دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

گروه بیماری شناسی گیاهی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی

مطالعه خصوصیات ریخت‌شناسی، بیماریزایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Lecanicillium fungicola* عامل بیماری حباب خشک قارچ خوراکی دکمه‌ای و امکان کنترل این بیماری توسط چند ترکیب گیاهی

پژوهش و نگارش

مصطفی مهرپرور

استاد راهنما

دکتر ابراهیم محمدی گل تپه

استاد مشاور

دکتر ناصر صفایی

تیر ماه 1390

بسمه تعالی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیئت داوران نسخه نهایی آقای **مصطفی مهرپرور** تحت عنوان: **مطالعه‌ی خصوصیات ریخت‌شناسی، بیماریزایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های *Lecanicillium fungicola* عامل بیماری حباب خشک و امکان کنترل این بیماری توسط چند عصاره گیاهی** را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی‌ارشد تائید می کنند.

اعضای هیات داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر ابراهیم محمدی گل‌تپه	استاد	
۲- استاد مشاور	دکتر ناصر صفایی	دانشیار	
۳- استاد ناظر (داخلی)	دکتر ابراهیم پورجم	دانشیار	
۴- استاد ناظر (خارجی)	دکتر حسین رباحی	استاد	
۵- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر مسعود سمس‌بخش	دانشیار	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه

با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده 1- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده 2- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده 3- انتشار کتاب ، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده 4- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه می باشد، باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده 5- این آیین‌نامه در 5 ماده و یک تبصره در تاریخ87/4/1 در شورای پژوهشی و در تاریخ 87/4/23 در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ 87/7/15 شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده 1: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده 2: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته بیماریشناسی گیاه است که در سال 1390 در دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای **دکتر ابراهیم محمدی گل‌تپه** و مشاوره جناب آقای **دکتر ناصر صفایی** از آن دفاع شده است.»

ماده 3: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده 4: در صورت عدم رعایت ماده 3، 50% بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده 5: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده 4 را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده 6: اینجانب **مصطفی مهرپرور** دانشجوی رشته **بیماریشناسی گیاهی** مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: **مصطفی مهرپرور**

تاریخ و امضا:

تقدیم به :

پدر و مادر گرامی و بزرگوارم

که زحمت به ثمر رساندنم را به جان خریدند و همواره مشوقم به کسب معرفت بودند. امیدوارم که بتوانم فرزندی شایسته بر آنها باشم و جبران زحمتشات را بنمایم

و به معلم شهید

استاد مرتضی مطهری

تقدیر و تشکر

اکنون که به یاری خداوند متعال این پایان نامه را به پایان رسانیدم برخود لازم می دانم از استاد فرزانه جناب آقای **دکتر ابراهیم محمدی گل تپه** که زحمت راهنمایی این تحقیق را برعهده داشته و با سعه صدر و دقت نظر، اینجانب را در تمام مراحل اجرای این پژوهش یاری نموده‌اند و از هر گونه مساعدتی دریغ نفرموده اند کمال تشکر و قدردانی را داشته و از درگاه ایزد منان آرزوی توفیق روزافزون برای ایشان دارم.

از استاد عزیز و فرزانه جناب آقای **دکتر ناصر صفایی** به عنوان استاد مشاور این تحقیق و نیز در مقام استادی عالم وفرزانه که در انجام تحقیق همواره از مساعدت و پیشنهادات بسیار ارزنده ایشان بهره جستم بی نهایت سپاسگزارم و از خداوند یکتا آرزوی توفیق روزافزون برای ایشان دارم.

از اساتید بزرگوار آقایان **دکتر ابراهیم پورجم و دکتر حسین ریاحی** که زحمت باز خوانی و داوری این پایان نامه را عهده دار شدند، سپاسگزارم.

از تمامی اساتید محترم گروه بیماری شناسی گیاهی و حشره شناسی آقایان **دکتر ابراهیم محمدی گل تپه, دکتر ناصر صفایی، دکتر مسعود شمس بخش، دکتر ابراهیم پورجم، دکتر واهه میناسیان، دکتر سعید محرمی‌پور** و همچنین جناب آقای **دکتر حشمت اله رحیمیان** که در مراحل مختلف تحصیل از حضورشان فیض برده‌ام, کمال تشکر و امتنان را دارم.

