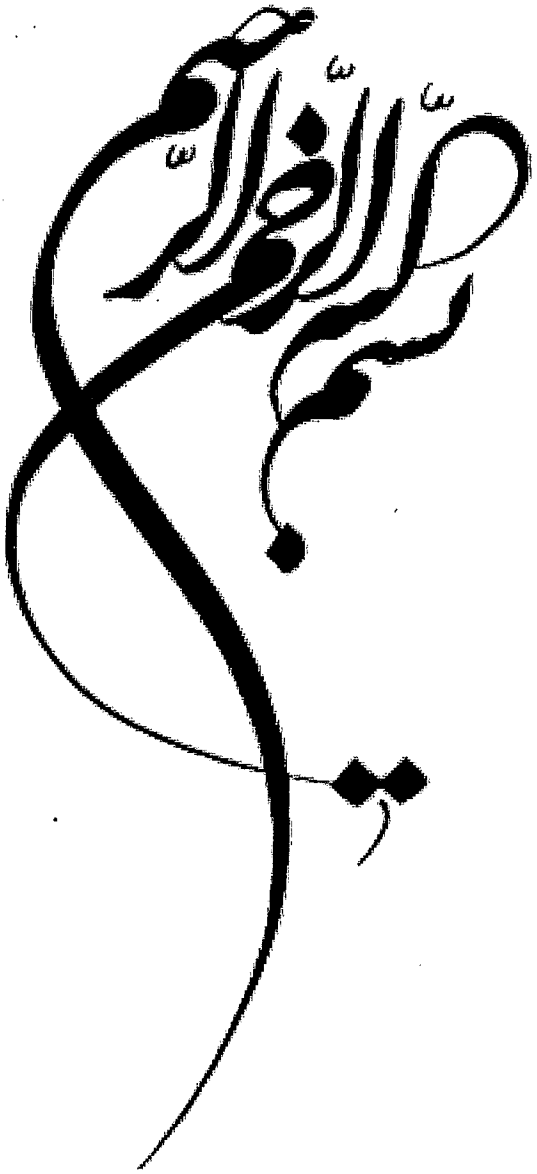
اسکن شد
تاریخ :
اپراتور :




۱۲۹۷۴

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم
گروه زیست شناسی

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته‌ی زیست شناسی - میکروبیولوژی

# بیوکنترل قارچ بیماریزای رایزوکتونیا سولانی در سیب‌زمینی

استادان راهنما:
دکتر ایرج نحوی
دکتر غلامرضا بلالی

پژوهشگر:
مهدی نورنژاد

مرکز اطلاعات مدارک علمی
۱۳۸۸/۱۰/۲۷

اردیبهشت ماه ۱۳۸۸

۱۲۹۷۶۴

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات
و نوآوری های ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه اصفهان است.

شیوه نگارش پایان نامه رعایت شده است.
تحصیلات تکمیلی دانشگاه اصفهان


دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم

گروه زیست شناسی


# پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست شناسی- میکروبیولوژی

## آقای مهدی نورنژاد تحت عنوان

## بیوکنترل قارچ بیماریزای رایزوکتونیا سولانی در سیب‌زمینی

در تاریخ ۱۳۸۸/۲/۲۳ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استادان راهنمای پایان نامه دکتر ایرج نحوی با مرتبه ی علمی استاد امضا

دکتر غلامرضا بلالی با مرتبه‌ی علمی دانشیار امضا

۲- استاد داور داخل گروه دکتر گیتی امتیازی با مرتبه ی علمی استاد امضا

۳- استاد داور خارج از گروه دکتر محسن مبینی دهکردی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

امضای مدیر گروه

گروه زیست شناسی
Department Of Biology

**پرواز اعتماد را با یکدیگر تجربه کنیم**

**وگرنه می‌شکنیم بال‌های دوستیمان را.**

پیش از هر چیز از **پدر و مادر مهربانم** که تمامی لحظات زندگی خود را مدیون گذشت ها و فداکاری های آن ها هستم تشکر و قدردانی می نمایم. از **خواهران و برادران عزیزم** نیز به پاس تمامی محبت ها و همراهی هایشان تشکر می کنم. هم چنین از همسر بردبارم که در تمام طول این پایان‌نامه همراهم بود بسیار ممنونم.

از استاد راهنمای دوست داشتنی و بزرگوارم **جناب آقای دکتر ایرج نحوی** که در تمام مراحل تهیه ی پایان نامه از راهنمایی های ارزنده و نصایح پدرانه‌ی ایشان بهره مند شدم و استاد عزیز دیگرم **جناب آقای دکتر غلامرضا بلالی** که بسیار صمیمانه و مانند یک دوست مرا راهنمایی کردند نهایت تشکر و قدردانی را دارم.

از سرکار خانم دکتر امتیازی که داوری داخل گروه و جناب آقای دکتر مبینی دهکردی که داوری خارج گروه این پایان نامه را بر عهده داشتند نیز تشکر می نمایم.

