بسم الله الرحمن الرحیم
بهار

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

دانشکده‌ی کشاورزی

گروه گیاه‌پزشکی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد مهندسی کشاورزی

بیماری شناسی گیاهی

مطالعه رابطه بین گروه‌های آناستوموزی، بیماری‌زایی و اختصاصی بودن در قارچ *Rhizoctonia solani*

استاد راهنما

دکتر حسین علایی

استادان مشاور

دکتر سید باقر محمودی

دکتر روح الله صابری ریسه

نگارنده

سعید ملایی

مهر 1391

دانشگاه ولی‌عصر(عج) رفسنجان

دانشکده‌ی کشاورزی

گروه گیاهپزشکی

پایان‌نامه‌ی کارشناسی‌ارشد

مهندسی کشاورزی – رشته‌ی بیماری شناسی گیاهی

مطالعه رابطه بین گروه‌های آناستوموزی، بیماریزایی و اختصاصی بودن در قارچ *Rhizoctonia solani*

سعید ملایی

در تاریخ ۹۱/۷/۲۶ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای پایان‌نامه	دکتر حسین علایی	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضاء
۲- استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر سید باقر محمودی	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضاء
۳- استاد مشاور پایان‌نامه	دکتر روح الله صابری	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضاء
۴- استاد داور داخل گروه	دکتر پژمان خدایگان	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضاء
۵- استاد داور خارج از گروه	دکتر ذبیح الله اعظمی	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضاء
۶ – نماینده‌ی تحصیلات تکمیلی	دکتر محمدرضا پیرمرادی	با مرتبه‌ی علمی استادیار	امضاء

تمامی حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و نوآوری‌های حاصل از پژوهش موضوع این پایان‌نامه، متعلق به دانشگاه ولی‌عصر (عج) رفسنجان است.

تشکر و قدردانی

شکر خدا که هر چه طلب کردم از خدا

بر منتهای همت خود کامران شدم

اکنون که با لطف و استعانت از الطاف بیکران حضرت حق مجموعه حاضر به انجام رسیده وظیفه خود می‌دانم از لطف و مرحمت تمام کسانی که در جهت تدوین این مجموعه نقش داشته‌اند، تشکر و قدردانی نمایم.

از راهنمایی‌های ارزنده استاد گرامی، جناب آقای دکتر حسین علایی در مقام استاد راهنما کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر سید باقر محمودی و جناب آقای دکتر روح‌الله صابری ریسه که به‌عنوان اساتید مشاور با ارائه نظرات مفید و ارزشمند در انجام این پژوهش یاری نمودند، بسیار سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر خدایگان و جناب آقای دکتر اعظمی که زحمت داوری پایان نامه را پذیرفتند صمیمانه تشکر می‌نمایم.

از استاد بزرگوار جناب آقای دکتر ابراهیم صداقتی که از ایشان همواره کسب علم نموده و در حضورشان شاگردی نموده‌ام، تشکر و سپاس فراوان دارم.

همچنین از تمام دوستانی و همکلاسی‌های عزیز خانم‌ها درودی، بهمنش، رستمی، رفعتی و نعیم‌آبادی که با حمایت‌ها و تشویق هایشان مرا مورد لطف خود قرار دادند، صمیمانه متشکرم و برای همه آن‌ها آرزوی موفقیت می‌کنم.

در پایان از خانواده‌ام که در تمام لحظات زندگی‌ام مرا یاری کرده‌اند و انگیزه‌ی بیشتری برای تلاش و کوشش به من بخشیده‌اند، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

تقدیم

این پایان نامه را اگر منزلتی باشد

تقدیم می‌کنم به:

پدر بزرگوارم

که عالمانه به من آموخت تا چگونه در عرصه زندگی، ایستادگی را تجربه نمایم

مادر فداکار و مهربانم

که سجده‌ی ایثارش گل محبت را در وجودم پروراند و دامان گهربارش لحظه‌های مهربانی را به من آموخت.

تقدیم به همسرم

که سایه مهربانیش سایه سار زندگیم می باشد، او که اسوه صبر و تحمل بوده و مشکلات مسیر را برایم تسهیل نمود.