از **آقایان مهندس محمدصادق عاملی، محسن نادرپور، بابک پاکدامن، سیامک اشکانی، علی مختصی، ولی‌الله مهدیزاده و خانم‌ها مهندس معصومه ضیائی و ژاله زرگرزاده** که هر یک به نوعی مرا در انجام این تحقیق یاری دادند و در این مقطع تحصیلی افتخار همفکری و همکاری با این بزرگواران را داشتم تشکر می‌نمایم.

از همکلاسی‌ها و همگروهی‌های عزیزم آقایان **ناصر محمدی، رمضان اصغری، محمدجواد سلمانی** و خانم‌ها **امینی، زرگرزاده، دهاقین** و **حسین زاده** که بهترین سالهای تحصیلم را در کنار آنها تجربه کردم ممنون و سپاسگذارم.

از مسئولین محترم آزمایشگاه‌های گروه بیماری شناسی گیاهی آقایان **مهندس ساداتی و مهندس وامقی** جهت فراهم نمودن تسهیلات لازم برای انجام این پژوهش صمیمانه تشکر و قدردانی می‌نمایم.

و در نهایت از پدر و مادر عزیز و مهربانم که رنج سال‌های تحصیل مرا متقبل شده و گذر از این مسیر را برایم میسر ساختند، بی‌نهایت سپاسگزارم.

چکیده

بیماری حباب خشک قارچ خوراکی دکمه‌ای با عامل *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare and Gams از مهمترین بیماریهای قارچی قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید در کشت و صنعت‌های پرورش این قارچ در دنیا محسوب می-شود. این بیماری در ایران نیز به مراکز تولید قارچ خوراکی آسیب بسیار زیادی وارد می‌کند. این مطالعه با هدف شناسایی واریته قارچ بیمارگر، دمای بهینه برای رشد بیمارگر، تنوع ژنتیکی، آزمون‌های بررسی ویرولانس و ارزیابی خسارت، ارزیابی حساسیت به قارچ‌کش‌های مختلف و بررسی قابلیت بیوکنترلی اسانس‌های گیاهی روی این بیمارگر و قارچ خوراکی انجام شد. پس از بازدیدهای مکرر که در سال 1388 و 1389 از کشت و صنعت‌های پرورش قارچ استان تهران و البرز به عمل آمد، در مجموع 48 جدایه قارچ عامل بیماری جداسازی و قارچ *L. fungicola* var. *fungicola* شناسایی گردید. خصوصیات ریخت‌شناسی جدایه‌ها شامل وجود کریستال، رنگ پرگنه و میزان رشد آن در دماهای مختلف ثبت شد. جدایه ها در دمای 30 درجه سیلسیوس رشدی نداشته و بهترین دما برای رشد بیمارگر 20 درجه سیلسیوس بدست آمد. جدایه‌های بدست آمده از مراکز کشت و صنعت بازدید شده، از نظر شکل و میزان رشد پرگنه با یکدیگر متفاوت بودند. بر اساس اطلاعات بدست آمده از آزمایش‌های دمایی و شکل پرگنه 23 جدایه انتخاب و برای بررسی تنوع ژنتیکی با آغازگرهای URP و آزمایش قدرت ویرولانس مورد استفاده قرار گرفتند. در بررسی ویرولانس به روش استفاده از پلاگ، لکه نکروزه روی اندام باردهی قارچ خوراکی فقط در اطراف پلاگ ایجاد شد درحالیکه در روش استفاده از سوسپانسیون اسپور میزان تفکیک جدایه‌ها از نظر تفاوت در ایجاد لکه بسیار مشهود بود. در قسمت ارزیابی خسارت، علایم بیماری بصورت لکه‌های نکروزه، ساقه‌های کج شده، ترک خورده و حباب مشاهده گردید. در آلودگی روزهای دوم، نهم و هفدهم پس از دادن خاک پوششی، روزهای دوم و نهم بیشترین میزان خسارت را ایجاد نمودند. خسارت بصورت کیفی بود و وزن اندامهای باردهی نسبت به شاهد کاهش پیدا نکرد. از مجموع 12 آغازگر URP ، ده آغازگر نواحی مختلف ژنوم قارچ بیمارگر را تکثیر نمودند. آغازگرهای 1F, 2F, 25F, 38F, 38F, 6R, 13R و 17R چند شکلی نشان ندادند و در آغازگرهای 9F, 2R و 4R چندشکلی مشاهده گردید. در این بررسی جدایه‌های مرکز پرورش پدم (P) از جدایه‌های دیگر جدا شدند. در بررسی حساسیت جدایه‌ها به قارچ‌کش‌ها، همه جدایه‌ها به قارچ‌کش‌های بنومیل، کاربندازیم و ایپردیون-کاربندزایم مقاومت بسیار بالایی داشتند در حالیکه این جدایه‌ها نسبت به قارچکش اسپورگون نسبتا حساس بودند. با این وجود در جدایه P4 نیز مقاومت مشاهده گردید. در بررسی حساسیت بیمارگر و قارچ خوراکی به 12 اسانس گیاهی، مرزه و آویشن شیرازی بیشترین قدرت بازدارندگی رشد میسلیومی را دارا بودند. همچنین این دو اسانس بهترین قدرت انتخابی بودن را در مقایسه با اسانس‌های دیگر داشتند. این خصوصیت به ترکیبات فنولی موجود در آنها نسبت داده شد.

