می‌باشد. به طوری که سطح زیر کشت محصولات جالیزی در سال زراعی ۸۹-۱۳۸۸ حدود ۳۳۲ هزار هکتار معادل با ۲/۶ درصد سطح زیر کشت محصولات زراعی کشور بود که از این مقدار ۹۲/۵ درصد آن کشت آبی و مابقی به صورت دیم کشت شده است. خربزه ۲۴/۶ درصد از سطح زیر کشت گیاهان جالیزی را، به خود اختصاص داده‌است (آمارنامه کشاورزی، ۸۹-۱۳۸۸). خربزه در اکثر روستاهای سیستان کشت می‌شود، این محصول نقش مهمی در اقتصاد خانواده‌ها دارد و در اواخر بهار و در طول تابستان فراوان‌ترین و پرمصرف‌ترین میوه منطقه است (علی احمدی و همکاران، ۱۳۸۷).

خربزه یکی از گیاهان حساس به بیماری‌ها می‌باشد و از زمان کاشت تا برداشت مورد حمله عوامل بیماری‌زای مختلف قرار می‌گیرد. سفیدک سطحی و سفیدک داخلی از مهم‌ترین بیماری‌های هوازاد این محصول است. بیماری‌های خاکزاد که توسط گونه‌های *Fusarium*، *Phytophtora*، *Macrophomina* و *Pythium* ایجاد می‌شوند، از مهمترین بیماری‌های ریشه‌ای این محصول می‌باشند (اعتباریان، ۱۳۸۵). در سال‌های اخیر، با توجه به تغییرات آب و هوایی به نظر می رسد بیماری‌های دیگری مانند پوسیدگی ریشه و زوال بوته *Monosporascus* نیز در صیفی‌کاری‌های ایران گسترش یافته است (Sarpeleh, 2008).

بوته‌میری یک اصطلاح عمومی است که برای گروهی از بیماری‌های با علائم مشابه ولی عامل ایجاد کننده متفاوت به کار می‌رود (Martyn and Miller, 1996). هنگامی که پاتوژن‌های خاکزاد *Macrophomina*، *Rhizoctonia* و *Fusarium* به ریشه‌ها حمله می‌کنند، جذب مواد غذایی را محدود نموده و باعث تولید بیماری پوسیدگی ریشه و در نتیجه مرگ گیاهان می‌شوند (Dawar *et al*., 2008). بوته‌میری انواع گیاهان جالیزی از جمله خیار،

انواع خربزه، هندوانه و کدو از دیر زمان در ایران و به خصوص در اصفهان و سایر مناطقی که کشت این گیاهان بیشتر معمول بوده شایع بوده است. بنا به گفته ارشاد و مستوفی‌پور (۱۳۴۸)، بوته‌میری یا پوسیدگی ریشه جالیز اولین بار درسال ۱۳۲۳ به وسیله قوام الدین شریف در اصفهان روی خربزه گزارش شده است. بر اساس بررسی‌های صورت گرفته، میزان خسارت این بیماری در ایران اخیراً برآورد نگردیده است و به همان خسارت‌های دهه‌های ۱۳۴۰ و۱۳۵۰ اکتفا گردیده است. در آمار برداری‌های سال ۱۳۵۲، خسارت بیماری را ۲۰ تا ۲۵ درصد محصول تخمین زده‌اند (علوی، ۱۳۵۲). در اصفهان در زراعت‌های بهاره و کرتی خسارت بوته‌میری حتی تا ۱۰۰درصد برآورد شده است (بهداد، ۱۳۵۹).

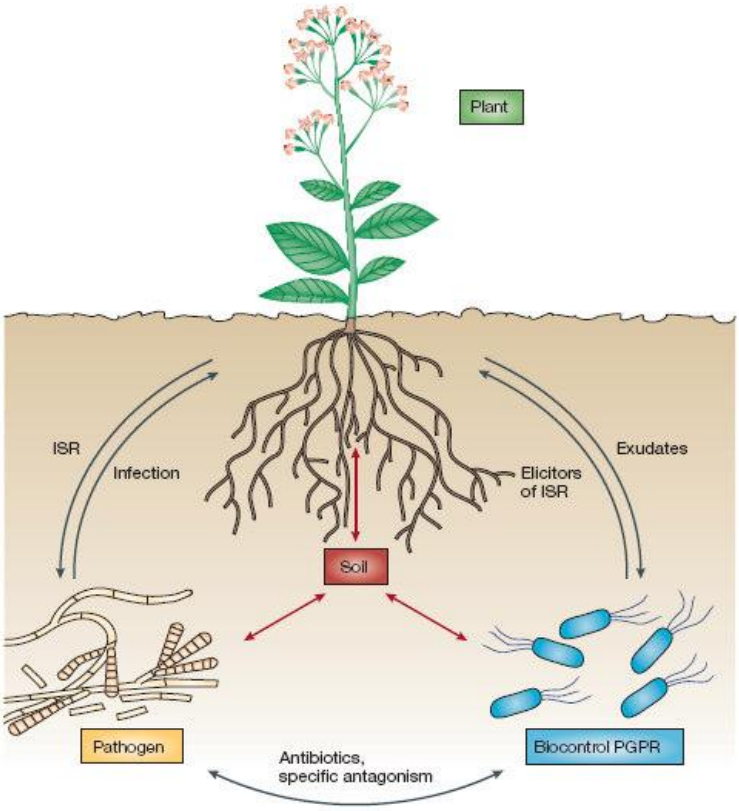
عوامل بیماری‌زای خاکزاد خسارت قابل توجهی به کشاورزی وارد می‌سازند و خاک منبعی برای این عوامل است (Cook, 2000). بیماری‌های خاکزاد از جمله بیماری‌های خطرناک محسوب می‌شوند، زیرا در محیط دور از دید رشد کرده و اندام‌های جذب گیاه را مختل می‌کنند و علائم بیماری پس از گذشت زمان، در قسمت هوایی دیده می‌شود و مبارزه با آن را مشکل می‌سازد (Cook, 2000).