از تمامی اساتید گروه زیست شناسی به ویژه اساتید گروه میکروب شناسی سرکار خانم دکتر امتیازی، جناب آقای دکتر بوذری، جناب آقای دکتر روغنیان و جناب آقای دکتر زرکش که در دوران کارشناسی و کارشناسی ارشد در محضر ایشان کسب علم نمودم تشکر می نمایم.

هم چنین از مدیریت محترم گروه زیست شناسی جناب آقای دکتر قادریان و تمامی کارکنان محترم گروه بویژه جناب آقای دباغ، سرکار خانم یاوری، سرکار خانم حکمیان و جناب آقای جلایر و کارکنان انستیتو بیوتکنولوژی دانشگاه اصفهان که صمیمانه امکانات بسیاری را در اختیارم قرار دادند بخصوص جناب آقای مهندس نوروزی، مهندس شیری و آقای طاهری کمال تشکر را دارم.

هم چنین از تمامی دوستان و هم کلاسی های عزیزم، محمدعلی بامدادی‌نژاد، امین قلعه‌ای، بردیا ثمره، داریوش شکری، ناصر جمالی، عبدالکریم سالکی، مهدی سجادی، سیاوش عزیزی، علیرضا قاضی‌مراد و خانم ها ولی‌زاده، شکرانی، جناب، میسمی، صالح و سایر دوستان عزیزم که مهربانی های خالصانه‌ی آن ها را هرگز فراموش نمی کنم سپاسگزارم.

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزتر از جانم:

که برایم اسطوره انسانند.

برادران و خواهران مهربانم:

که به معنای واقعی هم‌خون‌اند.

و

همسر بسیار عزیزم:

که مفهوم بردباری را معنا می‌کند.

## چکیده

رایزوکتونیا سولانی یکی از مهمترین بیماریزاهای گیاهی است که در چندین محصول زراعی از جمله خیار، گلهای زینتی و سیب زمینی ایجاد بیماری می‌کند. این قارچ یکی از مهمترین عوامل کاهش در کمیت و کیفیت و همچنین مرگ گیاهچه ( damping off ) در مزارع سیب‌زمینی می‌باشد. این قارچ دارای چندین گروه آناستوموزی است که از این بین گروه آناستوموزی ۳ ( AG3 ) باعث بیماری black scurf و شانکر ساقه، ریشه و استولن در سیب‌زمینی می‌شود. امروزه کشاورزان از مواد شیمیایی مانند آزوکسی‌تروبین و فلوتولانیل برای کنترل این قارچ استفاده می‌کنند. این مواد آلوده‌کننده محیط بوده و به سختی تجزیه می‌شوند. و یا روش‌های دیگری مانند کشت متناوب و یا استفاده از گیاهان مقاوم بکار می‌رود. مجموعا این روش‌ها یا پرهزینه و اثرات مخرب زیست‌محیطی دارند یا عملا چندان موثر نیستند. گزارش‌های بسیاری مبنی بر اثرات آنتاگونیستی برخی باکتری‌ها و قارچ‌هایی مانند سراشیا مارسسنس، تریکودرما و سودوموناس‌های مختلف علیه قارچ‌های پاتوژن گیاهی از جمله رایزوکتونیا سولانی وجود دارد که این عمل را با چندین مکانیسم از قبیل تولید آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچ، تولید سیدروفورها، رقابت برای غذا و فضا و یا القای مقاومت سیستمیک در گیاهان انجام می‌دهند. به همین دلیل به نظر می‌رسد بیوکنترل بهترین، ارزانترین و ایمن‌ترین راه جایگزین باشد.

هدف از این تحقیق جداسازی و بررسی تاثیر قارچ‌ها و باکتری‌ها به عنوان واحدهای بیوکنترلی بر روی قارچ بیماریزای رایزوکتونیا سولانی می‌باشد.

در این تحقیق ۶ نژاد از قارچ رایزوکتونیا سولانی AG3 مستقیما و از سختینه‌های روی ۶ رقم غده سیب‌زمینی‌های آلوده متعلق به مزارع رزوه از شهرستان چادگان جدا شده و به عنوان گروه آناستوموزی ۳ (AG3) شناسایی گردیدند. سپس آزمون بیماری‌زایی نیز صورت گرفت که همگی بیماریزا بودند و برروی غده‌های دختری ایجاد سختینه کردند.

جهت کنترل این قارچ از ۴ میکروارگانیسم استفاده شد. ابتدا باکتری سودوموناس آئروژینوزا PTCC1430 با کشت دوتایی بررسی شد. در مرحله بعد سوپرناتانت آن با سانتریفیوژ جدا شده و اثر آنتاگونیستی آن بررسی گردید. در آخر پیگمان پیوسیانین آن با استفاده از HCl و کلروفرم جدا شده و اثر آن برروی جدایه‌های قارچ بررسی شد.