کلمات کلیدی:

Lecanicillium fungicola، بیماری حباب خشک، اسانس گیاهی، مقاومت به قارچکش، نشانگر URP، *Agaricus bisporus*

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه 1

فصل دوم: مروری بر تحقیقات انجام شده 9

2-1 زیست‌شناسی و رده بندی قارچ خوراکی دکمه‌ای 9

2-2 رده‌بندی قارچ *Lecanicillium fungicola* 10

2-3 ویژگی خانواده *Cordycipitaceae* 14

2-4 ویژگی جنس *Lecanicillium* 14

2-5 واریته‌های قارچ بیمارگر و دامنه میزبانی 15

2-6 فرایند بیماریزایی و تعامل بیمارگر- میزبان 17

2-6-1 خصوصیات مرتبط با قارچ *Lecancillium fungicola* 17

2-6-2 خصوصیات قارچ خوراکی دکمه‌ای 18

2-6-3 اتصال و تشخیص 20

2-6-4 آنزیم‌های تجزیه کننده دیواره سلولی 22

2-6-5 تعامل مولکولی و دفاع *Agaricus bisporus* 26

2-7 منبع آلودگی، بقای عامل بیماری و انتشار 32

2-7-1 کمپوست 32

2-7-2 سالن‌های پرورش قارچ خوراکی 32

2-7-3 آفات 33

2-7-4 کارگران 33

2-7-5 خاک پوششی 34

2-7-6 جریان هوا 35

2-7-7 آبیاری 36

2-7-8 گرد و غبار 36

2-7-9 ابزارها و وسایل 36

2-8 اکولوژی قارچ بیمارگر در داخل خاک پوششی 36

2-9 علائم بیماری روی قارچ خوراکی دکمه‌ای 37

10-2 فرایند قهوه‌ای شدن اندام باردهی 40
11-2 اثر عوامل محیطی (دما، رطوبت و pH) در آلودگی به بیماری حباب خشک 40
12-2 محیط کشت و احتیاجات غذایی 41
13-2 تاریخچه مصرف قارچکش جهت کنترل بیماری 42
14-2 رابطه مقاومت به قارچکش‌ها و قدرت بیماریزایی 48
15-2 مقاومت تقاطعی در قارچکش‌ها 48
16-2 سابقه بررسی تنوع مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی در جمعیت قارچ *Lecanicillium fungicola* 49
17-2 نشانگر URP 53
18-2 اسانس‌های گیاهی جهت کنترل بیماری‌های قارچی 55
فصل سوم: مواد و روش‌ها 69
1-3 نمونه‌برداری 69
2-3 جداسازی عامل بیماری 69
3-3 تهیه محیط کشت اختصاصی رینکر 70
4-3 خالص‌سازی به‌روش تک‌اسپوری 72
5-3 نگهداری قارچ عامل بیماری 72
6-3 محیط‌های کشت 74
1-6-3 تهیه محیط کشت PDA 74
2-6-3 تهیه محیط کشتPCA 74
3-6-3 تهیه محیط کشت واتر آگار WA 75
7-3 شناسایی جدایه‌های قارچ عامل بیماری 75
8-3 بررسی میزان رشد پرگنه قارچ بیمارگر در دماهای مختلف 76
9-3 بررسی قدرت ویرولانس جدایه‌های قارچ بیمارگر 76
10-3 انتخاب جدایه‌های مناسب جهت ارزیابی‌های آزمایشگاهی 77
11-3 ارزیابی خسارت و آزمون بیماریزایی 78
1-11-3 کشت قارچ خوراکی دکمه‌ای در سالن‌های پرورش 78
2-11-3 ارزیابی خسارت و آزمون بیماریزایی 78

