بسم الله الرحمن الرحيم

پروردگارا به پیشگاه پاک و مقدست تقدیم می‌دارم که بندگی فقط تو را سزد
آنچه داده‌ای بیش از شایستگی من است گرچه در خور بخشندگی توست.....

بعد از حمد وسپاس به درگاه یکتای عالم شایسته است از تمام عزیزانی که در طی این دوره مرا یاری کردند قدردانی کنم.
از استاد راهنمای بزرگوارم جناب آقای دکتر محمد جواد سلیمانی که راهنمایی‌های ارزنده‌شان را شامل حالم نمودند سپاسگذارم. از استاد مشاورین گرامی و ارجمندم جناب آقای دکتر دوستمراد ظفری و جناب آقای دکتر بهمن بهرام‌نژاد که همواره صبورانه مشوق من در تمام مراحل انجام این پروژه بودند و مرا یاری کردند بی نهایت سپاسگذارم. از جناب آقای دکتر غلام خداکرمیان و خانم دکتر سهیلا میرزایی که در طی دوره توفیق استفاده از محضرشان را داشته‌ام تشکر می کنم.

این کمترین را تقدیم می کنم به پدر عزیز و مهربانم، مادر دلسوز و فداکارم، خواهر و برادر عزیزم و از زحمات و خوبی‌هایشان در تمام زندگیم تشکر می کنم.
از دوستان و همکلاسی‌هایم
خانم‌ها : فضلی، فتاحی، آزادی، گلپایگانی، نوروزپور، اسماعیل زاده، اسدالله پور، غنایی، وصال طلب، رحم‌جو،عبد الصالحی، صدیقی، ایوبی، اوزی، یگانه و
آقایان : حقیقت، حیدری، آباد، کوهی، ملکی
به خاطر همه محبت هایشان صمیمانه متشکرم و برای آنها موفقیت در تمام مراحل زندگی را از خداوند متعال خواستارم.

دانشکده کشاورزی
گروه گیاهپزشکی

پایان نامه
برای دریافت درجه کارشناسی ارشد
در رشته بیماری‌شناسی گیاهی

عنوان

بررسی امکان کنترل غیرشیمیایی *Botrytis cinerea* عامل بیماری کپک خاکستری توت‌فرنگی در استان کردستان

اساتید راهنما
دکتر محمد جواد سلیمانی

استاد مشاور
دکتر دوستمراد ظفری
دکتر بهمن بهرام نژاد

پژوهشگر
ساقی یونسی بانه
آذر ۱۳۸۸

همه امتیازهای این پایان نامه به دانشگاه بوعلی سینا همدان تعلق دارد. در صورت استفاده از تمام یا بخشی از مطالب پایان نامه در مجلات، کنفرانس‌ها و یا سخنرانی‌ها، باید نام دانشگاه بوعلی سینا (یا استاد یا استادان راهنمای پایان نامه) و نام دانشجو با ذکر مآخذ و ضمن کسب مجوز کتبی از دفتر تحصیلات تکمیلی دانشگاه ثبت شود. در غیر این صورت مورد پیگرد قانونی قرار خواهد گرفت.

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی

عنوان:

بررسی امکان کنترل غیرشیمیایی *Botrytis cinerea* عامل بیماری کپک خاکستری توت‌فرنگی در استان کردستان

اساتید راهنما:

دکتر محمد جواد سلیمانی

اساتید مشاور:

دکتر دوستمراد ظفری

دکتر بهمن بهرام‌نژاد

ارائه دهنده:

ساقی یونسی بانه

کمیته ارزیابی پایان نامه:

۱-اساتید راهنما: دکتر. محمد جواد سلیمانی..... دانشیار. گیاهپزشکی

۲-استاد مشاور: دکتر بهمن بهرام‌نژاد..... استادیار گروه بیوتکنولوژی

۳-استاد مشاور: دکتر دوستمراد ظفری..... دانشیار گروه گیاهپزشکی

٤-استاد مدعو: دکترغلام خداکرمیان.....دانشیار گروه گیاهپزشکی

۵-استاد مدعو: دکتر سهیلا میرزایی..... .....استادیار گروه گیاهپزشکی

دانشکده کشاورزی

جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی

ساقی یونسی بانه در رشته گیاهپزشکی

با عنوان:

بررسی امکان کنترل غیرشیمیایی *Botrytis cinerea* عامل بیماری کپک خاکستری توت‌فرنگی در استان کردستان

به ارزش ٦ واحد در روز شنبه۱۳۸۸/۱۰/۱ ساعت ۱۲/۵ در سالن سمعی و بصری دانشکده کشاورزی و با حضور اعضای هیات داوران زیر برگزار گردید و با نمره .....۱۹/٤..... و درجه .....عالی..... به تصویب رسید.

هیات داوران:

۱- اساتید راهنما: دکتر محمد جواد سلیمانی..... .....دانشیار گروه گیاهپزشکی

۲- دکتر دوستمراد ظفری ....دانشیار گروه گیاهپزشکی

۳- استاد مشاور:دکتر بهمن بهرام‌نژاد..... استادیار گروه بیوتکنولوژی

٤- استاد مدعو:دکتر سهیلا میرزایی .....استادیار گروه گیاهپزشکی

۵- استاد مدعو:دکتر غلام خداکرمیان.... .....دانشیار گروه گیاهپزشکی

فهرست مطالب

چکیده
مقدمه ۲

فصل اول - بررسی منابع

۱-۱- تاریخچه کشت توت‌فرنگی در جهان و ایران ۶
۱-۲- ویژگی‌های توت‌فرنگی از نظر گیاه‌شناسی ۶
۱-۳- مهمترین ارقام توت‌فرنگی ۷
۱-۴- ویژگی‌های توت‌فرنگی از نظر ترکیبات شیمیایی ۸
۱-۵- عمر نگهداری توت‌فرنگی ۸
۱-۶- چرخه زندگی پاتوژن‌های نکروتروف ۹
۱-۷- عامل بیماری کپک خاکستری ۹
۱-۷-۱- چرخه رویشی ۱۰
۱-۸- گونه‌های جنس *Botrytis* ۱۰
۱-۹- گونه *Botrytis cinerea* ۱۱
۱-۱۰ - خصوصیات مورفولوژیکی *B. cinerea* ۱۲
۱-۱۱- تاکسونومی جنس بوتریتیس ۱۳
۱-۱۲- بیماری‌های بوتریتیس ۱۴
۱-۱۳- اتیولوژی پوسیدگی پس از برداشت *Botrytis* ۱۷
۱-۱۴- کنترل بیماری ۱۸
۱-۱۵- کنترل شیمیایی ۱۹
۱-۱۶- کنترل بیولوژیکی کپک خاکستری ۲۰
۱-۱۷- استفاده از تریکودرما درمدیریت بیماریها ۲۱
۱-۱۸- مزایا وفواید تریکودرما ۲۳
۱-۱۸-۱- کنترل بیماریها ۲۳
۱-۱۸-۲- راه‌اندازی رشد گیاه ۲۳
۱-۱۸-۳- الیسیتورهای بیوشیمیایی مقاومت به بیماری ۲۳
۱-۱۸-۴- بهبود خاک ۲۳
۱-۱۹- مکانیزم‌های بیوکنترل تریکودرما ۲۴
۱-۱۹-۱- رقابت ۲۴
۱-۱۹-۲- آنتی بایوز ۲۴
۱-۱۹-۳- مایکوپارازیتیزم ۲۵
۱-۱۹-۴- القای مقاومت در گیاه ۲۵
۱-۱۹-۵- افزایش رشد در گیاه ۲۶
۱-۲۰- ارتباط متقابل تریکودرما با گیاهان ۲۷
۱-۲۱- ترکیبات تجاری بیوکنترل ۲۷
۱-۲۱-۱- بیناب ۲۷
۱-۲۱-۲- مایکواستاپ ۲۷
۱-۲۱-۳- پلنتشیلد ۲۷

فهرست مطالب | صفحه

۱-۲۱-۴- سرنید ۲۸
۱-۲۱-۵- تریکودکس ۲۸
۱-۲۱-۶- بوتریوزن ۲۸
۱-۲۱-۷- اسپایر ۲۸
۱-۲۱-۸- بیوسیو ۲۸
۱-۲۲- کنترل تلفیقی ۲۸
۱-۲۲-۱- کاهش استفاده از قارچکش با زمان مناسب کاربرد آن ۲۹
۱-۲۲-۲- تناوب مواد شیمیایی و غیرشیمیایی ۲۹
۱-۲۳- کاهش خسارت *B. cinerea* در توت‌فرنگی با استفاده از روش‌های غیرشیمیایی ۲۹
۱-۲۴- اشعه ماورائ بنفش و کاربرد کنترلی آن ۳۰
۱-۲۵- مقاومت القایی ۳۱
۱-۲۶- مقاومت سیستمیک اکتسابی ۳۲
۱-۲۷- سالیسلیک اسید: سیگنال داخلی برای SAR ۳۶
۱-۲۸- ژن‌های SAR ۳۶
۱-۲۹- تحریک ۳۶
۱-۳۰- بیوسنتز و نقش سالیسیلیک اسید در گیاه ۳۷
۱-۳۱- مکانیزم و نقش سالیسیلیک اسید در مقاومت SAR ۳۸
۱-۳۲- محرک‌های شیمیائی SAR ۳۹
۱-۳۳- محرک‌های آلی طبیعی ۴۰
۱-۳۴- پروتئین‌های وابسته به بیماریزایی ۴۰
۱-۳۵- دیواره سلولی قارچ ۴۲
۱-۳۶- آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی ۴۲
۱-۳۶-۱- کیتینازها ۴۳
الف) نقش کیتینازها در بیماریزایی ۴۵
۱-۳۷- نشانگرهای مولکولی ۴۵
۱-۳۸- نشانگر RAPD ۴۶

فصل دوم : مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌های قارچی ۴۷
۲-۲- محیط کشت‌های مورد استفاده ۴۷
۲-۲-۱- محیط کشت PDA ۴۷
۲-۲-۲- محیط کشت عصاره مالت اکسترکت آگار (MEA) ۴۷
۲-۲-۳- محیط کشت آب-آگار (WA) ۴۷
۲-۳- خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها ۴۷
۲-۴- نگهداری جدایه‌ها ۴۸
۲-۵- شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های بوتریتیس ۴۸
۲-۶- آزمون اثبات بیماریزایی ۴۸
۲-۷- بررسی خواص ضدقارچی تریکودرما روی قارچ عامل بیماری در آزمایشگاه ۴۹
۲-۷-۱- تهیه جدایه‌های قارچی ۴۹
۲-۸- آزمون کشت متقابل (Dual Culture) ۴۹
۲-۹- تاثیر مواد خارج سلولی تریکودرما در بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری ۵۰
۲-۱۰- بررسی تاثیر مواد خارج سلولی فرار جدایه‌های تریکودرما در بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری ۵۱