در مرحله دوم اثر آنتاگونیستی سراشیا مارسسنس PTCC1111 با دو روش سنجیده شد. سپس در مرحله سوم از قارچ تریکودرما استفاده شد و اثر آنتاگونیستی آن بررسی شد. سپس با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی گونه آن با نام تریکودرما هرزیانوم شناسایی گردید.

به عنوان میکروارگانیسم چهارم یک باکتری مستقیما از خاک جدا شده و بررسی گردید. این باکتری با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی و آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شد که شباهت بیشتری به استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس داشت. در انتها آنالیز آنزیمی انجام شد و مشاهده گردید قارچ تریکودرما هرزیانوم بیشتر از بقیه میکروارگانیسم‌های مورد استفاده و باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس کمتر از همه آنزیم کیتیناز تولید می‌کنند.

در آخر نتیجه‌ای که حاصل شد نشان داد که بیشترین اثر را قارچ تریکودرما هرزیانوم و کمترین اثر را باکتری استافیلوکوکوس ساپروفیتیکوس داشتند.

واژه‌های کلیدی: بیوکنترل- رایزوکتونیا سولانی- سختینه- واحد بیوکنترل- اثر آنتاگونیستی- سودوموناس آئروژینوزا- تریکودرما- سراشیا مارسسنس- کیتیناز

## فهرست مطالب

**عنوان** **صفحه**


**فصل اول: مقدمه و مروری بر منابع**

۱-۱ مقدمه ..... ۱

۱-۲ رایزوکتونیا سولانی ..... ۳

۱-۲-۱ طیف میزبان و پراکندگی ..... ۵

۱-۲-۲ فیزیولوژی قارچ رایزوکتونیا سولانی و نحوه طبقه‌بندی آن ..... ۹

۱-۲-۳ گروه‌های آناستوموزی جنس‌های دو هسته‌ای و چند هسته‌ای از رایزوکتونیا ..... ۱۴

۱-۳ بیماری‌های رایزوکتونیا سولانی وعلائم آن‌ها ..... ۱۷

۱-۳-۱ بیماری‌های رایزوکتونیا در سیب‌زمینی ..... ۲۱

۱-۳-۱-۱ چرخه بیماری و علائم ..... ۲۲

۱-۴ اکولوژی و چرخه زندگی رایزوکتونیا سولانی ..... ۲۵

۱-۵ اپیدمیولوژی ..... ۲۸

۱-۶ مدیریت آلودگی با قارچ رایزوکتونیا سولانی ..... ۲۹

۱-۶-۱ بیوکنترل ..... ۳۴

۱-۶-۱-۱ آنتی‌بیوزیس ..... ۳۵

۱-۶-۱-۲ کنترل از طریق رقابت برای فضا و غذا ..... ۴۰

۱-۶-۱-۳ کنترل از طریق القای مقاومت سیستمیک ..... ۴۱

۱-۶-۱-۴ کنترل از طریق رقابت برای آهن ..... ۴۳

۱-۶-۱-۵ کنترل از طریق پارازیتیسم ..... ۴۴

۱-۷ سودوموناس‌ها ..... ۴۴

۱-۷-۱ سودوموناس‌های فلورسنت ..... ۴۴

۱-۷-۲ سودوموناس آئروژینوزا ..... ۴۶

۱-۷-۲-۱ پیگمان پیوسیانین ..... ۴۸

۱-۷-۲-۲ عمل آنتی‌بیوتیکی پیوسیانین ..... ۵۱

۱-۸ سراشیا مارسسنس ..... ۵۱

عنوان | صفحه


۱-۸-۱ پیگمان پرودی‌ژیوزین ..... ۵۴
۱-۹ قارچ تریکودرما ..... ۵۶
۱-۹-۱ کاربرد صنعتی تریکودرما ..... ۵۸
۱-۹-۲ تریکودرما به عنوان واحد بیوکنترلی ..... ۵۸
۱-۱۰ مزایای رایزوکتونیا سولانی ..... ۶۲
۱-۱۱ اهمیت و اهداف ..... ۶۳


**فصل دوم: مواد و روش ها**


۲-۱ مواد و وسایل مورد استفاده ..... ۶۴
۲-۱-۱ مواد ..... ۶۴
۲-۱-۲ محیط‌های کشت ..... ۶۵
۲-۱-۳ سویه‌های باکتری و قارچ مورد استفاده ..... ۶۶
۲-۱-۴ وسایل و دستگاه‌ها ..... ۶۶
۲-۲ طرز تهیه ی محیط های کشت ..... ۶۷
۲-۲-۱ محیط کشت نوترینت آگار(NA ) ..... ۶۷
۲-۲-۲ محیط کشت نوترینت براث (NB ) ..... ۶۸
۲-۲-۳ محیط های کشت لوریا برتانی ( LB) ..... ۶۸
۲-۲-۴ محیط کشت King A آگار ..... ۶۹
۲-۲-۵ محیط کشت PDA ..... ۶۹
۲-۲-۶ محیط کشت Water Agar ..... ۶۹
۲-۲-۷ محیط کشت CCMA ..... ۷۰
۲-۲-۸ روش تهیه کیتین کلوئیدی ..... ۷۱
۲-۲-۹ روش تهیه بافر سدیم فسفات با pH های متفاوت ..... ۷۲
۲-۲-۱۰ محیط کشت اختصاصی CA ..... ۷۳
۲-۲-۱۱ محیط کشت پایه نمکی M9 ..... ۷۴