12-3 بررسی‌های ملکولی 79
1-12-3 تهیه میسلیوم 79
2-12-3 استخراج DNA ژنومی 81
3-12-3 ارزیابی DNA استخراج شده 83
4-12-3 رساندن غلظت DNA به غلظت مورد بررسی برای تنوع ژنتیکی 83
5-12-3 بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگر مولکولی URP 83
6-12-3 بهینه کردن شرایط PCR 84
7-12-3 آماده‌سازی مخلوط PCR 84
8-12-3 برنامه حرارتی واکنش‌های PCR 85
9-12-3 مشاهده محصول واکنش PCR 86
10-12-3 تجزیه و تحلیل داده ها 87
13-3 بررسی اثر قارچکش‌ها در جلوگیری از رشد میسلیوم جدایه‌های قارچ بیمارگر 88
1-13-3 انتخاب قارچکش‌ها 88
2-13-3 خصوصیات قارچکش‌های انتخاب شده 88
3-13-3آماده کردن محیط‌های کشت حاوی قارچکش 88
4-13-3 انتقال جدایه‌های قارچ بیمارگر روی محیط کشت‌های حاوی قارچکش 89
5-13-3 اندازه‌گیری قطر پرگنه جدایه‌های قارچ بیمارگر روی محیط کشت‌های حاوی قارچکش‌ها 89
6-13-3 تعیین درصد بازدارندگی رشد میسلیوم جدایه‌های قارچ بیمارگر 90
7-13-3 بررسی اثر غلظت‌های مختلف قارچکش‌ها در جلوگیری از رشد میسلیوم جدایه‌های بیمارگر 90
14-3 طرح آزمایشی 90
1-14-3 زیست‌سنجی جدایه‌های منتخب نسبت به قارچکش‌ها 91
15-3بررسی تأثیر اسانس‌های گیاهی روی قارچ خوراکی و قارچ بیمارگر 92
1-15-3 تهیه اسانس‌های گیاهی 92
2-15-3 آماده کردن محیط‌های کشت حاوی اسانس 92
3-15-3 انتقال قارچ بیمارگر و قارچ خوراکی به محیط کشت حاوی اسانس‌های گیاهی 93
4-15-3 اندازه‌گیری رشد پرگنه قارچ بیمارگر و قارچ خوراکی روی محیط کشت حاوی اسانس‌های گیاهی ...93