و

خواهر و برادر عزیزم

که وجودشان موجب شادابی و سرزندگی من است

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

مقدمه.....1

فصل دوم:

پیشینه پژوهش.....5

2-1- روش‌های طبقه‌بندی گونه‌های جنس قارچ *Rhizoctonia*.....10

2-1-1-تعداد هسته.....10

2-1-2-آزمون بیماری‌زایی.....10

2-1-3-بررسی تنوع گروه‌های آناستوموزی قارچ رایزوکتونیا با استفاده آنالیز DNA ریبوزومی.....11

2-1-4-واکنش گروه‌های آناستوموزی.....12

2-2- گروه‌های آناستوموزی رایزوکتونیا.....13

2-3- دامنه میزبانی و بیماری‌های ناشی از رایزوکتونیا.....22

2-4- اپیدمولوژی، چرخه زندگی و مدیریت بیماری‌های ناشی از رایزوکتونیا.....23

فصل سوم: مواد و روش

3-1- نمونه برداری و جداسازی.....24

3-2- بررسی خصوصیات جدایه‌ها.....29

3-3- اندازه‌گیری قطر ریسه‌ها.....29

3-4- تعیین وضعیت هسته‌ها 30

3-5- تعیین گروه‌های آناستوموزی 30

3-6- تهیه گروه‌های آناستوموزی استاندارد.....30

عنوان	صفحه

3-7- میزبان‌های مورد استفاده..... 31

3-8- بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها در شرایط درون شیشه‌ای..... 32

3-9- بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها در شرایط گلخانه..... 33

3-10- محاسبات آماری..... 34

3-11- بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های رایزوکتونیا بر اساس آنالیزrDNA..... 34

3-11-1- تهیه توده میسلیومی و استخراج DNA..... 34

3-11-2- تکثیر ناحیه ITS- r DNA..... 35

3-11-3- ارزیابی محصول PCR..... 36

3-11-4- هضم محصول PCR..... 37

3-11-5- ارزیابی و مقایسه محصول هضم..... 37

3-11-6- واکنشRAPD-PCR..... 38

3-12- بررسی میزان آنزیم‌ها..... 39

3-12-1 پکتات لایز..... 40

3-12-2- پکتین لایز 40

3-12-3- پلی گالاکتروناز..... 40

3-12-4- پکتین متیل استراز..... 41

3-12-5- نقشه پکتیکی..... 41

3-12-6- فعالیت آنزیم فنل اکسیداز خارج سلولی..... 41

عنوان **صفحه**

فصل چهارم: نتایج

4-1- خصوصیات و مورفولوژی جدایه‌ها 43

4-2- بیماری‌زایی روی خانواده بقولات 50

4-3- بیماری‌زایی روی خانواده سیب‌زمینی 52

4-4- بیماری‌زایی روی خانواده کدوئیان 54

4-5- بیماری‌زایی روی خانواده سماق 56

4 -6- بیماری‌زایی روی خانواده براسیکاسه 58

4-7- بیماری‌زایی روی خانواده کاسنی 60

4-8- بیماری‌زایی روی خانواده چلیپائیان 62

4-9- بیماری‌زایی روی خانواده تک لپه‌ای‌ها 64

4-10- بررسی شدت بیماری‌زایی گروه‌های مختلف آناستوموزی و میزان حساسیت میزبان‌ها 66

4-11- نتایج روش‌های مولکولی 69

4-11-1- مقایسه الگوی هضم آنزیم‌های برشگر 69

4-11-2- محصول برش با آنزیم *Bstf5I* 70

4-11-3- محصول برش با آنزیم *Tru9I* 70

4-11-4- تنوع ژنتیکی جدایه‌های رایزوکتونیا بر اساس نشانگر RAPD 71

4-12- نقشه پکتینی 84

عنوان	صفحه

فصل پنجم: بحث.....81

5-1- تنوع ژنتیکی جدایه‌های رایزوکتونیا بر اساس آنالیز rDNA.....97

5-2- نتیجه‌گیری کلی.....88

5-3- پیشنهادات.....89

منابع.....91

فهرست جدول‌ها **صفحه**

جدول 3-1: محل جمع آوری و میزبان‌های جدایه‌های مورد مطالعه..... 29
جدول 3-2: گروه‌های آناستوموزی استاندارد..... 31
جدول 3-3: اجزای واکنش PCR..... 36
جدول 3-4: اجزاء واکنش هضم..... 37
جدول 3-5: آغازگرهای تصادفی مورد استفاده در واکنش RAPD..... 38
جدول3-6: اجزاء واکنش RAPD-PCR..... 39
جدول 4-1: ویژگی جدایه‌های مورد مطالعه..... 47
جدول4-2: شاخص آلودگی جدایه‌های رایزوکتونیا جداسازی شده روی میزبان‌های مختلف در شرایط درون شیشه..... 48
جدول4-3: شاخص آلودگی جدایه‌های رایزوکتونیا روی میزبان‌های مختلف در شرایط درون گلخانه..... 49
جدول 4-4: طول تقریبی قطعات هضم شده ناحیه ITS1F&4 جدایه‌های رایزوکتونیا با دو آنزیم برشگر..... 71
جدول4-5: فعالیت آنزیم‌های پکتیکی در جدایه‌های قارچ رایزوکتونیا..... 78
جدول4-6: میزان فعالیت آنزیم فنل اکسیداز خارج سلولی جدایه‌های مختلف..... 79