عنوان | صفحه


۲-۲-۱۲ تهیه استاندارد مک فارلند ..... ۷۴
۲-۳ مراحل انجام تحقیق ..... ۷۵
۲-۳-۱ جداسازی رایزوکتونیا سولانی بیماریزا از سیب‌زمینی‌های آلوده ..... ۷۶
۲-۳-۲ تست بیماریزایی جدایه‌های بدست آمده ..... ۷۷
۲-۳-۳ جداسازی آنتاگونیست رایزوکتونیا سولانی از خاک ..... ۷۸
۲-۳-۴ شناسایی آنتاگونیست‌های بدست آمده ..... ۷۹
۲-۳-۵ تست عمل آنتاگونیسمی آنتاگونیست بدست آمده بر روی رایزوکتونیا سولانی ..... ۷۹
۲-۳-۶ تست عمل آنتاگونیسمی قارچ تریکودرما بر روی رایزوکتونیا سولانی ..... ۸۰
۲-۳-۷ شناسایی گونه تریکودرمای استفاده شده ..... ۸۰
۲-۳-۸ تست عمل آنتاگونیسمی باکتری سراشیا مارسسنس PTCC 1111 بر روی جدایه‌های رایزوکتونیا سولانی ..... ۸۱
۲-۳-۹ تست عمل آنتاگونیسمی باکتری سودوموناس آئروژینوزا PTCC1430 بر روی جدایه‌های رایزوکتونیا سولانی ..... ۸۲
۲-۳-۱۰ آزمایش اثر سوپرناتانت باکتری سودوموناس آئروژینوزا PTCC1430 بر روی جدایه‌های رایزوکتونیا سولانی ..... ۸۲
۲-۳-۱۱ جداسازی پیگمان پیوسیانین و آزمایش اثر آن برروی جدایه‌های رایزوکتونیا سولانی ..... ۸۳
۲-۳-۱۲ آنالیز آنزیمی آنتاگونیست‌های مورد استفاده به منظور بررسی تولید آنزیم کیتیناز روی محیط‌های جامد و مایع ..... ۸۵
۲-۳-۱۲-۱ آماده‌سازی کشت‌ها و نمونه‌ها ..... ۸۵
۲-۳-۱۲-۲ آزمایش فعالیت آنزیمی میکروارگانیسم‌های مورد استفاده ..... ۸۶
۲-۳-۱۲-۳ روش سنجش قند احیاکننده با تکنیک ( DNSA ( Bernfeld ..... ۸۷
۲-۴ آنالیزهای آماری ..... ۸۸


**فصل سوم: نتایج و مشاهدات**


۳-۱ مشخصات قارچ عامل بیماری رایزوکتونیایی در سیب‌زمینی ( *R. solani* kuhn AG3 ) ..... ۸۹

عنوان | صفحه


۳-۱-۱ توانایی بیماریزایی جدایه‌های بدست آمده ..... ۹۲
۳-۲ شناسایی و مشخصات آنتاگونیست بدست آمده از خاک ..... ۹۳
۳-۲-۱ اثر آنتاگونیستی باکتری استاف‌فرم برروی رایزوکتونیا سولانی AG3 ..... ۹۵
۳-۳ اثر آنتاگونیستی قارچ تریکودرما برروی رایزوکتونیا سولانی AG3 ..... ۹۷
۳-۳-۱ شناسایی و مشخصات گونه تریکودرمای مورد استفاده ..... ۱۰۴
۳-۴ اثر آنتاگونیسمی باکتری سراشیا مارسسنس PTCC 1111 بر روی جدایه‌های رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۰۴
۳-۵ توانایی باکتری سودوموناس آئروژینوزا در مهار رشد قارچ رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۱۰
۳-۵-۱ اثر مهاری سوپرناتانت باکتری سودوموناس آئروژینوزا برروی رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۱۱
۳-۵-۲ اثر مهاری پیگمان پیوسیانین برروی قارچ رایزوکتونیا سولانیAG3 ..... ۱۱۲
۳-۶ آنالیز آنزیمی آنتاگونیست‌های مورد استفاده به منظور بررسی تولید آنزیم کیتیناز روی محیط‌های جامد و مایع ..... ۱۱۴


**فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری**


۴-۱ جداسازی و بررسی توان بیماریزایی جدایه‌های رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۲۳
۴-۲ میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه ..... ۱۲۳
۴-۳ بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری سودوموناس آئروژینوزا و پیگمان آن برروی رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۲۳
۴-۴ بررسی اثر آنتاگونیستی قارچ تریکودرما هرزیانوم برروی رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۲۶
۴-۵ بررسی اثر مهاری سراشیا مارسسنس برروی رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۲۸
۴-۶ بررسی اثر آنتاگونیستی باکتری استاف‌فرم برروی رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۲۹
۴-۷ آنالیز آنزیمی میکروارگانیسم‌های مورد مطالعه ..... ۱۳۰
۴-۸ نتیجه‌گیری کلی ..... ۱۳۱
۴-۹ پیشنهادات ..... ۱۳۲
**پیوست ها** ..... ۱۳۳
**منابع و مآخذ** ..... ۱۳۷

## فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

**فصل اول**


شکل ۱-۱ تصاویری از قارچ رایزوکتونیا سولانی ..... ۴

شکل ۱-۲ تصویر میکروسکوپی از بازیدیوم رایزوکتونیا سولانی ..... ۵

شکل ۱-۳ میکروگراف‌های الکترونی از روزنه دیواره قارچ رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۱

شکل ۱-۴ تصویر میکروسکوپی از هیف قارچ جنس رایزوکتونیا ..... ۱۲

شکل ۱-۵ تصویر میکروسکوپی از واکنش C3 یا ادغام کامل ( self-pairing ) ..... ۱۵

شکل ۱- ۶ تصویر میکروسکوپی از واکنش C2 یا رد ( rejection ) ..... ۱۶

شکل ۱-۷ تصویر غده‌های آلوده با رایزوکتونیا سولانی و دفرمه شدن آنها و سختینه ..... ۱۸

شکل ۱-۸ تصویر بوجود آمدن بازیدیوسپورها ( لایه کرکی سفید ) در انتهای ساقه ..... ۲۰

شکل ۱-۹ شانکر ساقه در سیب‌زمینی ..... ۲۳

شکل ۱-۱۰ شمایی کلی از مراحل مختلف بیماری رایزوکتونیا سولانی در سیب‌زمینی ..... ۲۵

شکل ۱-۱۱ تصاویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی از سختینه قارچ رایزوکتونیا سولانی ..... ۲۷

شکل ۱-۱۲ شمایی از میزان آلودگی غده‌های سیب‌زمینی از ۱ تا ۱۵ درصد با سختینه رایزوکتونیا سولانی جهت استفاده در کشت مناسب ..... ۳۰

شکل ۱-۱۳ مولکول های سیگنال در باکتری سودوموناس آئروژینوزا ..... ۴۷

شکل ۱-۱۴ فرمول شیمیایی پیگمان پیوسیانین ..... ۴۸

شکل ۱-۱۵ مراحل سنتز پیوسیانین در سودوموناس آئروژینوزا ..... ۵۰

شکل ۱-۱۶ مورفولوژی باکتری سراشیا مارسسنس در دو محیط مایع و جامد ..... ۵۳

شکل ۱۷-۱ شمایی از بیوسنتز پرودی ژیوزین توسط باکتری سراشیا مارسسنس ..... ۵۵

شکل ۱-۱۷ هیف رایزوکتونیا سولانی که تحت تاثیر پارازیتیسم توسط تریکودرما قرار گرفته است ..... ۶۰

شکل ۱-۱۸ میکروگراف الکترونی از مراحل نفوذ هیف‌های تریکودرما به درون هیف‌های رایزوکتونیا سولانی ..... ۶۱