3-15-5 تعیین درصد بازدارندگی رشد میسلیوم جدایه‌های قارچ بیمارگر و قارچ خوراکی.....93
3-15-6 تعیین حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) اسانس‌ها 94
3-15-7 زیست‌سنجی قارچ بیمارگر و قارچ خوراکی در برابر اسانس‌ها 94
3-15-8 تعیین شاخص انتخابی بودن 94
فصل چهارم: نتایج 96
4-1 جداسازی قارچ بیمارگر از بافت میزبان و شناسایی آن 96
4-2 بررسی ساختارهای رویشی و زایشی قارچ *Lecanicillium fungicola* var. *fungicola* 97
4-3 شکل پرگنه قارچ 99
4-4 سرعت رشد پرگنه 103
4-4-1 میزان رشد جدایه‌ها در دمای 15 درجه سیلسیوس 104
4-4-2 میزان رشد جدایه‌ها در دمای 20 درجه سیلسیوس 106
4-4-3 میزان رشد جدایه‌ها در دمای 25 درجه سیلسیوس 108
4-4-4 مقایسه میزان رشد جدایه‌ها در دماهای 15، 20 و 25 درجه سیلسیوس 110
4-4-5 مقایسه 23 جدایه منتخب قارچ بیمارگر از نظر رشد پرگنه در دمای 15، 20 و 25 درجه سیلسیوس111
4-5 انتخاب جدایه‌های مناسب جهت بررسی‌های آزمایشگاهی 112
4-6 بررسی قدرت ویرولانس جدایه‌های قارچ بیمارگر 112
4-6-1 مرحله اول بررسی ویرولانس جدایه‌های قارچ بیمارگر 112
4-6-2 مرحله دوم بررسی ویرولانس جدایه‌های قارچ بیمارگر 113
4-6-3 مقایسه 23 جدایه منتخب از نظر رشد پرگنه در دمای 15، 20 و 25 درجه سیلسیوس و آزمایش قدرت ویرولانس 117
4-7 بررسی‌های مولکولی 118
4-7-1 بررسی تنوع ژنتیکی جدایه‌های قارچ *L. fungicola* var. *fungicola* با استفاده از نشانگر مولکولی URP 118
4-7-1-1 آغازگر 1F 119
4-7-1-2 آغازگر 2F 120
4-7-1-3 آغازگر 9F 120
4-7-1-4 آغازگر 25F 121

4-7-1-5 آغازگر 38F 122
4-7-1-6 آغازگر 2R 123
4-7-1-7 آغازگر 4R 124
4-7-1-8 آغازگر 6R 125
4-7-1-9 آغازگر 13R 126
4-7-1-10 آغازگر 17R 127
4-7-1-11 ترکیب نتایج حاصل از سه آغازگر 2R ، 4R و 9F 127
4-8 قارچکش‌ها 128
4-8-1 بررسی اثر غلظت‌های مختلف قارچکش‌ها در جلوگیری از رشد میسلیوم جدایه‌های قارچ بیمارگر .. 128
4-8-2 حساسیت جدایه‌های قارچ بیمارگر به قارچکش‌ها صرف نظر از نوع قارچکش 130
4-8-3 میزان بازدارندگی قارچکش‌های مورد استفاده 130
4-8-4 میزان بازدارندگی در غلظت‌های مختلف 131
4-8-5 زیست‌سنجی جدایه‌های منتخب نسبت به قارچکش‌ها 136
4-8-5-1 پروکلراز منگنز (اسپورگون) 136
4-8-5-2 بنومیل 137
4-8-5-3 کاربندازیم 138
4-8-5-4 ایپردیون-کاربندازیم 139
4-9 ارزیابی خسارت و آزمون بیماریزایی 140
4-9-1 علایم بیماری 140
4-9-2 نتایج آزمون بیماریزایی 141
4-10 آزمایش بررسی حساسیت قارچ بیمارگر و قارچ خوراکی به اسانس‌های گیاهی 147
4-10-1 ترکیب موثره موجود در اسانس‌های گیاهی مورد مطالعه 147
4-10-2 زیست‌سنجی اسانس‌های گیاهی روی قارچ بیمارگر 149
4-10-3 زیست‌سنجی اسانس‌های گیاهی روی قارچ خوراکی دکمه‌ای 152
4-10-4 شاخص انتخابی بودن اسانس‌های گیاهی 154
4-10-5 حداقل غلظت بازدارنگی اسانس‌های گیاهی روی قارچ خوراکی و قارچ بیمارگر 155

فصل پنجم: بحث 159
بحث اسانس‌های گیاهی 173
نتیجه‌گیری و پیشنهادات 180
جمع‌بندی 180
پیشنهادات برای تحقیقات بعدی 182
پیشنهاداتی به پرورش دهندگان قارچ خوراکی دکمه‌ای جهت کنترل بهتر بیماری‌های قارچ خوراکی..... 182

فهرست جدول‌ها

جدول 2-1 رده بندی علمی قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید 9