فهرست مطالب | صفحه

۲-۱۱- تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ عامل بیماری ۵۲
۲-۱۲- بررسی تاثیر جدایه‌های تریکودرما روی قارچ عامل بیماری در شرایط مزرعه ۵۲
۲-۱۳- بررسی تاثیر تیمارهای سالیسیلیک اسید در روی کنترل بیماری در شرایط مزرعه ۵۲
۲-۱۴- بررسی تاثیر کاربرد تلفیقی پس از برداشت تیمارهای سالیسیلیک اسید و تریکودرما در کنترل بیماری ۵۴
۲-۱۵- بررسی تاثیر مستقیم سالیسیلیک اسید روی قارچ عامل بیماری در آزمایشگاه ۵۴
۲-۱۶- استخراج DNA ژنومی قارچ عامل بیماری ۵۵
۲-۱۶-۱- استخراج DNA به روش اصلاح شده موری و تامپسون ۵۶
۲-۱۶-۲- تعیین کمیت و کیفیت DNA ۵۷
۲-۱۷- RAPD-PCR و PCR با استفاده از آغازگر اختصاصی برای شناسایی گونه قارچ عامل بیماری ۵۸
۲-۱۸- تنظیم شرایط برای PCR در نشانگر RAPD ۵۸
۲-۱۹- الکتروفورز فراورده های تکثیری ۶۰
۲-۲۰- تجزیه و تحلیل داده‌هایRAPD ۶۰
۲-۲۱- تنظیم شرایط برای PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ۶۰
۲-۲۱-۱- آغازگرها ۶۱
۲-۲۲- بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز در برگ‌های تیمار شده توت‌فرنگی ۶۲
۲-۲۲-۱ استخراج پروتئین از بافت برگ توت‌فرنگی ۶۳
۲-۲۲-۲- طرز تهیه ژل آگارز ۶۳
۲-۲۲-۳- تهیه محلول گلیکول کیتین ۶۴
۲-۲۲-۵- بررسی فعالیت آنزیم ۶۴

فصل سوم - نتایج و بحث

۳-۱- شناسایی مرفولوژیکی قارچ *B. cinerea* ۶۵
۳-۲- آزمون تست بیماریزایی جدایه‌ها ۶۷
۳-۳- بررسی‌های ملکولی ۶۹
۳-۳-۱- نتایج مربوط به استخراج DNA جدایه‌های قارچی ۶۹
۳-۳-۲- شناسایی ملکولی قارچ *B. cinerea* ۶۹
۳-۳-۳- تکثیر محصولات PCR در نشانگر RAPD ۷۱
۳-۳-۴- تجزیه داده‌های مولکولی با استفاده از نرم افزار NTSYS ۷۱
۳-۴- بررسی اثر بازدارندگی ماده سالیسیلیک اسید در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *B. cinerea* در آزمایشگاه ۷۵
۳-۵- بررسی تاثیر کاربرد سالیسیلیک اسید در شرایط مزرعه ۷۸
۳-۶- بررسی اثر جدایه‌های تریکودرما در کنترل کپک خاکستری در مزرعه ۸۲
۳-۷- بررسی اثر کشت متقابل تریکودرما بر رشد میسلیومی قارچ *B. cinerea* در آزمایشگاه ۸۵
۳-۸- بررسی تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در رشد پرگنه *B. cinerea* ۹۰
۳-۹- بررسی تاثیر ترکیبات فرار گونه‌های مختلف تریکودرما بر روی رشد پرگنه ۹۲
۳-۱۰- بررسی تیمار پس از برداشت سالیسیلیک اسید و *T. harzianum* روی توت‌فرنگی در آزمایشگاه ۹۴
۳-۱۱- نتایج بررسی فعالیت کیتیناز در برگ گیاهان توت‌فرنگی ۹۷
نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۱۰۳
پیوست ۱۰۴
منابع ۱۰۹

شکل ۱-۱- سیکل زندگی قارچ *B. cinerea* ۱۷
شکل ۱-۲- ملکول کیتین – منومر N استیل گلوکوزامین با باندهای β-۴,۱ ..... ۴۲
شکل ۳-۱- فرم میکروسکوپی قارچ *B. cinerea* (A-J) ۶۵
شکل ۳-۲ - فرم ظاهری کلنی جدایه‌های مختلف قارچ *B. cinerea* (K-N) ۶۷
شکل ۳-۳- نتایج آزمون بیماریزایی برخی از جدایه‌های *B. cinerea* در شرایط آزمایشگاه ۶۸
شکل ۳-۴- نتیجه استخراج DNA جدایه‌های قارچ *B.cinerea* و کمیت سنجی آن با غلظت ۵۰ نانوگرم بر میکروگرم در میلی‌لیتر فاژ لامبدا . ۶۹
شکل ۳-۵- نتیجه واکنش PCR اختصاصی جدایه‌های مورد آزمایش با آغازگرهای اختصاصی Cv۲۹ ± ۷۱
شکل۳-۶ - نتیجه واکنش RAPD جدایه‌های قارچی با استفاده از آغازگر OPB-۱۰ ..... ۷۲
شکل ۳-۷- نتیجه واکنش RAPD جدایه‌های قارچی با استفاده از آغازگر OPB-۰۸ ..... ۷۲
شکل ۳-۸- مقایسه جدایه‌های مختلف *B. cinerea*، با رسم دندروگرام ۷۳
شکل ۳-۹- تاثیر غلظت‌های سالیسیلیک اسید در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *B.cinerea* در محیط کشت PDA پس از ۴۸ ساعت ۷۷
شکل ۳-۱۰- تاثیر غلظت‌های سالیسیلیک اسید در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *B. cinerea* در محیط کشت PDA پس از ۷۲ ساعت ... ۷۷
شکل ۳-۱۱- تاثیر غلظت‌های سالیسیلیک اسید در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *B. cinerea* در محیط کشت PDA پس از ۹۶ ساعت ... ۷۸
شکل ۳-۱۲- کرت‌های آزمایشات مزرعه‌ای و تقسیم‌بندی کرت‌های مزرعه در منطقه گریزه ۸۰
شکل ۳-۱۳- نتایج تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید در روی بوته‌ها و ارزیابی میزان رشد قارچ پس از تلقیح در تیمارهای انجام شده روی میوه. ۸۱
شکل ۳-۱۴- نتایج تلقیح میوه توت‌فرنگی در بررسی آزمایش مربوط به تیمار سالیسیلیک اسید در شرایط مزرعه به عنوان شاهد آلوده ۸۲
شکل ۳-۱۵- نمودار فراوانی بیماری پوسیدگی خاکستری میوه توت‌فرنگی در تیمارهای مختلف سالیسیلیک اسید در شرایط مزرعه. ۸۲
شکل ۳-۱۶- نمودار بررسی فراوانی بیماری (%) کپک خاکستری توت‌فرنگی در تیمارهای جدایه‌های مختلف تریکودرما در مزرعه. ۸۵
شکل ۳-۱۷- بررسی تاثیر گونه‌های مختلف تریکودرما در کشت متقابل تریکودرما و *B. cinerea* ۸۸
شکل ۳-۱۸- بررسی میکروسکوپی تاثیر تریکودرما در کشت متقابل با قارچ *B. cinerea* ۸۹
شکل ۳-۱۹- بررسی تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی گونه*T. ceramicum* بر رشد میسلیومی *B. cinerea* ۹۱
شکل ۳-۲۰- بررسی تاثیر مواد فرار جدایه‌های مختلف تریکودرما بر روی رشد میسلیومی *B. cinerea*. ۹۴
شکل ۳-۲۱- نمودار فعالیت آنزیمی تیمارهای سالیسیلیک اسید در برگ توت‌فرنگی ۱۰۱
شکل ۳-۲۲- نتیجه فعالیت آنزیم کیتیناز در برگ توت‌فرنگی. عکس از ژل با UV در دستگاه Gele Document ۱۰۱
شکل ۳-۲۳- نتیجه فعالیت آنزیم کیتیناز در برگ توت‌فرنگی ۱۰۲