**فصل دوم**


شکل ۲- ۱ کیتین کلوئیدی در بافر سدیم فسفات ..... ۷۲

عنوان | صفحه

شکل ۲-۲ جداسازی پیوسیانین ..... ۸۴

**فصل سوم**

شکل ۳-۱ جدایه‌های رایزوکتونیا سولانی بدست آمده از غده سیب‌زمینی‌های آلوده ..... ۹۰ و ۹۱
شکل ۳-۲ نمونه‌ای از غده‌های آلوده به سختینه قارچ ..... ۹۲
شکل ۳-۳ توانایی بیماریزایی جدایه‌های بدست آمده در ایجاد سختینه روی غده‌های سیب‌زمینی ..... ۹۳
شکل ۳-۴ تصویر ماکروسکوپی و میکروسکوپی آنتاگونیست بدست‌آمده از خاک پس از ۷ روز ..... ۹۴
شکل۳-۵ اثر آنتاگونیستی باکتری استاف‌فرم برروی رایزوکتونیا سولانی در پلیت ۷۰ میلی‌متری، محیط کشت PDA و پس از ۷ روز ..... ۹۶
شکل۳-۶ اثر مهاری باکتری استاف‌فرم برروی رایزوکتونیا سولانی به روش کشت دوتایی ..... ۹۷
شکل ۳-۷ اثر مهاری قارچ تریکودرما برروی جدایه At1 در محیط PDA ..... ۹۸
شکل ۳-۸ اثر مهاری قارچ تریکودرما برروی جدایه At2 در محیط PDA ..... ۹۹
شکل ۳-۹ اثر مهاری قارچ تریکودرما برروی جدایه At3 در محیط PDA ..... ۱۰۰
شکل ۳-۱۰ اثر مهاری قارچ تریکودرما برروی جدایه At4 در محیط PDA ..... ۱۰۱
شکل ۳-۱۱ اثر مهاری قارچ تریکودرما برروی جدایه At5 در محیط PDA ..... ۱۰۲
شکل ۳-۱۲ اثر مهاری قارچ تریکودرما برروی جدایه At6 در محیط PDA ..... ۱۰۳
شکل۳-۱۳ اثر آنتاگونیسمی سراشیا مارسسنس علیه رازوکتونیا سولانی در کشت دوتایی در محیط کشت NA پس از ۷ روز ..... ۱۰۴
شکل ۳-۱۴ اثر مهاری سراشیا مارسسنس علیه رایزوکتونیا سولانی با روش Someya و همکاران در محیط کشت NA پس از ۱۴ روز ..... ۱۰۵ و ۱۰۶
شکل ۳-۱۵ اثر مهاری سراشیا برروی جدایه‌های رایزوکتونیا ..... ۱۰۶، ۱۰۷ و ۱۰۸
شکل ۳-۱۶ مهار رشد رایزوکتونیا سولانی بوسط باکتری سراشیا مارسسنس ..... ۱۰۹
شکل۳-۱۷ اثر مهاری باکتری کامل سودوموناس آئروژینوزا برروی رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۱۰
شکل ۳-۱۸ اثر مهاری سوپرناتانت باکتری برروی رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۱۱
شکل ۳-۱۹ اثر آنتاگونیستی سوپرناتانت سودوموناس آئروژینوزا برروی رایزوکتونیا سولانی در محیط PDA .... ۱۱۲

عنوان | صفحه

شکل ۳-۲۰ اثر آنتاگونیستی رنگدانه پیوسیانین بر رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۱۳
شکل ۳-۲۱ اثر مهاری رنگدانه پیوسیانین برروی قارچ رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۱۳
شکل ۳-۲۲ توانایی رشد سراشیا مارسسنس برروی محیط CCMA ..... ۱۱۴
شکل۳-۲۳ هاله‌های شفاف روی محیط کشت اختصاصیCA در اثر تولید آنزیم کیتیناز ..... ۱۱۵
شکل ۳-۲۴ توانایی رشد سراشیا مارسسنس در محیط کشت مایع اختصاصی CB ..... ۱۱۶
شکل ۳-۲۵ نمودار استاندارد با استفاده از میزان جذب ۰/۵ تا ۲ گرم از ماده GlcNAc ..... ۱۱۷
شکل۳-۲۴ سیر تولید ماده GlcNAc توسط سراشیا مارسسنس در محیط CB در مدت ۵ روز ..... ۱۱۸
شکل۳-۲۵ سیر تولید ماده GlcNAc توسط سودوموناس آئروژینوزا در محیط CB در مدت ۵ روز ..... ۱۱۸
شکل۳-۲۶ سیر تولید ماده GlcNAc توسط تریکودرما هرزیانوم در محیط CB در مدت ۵ روز ..... ۱۱۹
شکل۳-۲۷ سیر تولید ماده GlcNAc توسط باکتری استاف‌فرم در محیط CB در مدت ۵ روز ..... ۱۱۹

## فهرست جدول‌ها

**عنوان** **صفحه**

**فصل اول**

جدول ۱-۱ طیف میزبان و بیماریهای رایزوکتونیا سولانی بر اساس گروههای آناستوموزی آن ..... ۶
جدول ۱-۲ : طبقه‌بندی قارچ تریکودرما ..... ۵۷

**فصل دوم**

جدول ۲-۱ مواد و مقادیر لازم برای تهیه استاندارد مک‌فارلند ..... ۷۵
جدول ۲-۲ طرح بلوک‌های تصادفی قرارگیری گلدان‌ها ..... ۷۷

**فصل سوم**

جدول ۳-۱ آزمون‌های بیوشیمیایی انجام شده جهت شناسایی آنتاگونیست جداشده از خاک ..... ۹۵
جدول۳-۲ میزان مهار رشد جدایه‌های قارچ رایزوکتونیا سولانی توسط باکتری سراشیا مارسسنس ..... ۱۰۹

**پیوست‌ها**

جدول ۱ مواد و مقادیر لازم از $NaH_2PO_4$ و $Na_2HPO_4$ جهت ساخت pH های مختلف از بافر سدیم فسفات ..... ۱۴۵
جدول ۲ مواد و روش ساخت محیط کشت اختصاصی جهت جداسازی قارچ رایزوکتونیا سولانی ..... ۱۴۶
جدول۳ آنالیز آنزیمی سراشیا مارسسنس جهت بررسی تولید کیتیناز ..... ۱۴۷
جدول۴ آنالیز آنزیمی سودوموناس آئروژینوزا جهت بررسی تولید کیتیناز ..... ۱۴۷
جدول۵ آنالیز آنزیمی تریکودرما هرزیانوم جهت بررسی تولید کیتیناز ..... ۱۴۸
جدول۶ آنالیز آنزیمی باکتری استاف‌فرم جهت بررسی تولید کیتیناز ..... ۱۴۸

# فصل اول

# مقدمه و مروری بر منابع

## ۱-۱ مقدمه

قارچ‌ها زیان‌های اقتصادی فراوانی به محصولات کشاورزی می‌زنند. برای مثال قارچ‌هایی مانندفیتیوم، فوزاریوم، رایزوکتونیا و ... از جمله قارچ‌های بیماری زای مهم گیاهی محسوب می شوند.