جدول 2-2 رده‌بندی قارچ *Lecanicillium fungicola*.....10

جدول 3-1 مواد مورد نیاز برای ساخت محیط کشت تخصصی رینکر برای جداسازی قارچ *Lecanicillium fungicola*. 71

جدول 3-2 مشخصات جدایه‌های جمع آوری شده قارچ *Lecanicillium fungicola* از مراکز پرورش استان تهران و البرز 73

جدول3-3 کلید شناسایی قارچ *Lecanicillium fungicola*.....75

جدول 3-4 مواد لازم برای تهیه بافر CTAB 81

جدول 3-5 توالی اولیگونوکلئوتیدی 12پرایمر URP 84

جدول 3-6 مقادیر حجمی مواد مورد استفاده برای انجام یک واکنش PCR.....85

جدول 3-7 خصوصیات قارچکش‌های مورد استفاده و شرکت سازنده آنها 88

جدول3-8 غلظت‌های مورد استفاده برای تعیین ED50 قارچکش‌ها برای جدایه‌های منتخب قارچ *Lecanicillium fungicola* 91

جدول3-9 اسانس‌های گیاهی مورد استفاده برای زیست سنجی.....92

جدول 4-1 اندازه ساختارهای قارچ *Lecanicillium fungicola* بر حسب میکرومتر 98

جدول 4-2 مقایسه شکل ظاهری پرگنه مشاهده شده 48 در جدایه *Lecanicillium fungicola* روی محیط کشت PDA در دمای 25 درجه سیلسیوس پس از 21 روز 101

جدول 4-3 میزان رشد جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola* در دماهای 15، 20 و 25 درجه سیلسیوس پس از 21 روز رشد در محیط کشت PDA 103

جدول 4-4 تجزیه واریانس مربوط به داده‌های حاصل از اندازه‌گیری قطر پرگنه جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola* در دمای 15 درجه سیلسیوس.....104

جدول 4-5 تجزیه واریانس مربوط به داده‌های حاصل از اندازه‌گیری قطر پرگنه جدایه‌های *Lecanicillium fungicola* در دمای 20 درجه سیلسیوس 106

جدول 4-6 تجزیه واریانس مربوط به داده‌های حاصل از اندازه‌گیری قطر پرگنه جدایه‌های *Lecanicillium fungicola* در دمای 25 درجه سیلسیوس 108

جدول 4-7 تجزیه واریانس مربوط به داده‌های حاصل از اندازه‌گیری میزان رشد جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola* در دماهای 15، 20 و 25 درجه سیلسیوس 110

جدول 4-8 آزمایش قدرت ویرولانس جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola* بر اساس ایجاد لکه یا عدم ایجاد لکه112

جدول 4-9 تجزیه واریانس مربوط به داده‌های حاصل از اندازه‌گیری آزمایش قدرت ویرولانس جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola*.....113

جدول 4-10 مقایسه میانگین قدرت ویرولانس جدایه‌های منتخب قارچ *Lecanicillium fungicola* با آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد و گروه‌بندی آنها بر اساس شاخص قدرت ویرولانس 114

جدول 4-11 نتایج حاصل از آغازگرهای URP استفاده شده در بررسی تنوع ژنتیکی قارچ *Lecanicillium fungicola*118

جدول 4-12 تجزیه واریانس مربوط به داده‌های حاصل از آزمایش تأثیر قارچکش‌ها روی ده جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* در غلظتهای 10، 20، 50، 100، 500، 1000 میلی‌گرم در لیتر در محیط کشت PDA.....129

جدول 4-13 مقایسه میانگین درصد بازدارندگی قارچکش‌ها در ده جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد 130

جدول 4-14 مقادیر ED50 محاسبه شده قارچکش پروکلراز منگنز برای جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola* بر حسب میلی‌گرم در لیتر 137

جدول 4-15 مقادیر ED50 محاسبه شده قارچکش بنومیل برای جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola* بر حسب میلی‌گرم در لیتر 138

جدول 4-16 مقادیر ED50 محاسبه شده قارچکش کاربندازیم برای جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola* بر حسب میلی‌گرم در لیتر 139

جدول 4-17 مقادیر ED50 محاسبه شده قارچکش ایپردیون-کاربندازیم برای جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola* بر حسب میلی‌گرم در لیتر 140