جدول ۲-۱- مواد لازم و مقدار هر یک برای تهیه محلول پایه جهت نشانگر RAPD ۵۸
جدول ۲-۲- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف PCR با آغازگرهای تصادفی ۵۹
جدول ۲-۳- مواد لازم و مقدار هر یک برای تهیه محلول پایه جهت PCR با آغازگر اختصاصی ۶۰
جدول ۲-۴- زمان و دمای لازم برای مراحل مختلف باآغازگرهای اختصاصی ۶۱
جدول ۲-۵- توالی پرایمرهای اختصاصی برای شناسایی گونه *B. cinerea* ۶۲
جدول ۲-۶-.توالی پرایمرهای مورد استفاده در RAPD ۶۲
جدول ۳- ۱- آزمون تست بیماریزایی جدایه‌های *B. cinerea* روی میوه توت‌فرنگی ۶۸
جدول ۳- ۱- آزمون تست بیماریزایی جدایه‌های *B. cinerea* روی میوه توت‌فرنگی ۶۸
جدول ۳-۲- تعداد باندهای ایجاد شده با آغازگرهای به‌کار رفته در نشانگر RAPD ۷۳
جدول ۳-۳- تاثیر غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ*B. cinerea* ۷۶
جدول ۳-۴ - تاثیر تیمار سالیسیلیک اسید بر فراوانی بیماری پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی در مزرعه. ۸۰
جدول ۳-۵-.بررسی تاثیر جدایه‌های تریکودرما در فراوانی بیماری کپک خاکستری میوه در مزرعه توت‌فرنگی ۸۴
جدول ۳-۶- بررسی اثر تریکودرما در کشت متقابل تریکودرما و *B. cinerea* در آزمایشگاه ۸۸
جدول۳-۷- بررسی تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی گونه‌های مختلف تریکودرما بر روی رشد پرگنه *B. cinerea* ۹۱
جدول۳-۸- بررسی تاثیر مواد فرار جدایه‌های تریکودرما بر روی رشد پرگنه *B. cinerea*..... ۹۳
جدول.۳-۹- بررسی تاثیر تیمارهای پس از برداشت تریکودرما و سالیسیلیک اسید روی شدت و فراوانی بیماری ۹۶
جدول ۳-۱۰- بررسی فعالیت کیتینازی تیمارهای سالیسیلیک اسید در مزرعه ۱۰۰
جدول ۴-۱- نتایج تجزیه واریانس بررسی تاثیر مستقیم سالیسیلیک اسید بر رشد قارچ در آزمایشگاه..... ۱۰۷
جدول ۴-۲- نتایج تجزیه واریانس بررسی تاثیر تیمارهای سالسیسلیک اسید در مزرعه ۱۰۷
جدول۴-۳- نتایج تجزیه واریانس بررسی تاثیر تیمارهای تریکودرما بر کپک خاکستری توت‌فرنگی در مزرعه ۱۰۷
جدول ۴-۴- نتایج تجزیه واریانس بررسی تاثیر ترشحات مایع خارج سلولی تریکودرما بر رشد قارچ عامل بیماری (*B. cinerea*) ۱۰۸
جدول۴-۵- نتایج تجزیه واریانس تاثیر ترکیبات فرار جدایه‌های تریکودرما بر رشد قارچ عامل بیماری (*B. cinerea*) ۱۰۸
جدول۴-۶- نتایج تجزیه واریانس بررسی تاثیر کشت متقابل تریکودرما و قارچ عامل بیماری (*B. cinerea*)..... ۱۰۸
جدول ۴-۷- نتایج تجزیه واریانس بررسی تاثیر تیمار تلفیقی سالیسیلیک اسید و جدایه *T. harzianum* بررشد قارچ عامل بیماری ۱۰۹
جدول۴-۸- نتایج تجزیه واریانس بررسی فعالیت آنزیم کیتیناز کل در گیاه توت‌فرنگی..... ۱۰۹