با توجه به اینکه اغلب گیاهان زراعی فاقد مقاومت ژنتیکی و یا مقاومت پلی‌ژنتیک به عوامل بیماری‌زای خاکزی می‌باشند و همچنین قرن‌ها تجربه در استفاده از روش‌های زراعی برای حذف عوامل بیماری‌زای خاکزی از جمله تناوب زراعی، به دلایل اقتصادی توسط کشاورزان استفاده نمی‌گردد و نیز تأثیر اندک روش‌های شیمیایی در کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزی و هزینه‌های اقتصادی آن از یک طرف و همچنین کاهش تأثیر آن‌ها به علت ظهور نژادهای مقاوم به قارچ‌کش‌ها از طرف دیگر، سبب محدودیت کاربرد آن‌ها بخصوص در کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزاد شده است. علاوه بر این، نگرانی‌های زیست محیطی و آلودگی چرخه غذایی به باقیمانده سموم شیمیایی سبب کاهش مصرف سموم شده است. لذا دستیابی به روش‌های سالم و ارزان‌تر به عنوان یک

چالش جدی فرآروی محققان قرار گرفته است (Cook, 2000) و در این میان کنترل بیولوژیکی به عنوان یک رهیافت طبیعی جهت حفظ سلامت گیاهان از جایگاه ویژه‌ای برخوردار می‌باشد (Slininger *et al*., 2000).

امروزه امکان کنترل بیولوژیکی عوامل بیماری‌زای گیاهی با استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست، در کنترل بیماری‌های قارچی و باکتریایی ریشه گیاهان زراعی مورد توجه قرار گرفته‌اند (weller, 1988).

قریب به یک قرن است که هزاران میکروارگانیسم به عنوان عامل بیوکنترل عوامل بیماری‌زای محصولات و مزارع کشاورزی شناسایی شده اند (Slininger *et al*., 2000). میکروارگانیسم‌هایی که در ناحیه ریزوسفر گیاهان زندگی می‌کنند، گزینه مناسبی برای استفاده در روش‌های کنترل بیولوژیکی هستند زیرا ریزوسفر خط مقدم دفاعی ریشه‌ها علیه بیمارگرهای خاکزی می‌باشد (weller, 1988) و موجودات زنده آن ناحیه از نظر کمی و کیفی تحت تأثیر فعالیت‌های ریشه نظیر تنفس و ترشحات ریشه‌ای قرار دارند (Boven and Rovira, 1999). در این ناحیه گروه‌های مختلفی از میکروارگانیسم‌ها یافت می‌شود که ممکن است برای گیاهان میزبان مفید، مضر و یا بی‌ضرر باشند (Benizri *et al*., 1998). باکتری‌های مفید این منطقه که به باکتری‌های ریزوسفری محرک رشد گیاه یا PGPR موسوم هستند، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده‌اند. این باکتری‌ها می‌توانند با استفاده از یک یا چند مکانیسم خاص موجب افزایش رشد گیاه یا کاهش میزان خسارت ناشی از بیمارگرهای خاکزاد شوند (Tomashow *et al*., 1990).



شکل ۱-۱- نمای کلی ریزوسفر و تعاملات موجود بین عوامل بیوکنترلی PGPR، گیاهان، بیمارگرها و خاک (Boven and Rovira, 1999).

در این تحقیق، ضمن بازدید از صیفی‌کاری‌های مناطق مختلف سیستان، اقدام به شناسایی عوامل بیماری‌زای قارچی بیماری بوته‌میری خربزه در منطقه و جداسازی و شناسایی عوامل آنتاگونیستی موجود در ریزوسفر جالیزکاری‌های منطقه شد و کارایی آنتاگونیست‌های طبیعی در کنترل بیولوژیکی بیمارگرها در آزمایشگاه و گلخانه بررسی گردید.

فصل دوم

بررسی منابع