جدول 4-18 تجزیه واریانس مربوط به بیماریزایی سه جدایه منتخب قارچ بیمارگر از وزن کل اندام باردهی تولید شده برای هر تیمار 142

جدول 4-19 تجزیه واریانس مربوط به بیماریزایی سه جدایه منتخب قارچ بیمارگر از نظر ایجاد علایم حباب نسبت به کل اندام‌های باردهی بر حسب درصد.....142

جدول 4-20 تجزیه واریانس مربوط به بیماریزایی سه جدایه منتخب قارچ بیمارگر از نظر ایجاد لکه‌های نکروزه و ساقه-های کج شده و ترک خورده نسبت به کل اندام‌های باردهی بر حسب درصد 143

جدول 4-21 تجزیه واریانس مربوط به بیماریزایی سه جدایه منتخب قارچ بیمارگر از نظر تولید قارچ‌های سالم نسبت به کل اندام‌های باردهی بر حسب درصد.....144

جدول 4-22 مقایسه میانگین جدایه‌های منتخب قارچ بیمارگر از نظر ایجاد اندام‌های باردهی سالم و بیمار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد و میزان کاهش راندمان محصول بازارپسند 145

جدول 4-23 مقایسه میانگین اثر زمان تلقیح سوسپانسیون اسپورهای قارچ بیمارگر در ایجاد اندام‌های باردهی سالم و بیمار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد و میزان کاهش راندمان محصول بازارپسند 147

جدول 1-5 ماده موثره موجود در اسانسهای گیاهی مورد بررسی به همراه ساختارهای شیمیایی که به آن تعلق دارند.176
جدول 1-6 لیست ترکیبات شیمیایی مورد استفاده برای کنترل آفات و بیماریهای قارچ خوراکی 186

فهرست نمودارها

نمودار 1-1 وضعیت تولید قارچ خوراکی دکمه‌ای در سالهای اخیر در کشور.....6

نمودار 4-1 مقایسه میانگین قطر پرگنه جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola* پس از 21 روز رشد در دمای 15 درجه سیلسیوس بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد.....105

نمودار 4-2 مقایسه میانگین قطر پرگنه جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola* پس از 21 روز رشد در دمای 20 درجه سیلسیوس بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد.....107

نمودار 4-3 مقایسه میانگین قطر پرگنه جدایه‌های قارچ *Lecanicillium fungicola* پس از 21 روز رشد در دمای 25 درجه سیلسیوس بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد.....109

نمودار 4-4 میانگین رشد تمامی جدایه‌ها در سه دمای 15، 20، 25 درجه سیلسیوس روی محیط کشت PDA پس از 21 روز و مقایسه آن بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد 111

نمودار 4-5 دندروگرام مربوط به میانگین رشد 23 جدایه *Lecanicillium fungicola* در دمای 15، 20 و 25 درجه سیلسیوس روی محیط کشت PDA 111

نمودار 4-6 نمودار درختی مربوط به اندازه‌گیری قطر لکه نکروزه ایجاد شده در آزمایش قدرت ویرولانس مربوط به 23 جدایه *Lecanicillium fungicola* 115

نمودار 4-7 دندوگرام مربوط به اندازه‌گیری‌های حاصل از رشد 23 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* در دمای 15، 20 و 25 درجه سیلسیوس و آزمایش قدرت ویرولانس 117

نمودار 4-8 دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی 23 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* با استفاده از آغازگر منفرد 9F و بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد. 121

نمودار 4-9 دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی 23 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* با استفاده از آغازگر منفرد 2R و بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد.....124

نمودار 4-10 دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی 23 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* با استفاده از آغازگر منفرد 4R و بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد.....125

نمودار 4-11 دندروگرام مربوط به تنوع ژنتیکی 23 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* بر اساس ترکیب نتایج حاصل از سه آغازگر 2R ، 4R و 9F با استفاده از روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد.....128

نمودار 4-12 مقایسه میانگین میزان بازدارندگی قارچکش‌های مورد استفاده بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد 131

نمودار 4-13 تأثیر غلظت‌های مختلف در میزان بازدارنگی رشد میسلیومی صرف نظر از نوع قارچکش و جدایه.....132