چکیده

پوسیدگی‌های میوه قبل و پس از برداشت در شرایط زراعی خسارات عمده‌ای ایجاد می‌کند. در طول انبارداری و حمل و نقل میوه توت‌فرنگی (*Fragaria anannasa*)، خسارات پوسیدگی به طور عمده توسط *B. cinerea* Pers., Fr. ایجاد می‌شود که بیماری کپک خاکستری نام دارد. عوامل کنترل بیولوژیکی و شیمیایی جدید، به نظر می‌رسد استفاده از قارچکش‌های متداول را روی توت‌فرنگی کاهش می‌دهد. در این تحقیق جدایه‌های مختلفی از *B. cinerea* از مزارع و گلخانه جمع‌آوری و شناسایی شده وتمایز جدایه‌ها با استفاده از نشانگر RAPD مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که جدایه‌های مورد آزمایش به سه گروه اصلی متفاوت تعلق دارند و صرفنظر از برخی جدایه‌ها، گروه‌بندی آنها بر اساس مکان جمع‌آوری آنها است. در این تحقیق کاربرد غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید (۰، ۱، ۲، ۴ میلی‌مولار) به عنوان تیمارهای قبل و پس از برداشت به منظور کنترل پوسیدگی کپک خاکستری روی میوه‌های توت‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت. میوه‌های توت‌فرنگی با غلظت‌های مختلف سالیسیلیک اسید (۱، ۲، ۴ میلی‌مولار) محلول‌پاشی شده و سه روز پس از تیمار با سوسپانسیون اسپور قارچ *B. cinerea* (1×10^5 spore/ml) تلقیح شدند. علاوه بر آن اثرات کاربرد تلفیقی سالیسیلیک اسید و گونه‌های تریکودرما به عنوان یک روش کنترل تلفیقی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور میوه‌های توت‌فرنگی در زمان رسیدگی برداشت شده، در محلول‌های سالیسیلیک اسید (۰، ۱، ۲، ۴ میلی‌مولار) به مدت ۵ دقیقه قرار گرفتند. پس از ۲ ساعت با سوسپانسیون اسپور قارچ *B. cinerea* و سوسپانسیون اسپور تریکودرما تلقیح شده و در دمای ۲۲ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. ارزیابی بیماری بر اساس شاخص شدت بیماری در میوه‌ها اندازه‌گیری شده و بیشترین شدت بیماری در آنها در میوه‌های تیمار شده با سالیسیلیک اسید با غلظت ۱ میلی‌مولاربه میزان ۰/۱۳ و کمترین میزان مربوط به میوه‌های تیمارشده با تریکودرما و ۲ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید به صورت تلفیقی، به میزان ۰/۸۴ بود. نتایج آزمایش نشان داد که مقاومت میوه‌های توت‌فرنگی به پاتوژن با کاربرد سالیسیلیک اسید به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. فراوانی بیماری در گیاهان تیمار شده با سالیسیلیک اسید نسبت به گیاهان فاقد تیمار (کنترل) کمتر بود. علاوه بر آن، فعالیت کیتیناز در گیاهان توت‌فرنگی در تیمار قبل از برداشت توسط سالیسیلیک اسید به عنوان نشانگر مقاومت سیستمیک اکتسابی مورد تحقیق قرار گرفت. نتایج آزمایش نشان داد فعالیت آنزیم در میوه‌های تیمارشده توسط سالیسیلیک اسید (۲، ۴ میلی‌مولار) به طور قابل توجهی بالاتر از گیاهان فاقد تیمار (کنترل) است.

واژه‌های کلیدی: کپک خاکستری، سالیسیلیک اسید، مقاومت سیستمیک اکتسابی، کیتیناز

مقدمه

مقدمه

بیماری‌های گیاهی سالانه موجب ایجاد ۲۲۰ بیلیون دلار خسارت در روی محصولات و تولیدات کشاورزی می‌شوند. کنترل بیماری‌های محصولات کشاورزی با توجه به کمبود مواد غذایی که در بسیاری از مناطق دنیا وجود دارد تقاضا برای کارایی بیشتر و بهتر درتولید مواد غذایی همراه با حفاظت محیط را تاکید می‌کند (اگریوس، ۲۰۰۵). کاهش مساحت خاک‌های بارور و حاصلخیز، مدیریت نامناسب و فرسایش، محدودیت تولید محصولات ضروری و اصلی در بسیاری از نواحی جهان را گوشزد می‌کند. علاوه برآن برخی بیمارگرهای گیاهی شامل بسیاری از عوامل بیماری‌زای ریشه مثل *Pythium* spp و .*Rhizoctonia* spp خاک را تا حدی آلوده می‌کنند که در آن پرورش یک محصول اصلی تا زمانیکه خاک ضدعفونی نشود یا تحت تناوب قرار نگیرد اقتصادی نخواهد بود. هزینه‌هایی که صرف مدیریت بیماری‌های گیاهی می‌شود یکی از مهمترین هزینه‌های مرتبط با تولید محصول است.

برخی از بیماری‌ها صرفا" با کاربرد مکرر قارچ‌کش‌ها قابل کنترل هستند و این مستلزم آلودگی‌های محیطی و از بین رفتن بسیاری از میکروارگانیزم‌های غیر هدف، بقایای مواد شیمیایی در مواد غذایی و سلامت و بهداشت ناشی از در معرض بودن مکرر و بالای محیط با این مواد شیمیایی می‌باشد که خود از موارد قابل توجه و نگران کننده است.