رایزوکتونیا سولانی[1] یکی از مهمترین قارچ های پاتوژن گیاهی است که در محصولات متعددی مانند سیب‌زمینی، گوجه،چغندر و نیز گیاهان زینتی ایجاد بیماری می کند. این قارچ، پاتوژنی است از رده Basidiomysetes که فاقد اسپور غیرجنسی هستند و از طریق قطعه قطعه شدن میسلیوم تکثیر می‌شوند. *R. solani* در تمام مناطق دنیا وجود دارد و عامل اصلی کاهش کیفیت و کمیت محصول و همچنین عامل مرگ گیاهچه[2] در مزارع می‌باشد. از این رو از نظر اقتصادی بسیار مهم می باشد (Campion و همکاران ۲۰۰۳، Deacon ۱۹۹۷، Pung و همکاران ۲۰۰۷ و Someya و همکاران ۲۰۰۰).

---

1. *Rhizoctonia solani*
2. Damping off

*R. solani* بر اساس نوع واکنش هیف‌ها با هم به چندین گروه آناستوموزی[1] ( AGs ) تقسیم می‌شود. هر کدام از این گروه ها در گیاهان مختلفی ایجاد بیماری می‌کنند، مثلا AG1 در برنج و ذرت، AG2 در توت فرنگی و AG3 در سیب‌زمینی و تنباکو . بیماری‌های آن در سیب زمینی اولین بار در سال ۱۹۱۳ در امریکا گزارش شد (Cubeta و همکاران ۲۰۰۸، Pung و همکاران ۲۰۰۷). این قارچ عامل چندین بیماری در سیب زمینی می‌باشد، از جمله: Damping off، Black scurf، Stem and Stolon canker. در Damping off در نوک جوانه ها باعث آسیب‌هایی می‌شود که می‌توانند مانع از رشد آنها و تولید گیاه بالغ شوند . همچنین باعث ایجاد اندام های سختی به نام sclerotia یا سختینه (که فرم مقاوم این قارچ است) روی غده سیب زمینی می شود که همان بیماری black scurf است. علائم دیگر این بیماری stem and stolon canker است که در آن آسیب هایی در ساقه درست بالای سطح خاک ایجاد می‌شود و باعث رشد ناکافی و سست شدن ساقه می‌گردد (زمانی ۱۳۶۸، Blazier و همکاران ۲۰۰۴، Brewer و همکاران ۲۰۰۵و Brown ۲۰۰۰). این قارچ از چندین طریق باعث آسیب می‌شود از جمله تولید شبکه‌ای اطراف ریشه و جلوگیری از رسیدن مواد غذایی به گیاه، حمله به جوانه ها و تولید توکسین (Campion و همکاران ۲۰۰۳،Pedras و همکاران ۲۰۰۴وSneh و همکاران ۱۹۹۶).

در حال حاضر در مزارع از مواد شیمیایی برای کنترل این قارچ استفاده می‌شود. قارچ‌کش‌هایی مثل azoxystrobin، flutolanil، fludioxinil، thiophanat-methyl (مصلی‌نژاد و همکاران ۱۳۸۱، ۱۳۸۵ و Boogert و همکاران ۲۰۰۴). ولی با توجه به اینکه برخی مواد شیمیایی در محیط می‌مانند و تجزیه نمی‌شوند، باعث آلودگی محیط می شوند. به همین دلیل محققان اخیرا به دنبال یافتن راهی جانشین هستند. به نظر می رسد بهترین راه کنترل بیولوژیکی باشد. در تحقیقات از باکتری‌ها و قارچ‌ها برای کنترل این قارچ در سیب زمینی و گیاهان دیگر استفاده شده است. اینها با چندین مکانیسم مانع از بیماری می‌شوند. از جمله :

- باسیلوس سابتیلیس[2] با تولید نوعی پروتئین ضد قارچ(Liu و همکاران ۲۰۰۷ و Mizumoto و همکاران ۲۰۰۷).
- قارچ تریکودرما[3] از طریق پارازیتیسم، تولید کیتیناز(Almeida و همکاران ۲۰۰۷،Kullnig و همکاران ۱۹۹۹وSantamarina و همکاران ۲۰۰۶).