فهرست شکل‌ها **صفحه**

شکل 2-1: واکنش آناستوموزی در قارچ‌های *Rhizoctonia solani* چند هسته‌ای.....13
شکل 3-1: علائم و نشانه‌های بیماری‌های رایزوکتونیا روی میزبان‌های مختلف.....28
شکل 4-1: رایزوکتونیا چند هسته‌ای.....44
شکل4-2: گروه آناستوموزی 4 در جدایه‌های بدست آمده از بادمجان، فلفل، گوجه‌فرنگی و لوبیا.....45
شکل4-3: گروه آناستوموزی 2-2 در جدایه بدست آمده از چغندرقند.....45
شکل4-4:گروه‌آناستوموزی 3 در جدایه‌های بدست آمده از سیب‌زمینی.....45
شکل 4-5: خصوصیات مرفولوژیکی جدایه‌های بدست آمده.....46
نمودار4-1: شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده بقولات در شرایط آزمایشگاه.....51
نمودار4-2: شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده بقولات در شرایط گلخانه.....51
نمودار 4-3: شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاه.....53
نمودار 4-4: شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده سیب‌زمینی در شرایط گلخانه.....53
نمودار4-5: شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده کدوئیان در شرایط آزمایشگاه.....55
نمودار4-6 : شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده کدوئیان در شرایط گلخانه.....55
نمودار 4-7: شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده سماق در شرایط آزمایشگاه.....57

فهرست شکل‌ها

صفحه

نمودار 4-8: شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده سماق در شرایط گلخانه.....57
نمودار 4-9: شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده براسیکاسه در شرایط آزمایشگاه.....59
نمودار 4-10: شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده براسیکاسه در شرایط گلخانه.....59
نمودار4-11: شدت بیماری‌زایی ایزوله‌های جداسازی شده روی خانواده کاسنی در شرایط آزمایشگاه.....61
نمودار4-12: شدت بیماری‌زایی ایزوله‌های جداسازی شده روی خانواده کاسنی در شرایط گلخانه.....61
نمودار 4-13: شدت بیماری‌زایی ایزوله‌های جداسازی شده روی چغندرقند در شرایط آزمایشگاه.63
نمودار 4-14: شدت بیماری‌زایی ایزوله‌های جداسازی شده روی چغندرقند در شرایط گلخانه.....63
نمودار 4-15: شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده گندمیان در شرایط آزمایشگاه.....65
نمودار 4-16: شدت بیماری‌زایی جدایه‌های بدست آمده روی خانواده گندمیان در شرایط گلخانه.....65
نمودار 4-17: قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میزبان‌های متفاوت در شرایط آزمایشگاه.....67
نمودار4-18: قدرت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی میزبان‌های مختلف در شرایط گلخانه.....67
نمودار4-19: میزان حساسیت میزبان‌های مختلف نسبت به جدایه‌های رایزوکتونیا در شرایط آزمایشگاه.....68

فهرست شکل‌ها صفحه

نمودار4-20: میزان حساسیت میزبان‌های مختلف نسبت به جدایه‌های رایزوکتونیا در شرایط گلخانه.....68
شکل4-6: نقوش باندی محصول PCR جدایه‌های ریزوکتونیا جدا شده با استفاده از آغازگرهای ITS1F&4 در ژل آگارز% 1,5 69
شکل4-7: نقوش باندی محصول PCR جدایه‌های ریزوکتونیا جدا سازی شده با استفاده از آغازگرهای ITS1F & 4 هضم شده توسط آنزیم *Bstf5I* در آگاروز 2,5% رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید.....70
شکل4-8: نقوش باندی هضم محصول PCR جدایه‌های ریزوکتونیا جدا سازی شده با استفاده از آغازگرهای ITS1F & 4 توسط آنزیم *Tru 9I* در ژل آگاروز 2,5% رنگ آمیزی شده با اتیدیوم بروماید.....71
شکل 4-9: نقوش باندی قطعات تکثیری DNA جدایه‌های گروه‌های آناستوموزی *R.solani* با استفاده از RAPD-PCR آغازگر AB2-08 در ژل آگارز% 2,5 72
شکل 4-10: تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های مورد مطالعه ریزوکتونیا با استفاده از داده‌های حاصل از آغازگر تصادفی UBC 28 72
شکل 4-11: تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های مورد مطالعه ریزوکتونیا با استفاده از داده‌های حاصل از آغازگر تصادفی AB2-06 73
شکل 4-12: تجزیه خوشه‌ای جدایه‌های رایزوکتونیا با استفاده از آنزیم برشی *Tru9I*.....73
شکل4-13: بیماری‌زایی توسط جدایه‌های رایزوکتونیا روی تربچه.....75
شکل 4-14: واکنش بیماری‌زایی میزبان‌های متفاوت نسبت به جدایه بدست آمده از بادمجان.....77
شکل4-15: نقشه پکتیکی جدایه‌های مختلف با استفاده از ژل پلی اکریل آمید.....80