همچنین با وجود پیشرفت‌های بسیار در مدیریت بیماری‌های قارچی، برخی از بیمارگرهای گیاهی از جمله پژمردگی آوندی، آنتراکنوز و پاخوره گندم و سایر آلودگی‌های ریشه با مواد شیمیایی قارچکش رایج غیر قابل کنترل مانده‌اند (نایت[1] و همکاران، ۱۹۹۷). ضمن اینکه قارچکش‌ها ممکن است به دلیل ایجاد مقاومت در بیمارگرها کمتر موثر بوده یا کم اثرتر شوند. اصلاح نباتات برای مقاومت به بیماری یکی از روش‌های حفاظت محصولات است. در سال‌های اخیر با در نظرگرفتن اثرات منفی که آفت‌کش‌ها روی محیط می‌توانند داشته باشند نیاز به توسعه روش‌های غیرشیمیایی جانشین برای کنترل بیماری‌ها بیشتر است. توسعه گیاهان دارای مقاومت تشدید شده یکی از روش‌های جانشین در کنترل بیماری است.

اگر چه ایجاد مقاومت به بیماری در داخل گیاهان بطور مصنوعی به دلیل تنوع محدود ژنتیکی و توانایی بیمارگرها در تکامل بیوتیپ‌های مقاوم محدود می‌باشد. یکی از جنبه‌های مورد بررسی و مرتبط با مقاومت به بیماری‌ها که محققان مورد توجه قرار داده‌اند مکانیزم‌های دفاعی در گیاهان است. گیاهان بگونه موفقیت‌آمیزی از حمله در برابر یک سری از بیمارگرها، با القای پاسخ‌های گیاهی مقاومت می‌کنند. پاسخ فوق حساسیت یک مثال از پاسخ‌های دفاعی مورد استفاده توسط گیاه برای مبارزه با برخی بیمارگرها است. پاسخ فوق حساسیت در اطراف مکان آلودگی نکروز سلول‌های

[1] Knight

گیاهی ایجاد می‌کند که باعث محدود شدن گسترش آلودگی در سرتاسر گیاه می‌شود. در کنار موضعی ساختن و متوقف ساختن آلودگی، پاسخ فوق حساسیت، پدیده‌ای را که بعنوان مقاومت سیستمیک اکتسابی شناخته شده است، SAR[1]، راه‌اندازی می‌کند. این پدیده اخیراً توجه زیادی را به خود جلب کرده است.

براساس آمار FAO در سال ۲۰۰٤، آمریکا تقریبا ۲۰ درصد از تولید توت‌فرنگی جهان را به خود اختصاص داده است و به دنبال آن اسپانیا، ژاپن، لهستان، ایتالیا و کره قرار دارند. تولید توت‌فرنگی در ایالات متحده آمریکا ۷٦۰۰۰۰ تن، بعد از آن اسپانیا با تولیدی بیش از ۳۲۸۰۰۰، ژاپن با ۲۰۸۰۰۰، لهستان با ۱۸۹۰۰۰، ایتالیا با ۱۸۰۰۰۰ و جمهوری کره با ۱۷۵۰۰۰ تن می‌باشد. سطح زیر کشت این محصول در جهان در این سال ۲۱٤۱۱۸ هکتار و در ایران ۳۰۰۰ هکتار بوده است. میزان عملکرد در جهان و ایران به ترتیب ۱٤٥۲٦/٦ و ۸۰۰۰ kg/h است و میزان تولید بر حسب تن در جهان ۳۱۳۸٤۰ و در ایران ۲٤۰۰۰ می‌باشد.

استان کردستان با سطحی بیش از ۲۳۰۰ هکتار مزارع توت‌فرنگی، اولین استان تولیدکننده توت‌فرنگی در ایران است (سرسیفی، ۱۳۷۸).

در استان کردستان تولید سالیانه بیش از ۳۰ هزار کیلوگرم محصول توت‌فرنگی، درآمد زیادی را عاید کشاورزان منطقه نموده است. در این استان، کشت و کار توت‌فرنگی به طور عمده در محدوده واقع بین شهرستان‌های سنندج – کامیاران و مریوان انجام می‌شود و کشت توت‌فرنگی مطابق روش‌های محلی و قدیمی صورت می‌گیرد. قطعات کشت اغلب کوچک و در دامنه‌ها و تپه‌ها یا در حاشیه رودخانه انجام می‌پذیرد. از امتیازات مهم ویژه مزارع توت‌فرنگی این است که غیر از کشت و کار توت‌فرنگی، هیچ محصولی در این قطعات بازده اقتصادی ندارد.

توت‌فرنگی از جمله میوه‌های بسیار فسادپذیر به ویژه پس از برداشت می‌باشد. ضایعات پس از برداشت با حمله قارچ‌ها و سایر میکروارگانیسم‌ها افزایش حاصل می‌یابد، به طوری که حجم این ضایعات در کشورهای در حال توسعه به ۱/۳ (در حدود ٤۰ درصد) محصولات برداشت شده می‌رسد، در حالی که می‌توان آن را محدود کرد.

استان کردستان به عنوان قطب تولیدی توت‌فرنگی در کشور دارای پتانسیلی قوی می‌باشد که با وجود مرغوبیت این محصول و تلاش‌های فراوان تولیدکنندگان به دلایل متعدد از جمله کوتاهی عمر ماندگاری محصول و کمبود صنایع تبدیلی و سردخانه در سطح استان، متاسفانه نتوانسته از این پتانسیل قوی بهره برداری نماید.

[1] Systemic Acquired Resistance (SAR)

عوامل بیماری‌زای قارچی نقش مهمی در آلودگی میوه‌های توت‌فرنگی به عهده دارند. از مهمترین قارچ‌های آلوده‌کننده توت‌فرنگی، کپک خاکستری می‌باشد. کپک خاکستری یا *Botrytis cinerea* از بدو تشکیل غنچه‌های گل می‌تواند وارد اندام‌های اولیه تشکیل میوه شود و تا زمان رسیدگی میوه آنجا بماند و یا در زمان نرم شدن یا صدمه دیدن میوه وارد شده، در داخل یا روی میوه فعالیت تخریبی خود را آغاز کند. این کپک‌ها در هنگام بارندگی و هوای مرطوب صدمه بیشتری می‌زنند. عامل بیماری در هوای گرم فعالیت بهتری دارد و در دمای نزدیک به صفر نیز، با شدت کمتری بیماری ادامه می‌یابد. میوه برداشت شده از حساسیت بیشتری نسبت به این بیماری برخوردار است.