نمودار 4-14 میزان بازدارندگی قارچکش‌های بنومیل، کاربندازیم، ایپردیون-کاربندازیم و اسپورگون در غلظت‌های مختلف بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد 133

نمودار 4-15 تأثیر قارچکش‌های اسپورگون، ایپردیون-کاربندازیم، بنومیل و کاربندازیم روی ده جدایه قارچ بیمارگر..135

نمودار 4-16مقایسه میانگین جدایه های منتخب قارچ بیمارگر از نظر ایجاد اندام‌های باردهی سالم و بیمار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد و میزان کاهش راندمان محصول بازارپسند 145

نمودار 4-17 مقایسه میانگین اثر زمان تلقیح سوسپانسیون اسپورهای قارچ بیمارگر در ایجاد اندام های باردهی سالم و بیمار بر اساس آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد و میزان کاهش راندمان محصول بازارپسند 146

نمودار 4-18 مقادیر ED50 بدست آمده برای هر اسانس و قارچکش بر اساس آزمایش Macrodilution برای قارچ بیمارگر *Lecanicillium fungicola* بر حسب میکرولیتر در لیتر و میلی‌گرم در لیتر 152

نمودار 4-19 مقادیر ED50 هر اسانس برای قارچ بیمارگر و قارچ خوراکی بر حسب میکرولیتر در لیتر 154

فهرست شکل‌ها

شکل 2-1 علایم مختلف آلودگی اندام باردهی قارچ خوراکی به حباب خشک 39

شکل 3-1 جداسازی قارچ بیمارگر از بافت قارچ خوراکی با محیط کشت تخصصی 70

شکل3-2 ابزارهای مورد استفاده جهت بررسی مولکولی 87

شکل 3-3 محیط کشت حاوی قارچکش‌ها پس از اندازه‌زنی و میزان رشد قارچ بیمارگر در غلظت‌های مختلف (B) 89

شکل 4-1 نمایی از عدم رشد قارچ بیمارگر *Lecanicillium fungicola* در دمای 30 درجه سیلسیوس پس از 21 روز..96

شکل 4-2 نمایی از انشعاب ثانوی از کنیدیوفور اصلی و تشکیل فیالید در قارچ *Lecanicillium fungicola*.....98

شکل 4-3 نمایی از اندام‌های رویشی و زایشی قارچ بیمارگر *Lecanicillium fungicola*). 99

شکل 4-4 نمایی از مقایسه شش نوع شکل پرگنه قارچ *Lecanicillium fungicola* 100

شکل 4-5 نمایی از پرگنه 48 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* روی محیط کشت PDA در دمای 25 درجه سیلسیوس 102

شکل 4-6 نمایی از لکه نکروزه ایجاد شده توسط جدایه‌های قارچ بیمارگر در مقایسه با شاهد آب مقطر سترون روی اندام باردهی قارچ خوراکی دکمه‌ای 113

شکل 4-7 شاخص آزمایش قدرت ویرولانس جدایه‌های منتخب قارچ *Lecanicillium fungicola*.....116

شکل 4-8 نمایی از اندام‌های باردهی تلقیح شده با سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر به غلظت 2×10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر پس از پنج روز نگهداری در دمای 20 درجه سیلسیوس در شرایط تاریکی 116

شکل 4-9 الگوی باندی حاصل از انگشت نگاری DNA با استفاده از آغازگر 1F در 23 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* 119

شکل 4-10 الگوی باندی حاصل از انگشت نگاری DNA با استفاده از آغازگر 2F در 23 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* 120

شکل 4-11 الگوی باندی حاصل از انگشت نگاری DNA با استفاده از آغازگر 9F در 23 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* 121

شکل 4-12 الگوی باندی حاصل از انگشت نگاری DNA با استفاده از آغازگر 25F در 23 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* 122

شکل 4-13 الگوی باندی حاصل از انگشت نگاری DNA با استفاده از آغازگر 38F در 23 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* 122

شکل 4-14 الگوی باندی حاصل از انگشت نگاری DNA با استفاده از آغازگر 2R در 23 جدایه قارچ *Lecanicillium fungicola* 123