---

1. Anastomosis Group
2. *Bacillus subtilis*
3. *Trichoderma*

- سودوموناس فلورسنس[1] با تولید آنتی بیوتیک(سارانی و همکاران ۱۳۸۶).
- سراشیا مارسسنس[2] با تولید کیتیناز(Someya و همکاران ۲۰۰۰).

از راه‌های دیگری نیز می‌توان استفاده کرد. به عنوان مثال، در تحقیقات از سویه های غیرپاتوژن یا کمترپاتوژن *R.solani* نیز استفاده می شود. این سویه ها از طریق رقابت برای فضا و غذا و به علت رشد سریعتر در کنترل سویه‌های پاتوژن به کار می‌روند . این سویه‌ها باعث القای مقاومت سیستمیک در گیاه نیز می شوند (Cardinale و همکاران ۲۰۰۷).

همچنین از باکتری‌های مفیدی مثل پانی‌باسیلوس برای کنترل استفاده می‌شود. این باکتری تثبیت ازت انجام می دهد. تولید آمونیاک دارد. به علاوه کیتیناز نیز تولید می‌کند که از این ویژگی در کنترل بیولوژیکی این قارچ استفاده می‌شود (Kavitha و همکاران ۲۰۰۵).

زمینه تحقیقی دیگری که اخیرا مطرح شده استفاده از ترکیب مواد شیمیایی کم ضرر یا بی‌ضرری مثل چیتوزان با واحدهای بیو کنترلی می باشد . این ماده علاوه بر خاصیت ضد قارچی خود ، باعث القای مقاومت سیستمیک در گیاه نیز می شود (Eweis و همکاران ۲۰۰۶ و Prevostو همکاران ۲۰۰۶ ).

## ۱-۲ رایزوکتونیا سولانی

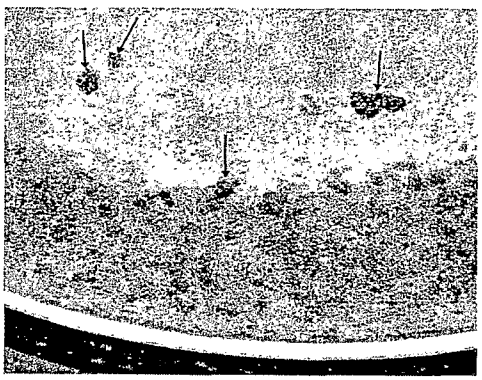
همانطور که پیشتر گفته شد این قارچ، پاتوژنی است از رده Basidiomysetes و راسته Ceratobasidiales که از طریق قطعه قطعه شدن میسلیوم تکثیر می شوند.

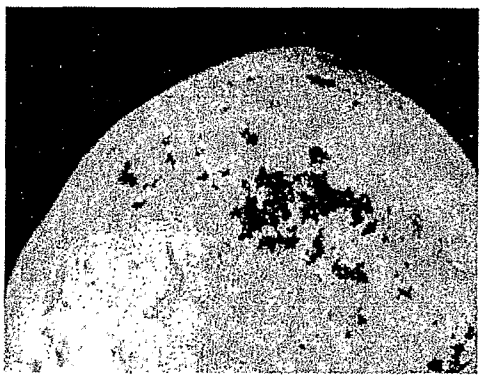
بیشترین سویه های تشخیص داده شده از رایزوکتونیا سولانی توسط فردی به نام Julius Kühn در سال ۱۸۵۸ از روی سیب زمینی بوده است. به همین دلیل در بسیاری مقالات از این قارچ به عنوان *Rhizoctonia Kühn solani* نام برده می‌شود. نامهای قبلی رایزوکتونیا سولانی، *Pellicularia filamentosa* و *Corticium solani* بوده است. (Naito ۲۰۰۶ و Walker ۱۹۵۲ و Farr و همکاران ۱۹۸۹)

این قارچ بازیدیومیستی است که فاقد اسپور غیر جنسی[1] ( کونیدی[2] ) است و فقط گاهی و در شرایط خاص تولید اسپور جنسی ( بازیدیوسپور[3] ) می‌کند. در طبیعت *R.solani* به روش غیرجنسی (asexually) تولیدمثل کرده و به دو صورت وجود دارد : میسلیوم رویشی ( vegetative mycelium ) و سختینه (sclerotia ).

---

1. *Pseudomonas fluorescens*
2. *Serratia marcescens*





**شکل ۱-۱ تصاویری از قارچ رایزوکتونیا سولانی. تصویر میکروسکوپی قارچ ( بالا ). سختینه بر روی غده سیب‌زمینی ( پائین سمت راست ). کلنی قارچ و سختینه ( فلش‌ها ) بر روی پلیت ( پائین سمت چپ )**

قابل توجه است که ساختار بازیدیوسپور این قارچ با بسیاری بازیدیومیست‌های دیگر متفاوت است. مرحله جنسی این قارچ یا به عبارت دیگر مرحله تلومورفیک آن ( telomorphic ) اولین بار با جزئیات توسط Prillieux

---

[1] . Asexual spores
[2] . Conidia
[3] . Basidiospore