برای بالا بردن قابلیت نگهداری محصولات فسادپذیری مثل توت‌فرنگی، انجام عملیات سرد کردن اولیه قبل از حمل و نقل و نگهداری در سردخانه یا عرضه محصولات به بازار مصرف، ضروری است. در مدت زمان نگهداری، کاهش دما باعث کند شدن فعالیت‌های آنزیمی شده و شدت تنفس را پایین می‌آورد و در نتیجه میوه مدت زمان بیشتری، کیفیت و تازگی خود را حفظ می‌نماید. در صورت آلوده شدن انبار یا میوه، می‌توان از طریق کنترل شیمیایی خسارت بیماری را کاهش داد. در این روش از بخار استالدهید، فولیکات (از مواد ضد تنفسی)، کاپتافول، گوگرد یا دی اتیل پیروکاربامات استفاده می‌شود که پوسیدگی‌های قارچی را کنترل می‌کنند. به علت خطراتی که مواد شیمیایی دارند توصیه می‌شود که از مواد شیمیایی حتی الامکان استفاده نشود (سرسیفی، ۱۳۷۸).

نتایج تحقیقات نشان داده است که اشعه ماورائ بنفش با طول موج کوتاه (۱۰۰-۲۸۰ نانومتر) می‌تواند به طور مستقیم قارچ‌ها یا اسپورهای قارچی را از بین ببرد (سرسیفی، ۱۳۷۸).

کنترل بیولوژیکی در ۵۰ سال اخیر بسیار مورد تحقیق قرار گرفته است. از آنجائیکه ترکیبات میکربی تجاری عوامل بیوکنترل با دوز و مقدار کمتری از مواد شیمیایی در کنترل بیماری استفاده شده و نقطه اثر آنها باعث کاهش احتمال ایجاد مقاومت در بیمارگرها می‌گردد جانشین مناسبی در روش‌های قدیمی کنترل محسوب می‌شوند. گزارش شده است که در شرایط گوناگون ترکیب تعدادی از ایزوله‌های بیوکنترل بهتر کپک خاکستری را کنترل می‌کنند (الاد و فریمن[1]، ۲۰۰۲)

برای کاهش بیماری‌های ناشی از *Botrytis*، کشاورزان کنترل شیمیایی با قارچکش‌ها و اغلب اسپری هفتگی را انجام می‌دهند. استفاده از قارچکش‌ها بدین نحو از لحاظ اقتصادی، سلامت افراد و محیط طبیعی و مدیریت مزرعه غیر قابل قبول است و باید استفاده از آن به حداقل برسد. به این منظور کاربرد قارچکش فقط در زمان نیاز و یا با تلفیق مواد شیمیایی و غیرشیمیایی توصیه می‌شود.

القای مقاومت سیستمیک اکتسابی برای کاهش خسارت *B. cinerea* روی توت‌فرنگی نیز به عنوان یکی از روش‌های کنترل استفاده می‌شود. سالیسیلیک اسید، BTH و INA مقاومت سیستمیک

[1] Freeman

اکتسابی را از طریق یک مکانیزم سیگنال‌دهی مشابه تحریک می‌کنند. به منظور اثبات مقاومت ایجاد شده با علائم مشهود مقاومت، در بسیاری از گیاهان در تحقیقات متعدد، بررسی سطح تجمع سالیسیلیک اسید در بافت‌های مختلف گیاه القاشده، میزان پروتئین‌های وابسته به بیماریزایی و سطح فعالیت آنها در مقایسه با گیاهان کنترل و بررسی ژنومی گیاهان و ژن‌های مقاومت در گیاه انجام شده است و در بسیاری از موارد نتایج آزمایشات، القای مقاومت را در اثر تیمارهای مختلف اثبات کرده‌اند.

در این تحقیق تیمارهای مختلف تریکودرما و سالیسیلیک اسید به منظور بررسی تاثیر آنها در کنترل کپک خاکستری و امکان کنترل غیرشیمیایی آن در روی توت‌فرنگی و القای مقاومت، استفاده شده و همزمان، تاثیر آنها در آزمایشگاه به طور مستقیم بر روی قارچ عامل بیماری، *B. cinerea*، نیز مورد بررسی قرار گرفته است.

همچنین به منظور بررسی امکان القای مقاومت در گیاهان توت‌فرنگی با علام مشهود مقاومت به وسیله تیمارهای مختلف سالیسیلیک اسید انجام شده، میزان فعالیت آنزیم کیتیناز در گیاهان تیمار شده به عنوان شاخص مقاومت مورد بررسی قرار گرفته است.

فصل اول

بررسی منابع

۱- بررسی منابع

۱-۱- تاریخچه کشت توت‌فرنگی در جهان و ایران

توت‌فرنگی در قرن چهارم به واسطه خواص دارویی آن شناخته شد. در اوایل قرن هجدهم، اجداد توت‌فرنگی از دو نیمکره شمالی و جنوبی در اروپا، با هم تلاقی داده شدند و جنس توت‌فرنگی درشت میوه امروزی را به وجود آوردند. توت‌فرنگی‌های موجود در بازارهای سراسر دنیا از گونه *Fragaria ananassa* می‌باشند.

توت‌فرنگی اصلاح‌شده در زمان صدارت اتابک از اروپا به ایران آورده شده است و یکی از ارقام موجود در ایران رقم اتابکی است که در گرگان، تهران، ارومیه و دزفول کشت و کار می‌گردد.

در سیستم مرسوم در استان کردستان، توت‌فرنگی در پائیز کاشته می‌شود و در بهار دو سال بعد با گذشت ۱۸ ماه، اولین محصول آن برداشت می‌گردد. قریب به ده هزار نفر از ساکنان روستاهای استان کردستان به کشت و کار توت‌فرنگی مشغول هستند. حدود ٦۰ درصد تولید توت‌فرنگی استان کردستان به‌صورت میوه تازه در اکثر نقاط ایران به فروش می‌رسد.

علاوه بر میوه، علوفه سبز توت‌فرنگی، منبعی برای تعلیف دام است و ارزش کیفی آن بالاتر از کاه و بسیاری از گیاهان مرتعی است و از نظر ارزش پروتئینی، ۱/٤ علوفه یونجه ارزش دارد.

در استان کردستان از نیمه دوم اردیبهشت تا اواخر خرداد میوه توت‌فرنگی برداشت می‌شود. از هر هکتار مزرعه توت‌فرنگی در این استان، می‌توان به طور متوسط ده تن محصول برداشت کرد. استان گلستان از نظر تولید توت‌فرنگی با مزارع حدود ۵۰۰ هکتار، پس از استان کردستان قرار دارد.

۱-۲- ویژگی‌های توت‌فرنگی از نظر گیاه‌شناسی

توت‌فرنگی از گیاهان نهاندانه دولپه‌ای، جداگلبرگ و از خانواده گل سرخیان یا *Rosaceae* و جنس *Fragaria* می‌باشد. توت‌فرنگی گیاهی علفی و چند ساله است و چون می‌تواند به وسیله ساقه‌های نابجا تکثیر یابد، گیاه حالت دائمی پیدا می‌کند.

با تشکیل استولون یا دستک، توت‌فرنگی می‌تواند به طریقه غیرجنسی تکثیر یابد. استولون‌ها تحت تاثیر طول روز بلند با ١٤ ساعت روشنایی و افزایش درجه حرارت شروع به رشد می‌کنند و بوته‌های جدید با ریشه‌های نابجا به وجود می‌آورند.

ریشه‌ها وظیفه جذب و رساندن مواد غذایی و آب را به قسمت‌های هوایی گیاه به‌عهده دارند. به‌علاوه در توت‌فرنگی ریشه‌ها به عنوان اندام‌های ذخیره‌ای در آخر تابستان کربوهیدرات‌های اضافی را در خود ذخیره کرده و این مواد برای رشد رویشی گیاه در بهار سال بعد مورد استفاده قرار می‌گیرد.

برگ‌ها معمولا شانه‌ای و دارای یک دمبرگ و یک پهنک سه برگچه‌ای هستند. عمر برگ‌های توت‌فرنگی به‌طور متوسط ٥٦ روز است که در ارقام مختلف بین ۲۱ تا ۷۷ روز متفاوت می‌باشد. شکل پهنک برگ به اشکال مختلف بیضی کشیده تا گرد بوده و فرم آن برحسب واریته، صاف و محدب یا لوله‌ای می‌باشد. حاشیه پهنک کنگره‌دار یا صاف است. فرم و شکل و رنگ برای شناسایی ارقام مختلف از مطمئن‌ترین صفات به‌شمار می‌آیند.

گل‌ها در توت‌فرنگی به‌صورت گل‌آذین خوشه‌ای و توسط دمگل اصلی از محل طوقه گیاه ظاهر می‌شوند. هر گل توت‌فرنگی در حالت معمولی دارای پنج گلبرگ، به اشکال مختلف صاف، پهن و گرد می‌باشد. طوقه شامل یک قسمت درونی است که به وسیله حلقه آوندی احاطه شده است. این بخش از مغز و یک لایه نازک کامبیومی که آن‌را احاطه کرده، تشکیل شده است.

قسمت خوراکی توت‌فرنگی که از انواع میوه مجتمع است، نهنج برجسته و متورمی است که برروی آن میوه‌های حقیقی که فندقه نامیده می‌شود، قرار دارند. نهنج از یک لایه اپیدرمی، یک کورتکس و مغز تشکیل شده است. رشد میوه بستگی زیادی به‌وجود بذور بر سطح نهنج دارد. هرچه تعداد و وزن فندقه بر روی نهنج بیشتر باشد، وزن میوه نیز بیشتر خواهد بود. تشکیل و تکامل میوه بدین‌ترتیب می‌باشد که پس از ظهور گل‌ها و انجام عمل گرده‌افشانی، برجستگی سبز کم‌رنگی به‌وجود می‌آید. این برجستگی همان نهنج یا میوه مجتمع توت‌فرنگی است. میوه مراحل رشد و تکامل خود را به‌تدریج طی کرده و با تغییر رنگ به مرور به‌مرحله رسیدن نزدیک می‌شود (سرسیفی، ۱۳۷۸).

۱-۳- مهمترین ارقام توت‌فرنگی

یکی از مهمترین ارقام توت‌فرنگی، رقم *Kent* می‌باشد که میان‌رس با عملکرد بالا و بسیار مقاوم به سرمای زمستان است و میوه آن دارای سفتی متوسط به‌رنگ قرمز ملایم می‌باشد. از ارقام دیگر می‌توان به ارقام زیر اشاره نمود:

Allisso, Fresno, Seguia, Ardmore, Tioga, Tenbeuty, Missionerry, Macdonance, Cat Skill, Black more, Chanddler, Kurdistan, Yallowa, Annapolis, Vestar, Selva, Idea, Florence, Eros, Elsanta, Commander, Catalina, Tristar, Tongo, Mac, Eris

در استان کردستان رقم غالب زیرکشت، رقم کردستان نامیده می‌شود. این واریته به‌خوبی با آب و هوای منطقه سازش پیدا کرده است. در ایستگاه تحقیقاتی گریزه، پژوهش‌های زیادی در مورد این رقم صورت گرفته است.