بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت مدرس

دانشکده کشاورزی

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته: گیاه پزشکی

گرایش: بیماری شناسی گیاهی

عنوان پایان نامه:

بررسی وضعیت گونه های تریکودرما و بیوتیپ های عامل بیماری کپک سبز *Trichoderma harzianum* در قارچ خوراکی دکمه ای در استان تهران و شهرستان ارومیه

نام دانشجو:

ژاله زرگرزاده

استاد راهنما:

دکتر ابراهیم محمدی گل تپه

استاد مشاور:

دکتر یونس رضایی دانش

خرداد ۱۳۹۰

تایید اعضای هیأت داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیأت داوران نسخه‌ی نهائی پایان نامه خانم **ژاله زرگرزاده** تحت عنوان : **"بررسی وضعیت گونه‌های تریکودرما و بیوتیپ‌های عامل بیماری کپک سبز *Trichoderma harzianum* در قارچ خوراکی دکمه‌ای در استان تهران و شهرستان ارومیه"** را از نظر فرم و محتوی بررسی نموده و پذیرش آن را برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه‌ی علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر ابراهیم محمدی گل‌تپه	استاد	
۲- استاد مشاور	دکتر یونس رضایی‌دانش	استادیار	
۳- نماینده شورای تحصیلات تکمیلی	دکتر مسعود شمس‌بخش	دانشیار	
۴- اساتید ناظر: ۱- داخلی	دکتر ناصر صفایی	دانشیار	
۲- خارجی	دکتر واهه میناسیان	استاد	

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 ۱- 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 ۲- 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 ۳- 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 ۴- 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 باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ۵- این آیین‌نامه در ۵ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/۴/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/۴/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب ژاله زرگرزاده دانشجوی رشته بیماری شناسی گیاهی ورودی سال تحصیلی۱۳۸۷ مقطع کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی متعهد می شوم کلِیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا:.....

تاریخ: ۹۰/۳/۲

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

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده در رشته بیماری شناسی گیاهی است که در سال۱۳۹۰ در دانشکده‌کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر ابراهیم محمدی گل تپه، مشاوره جناب آقای دکتریونس رضایی دانش از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: 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 ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: 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 ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب‌ژاله زرگرزاده دانشجوی رشته‌بیماری شناسی گیاهی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: ژاله زرگرزاده
تاریخ و امضا: ۱۳۹۰/۳/۲

تقدیم به

مادرم

همسر م

و خواهرانم

تشکر و قدردانی

پروردگار یگانه را شاکرم که مرا نعمت حیات بخشید و شوق دانستن را در وجودم نهاد و همواره توجه و محبت او را به خود باور داشته ام .او را سپاسگذارم که توفیق شاگردی در محضر اساتید دانشمند و وارسته را به من عطاء فرمود.

اکنون که با توجه و عنایات ویژه پروردگار توفیق اتمام یکی دیگر از مقاطع تحصیلی را یافته ام بر خود لازم می دانم از اساتید معظم، کارشناسان و دوستان عزیزم که در انجام این تحقیق مرا یاری کردند تشکر و قدردانی کنم.

از استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر ابراهیم محمدی گل تپه که در تمام مراحل این پایان نامه راهنمای علمی و پشتوانه این تحقیق بودند صمیمانه سپاسگزارم و از خداوند منان تمنای سلامتی و طول عمر با عزت برای ایشان دارم.

از استاد وارسته جناب آقای دکتر یونس رضایی دانش که مشاورت این پایان نامه را قبول نمودند، سپاسگزارم و از خداوند متعال طول عمر با عزت برای خدمت به جامعه علمی کشور را برای ایشان خواستارم.

از اساتید محترم جناب آقای دکتر واهه میناسیان و دکتر ناصر صفایی به خاطر پذیرش داوری پایان نامه اینجانب کمال تشکر را دارم.

همچنین از محضر اساتید فرزانه ای چون جناب آقای دکتر پورجم، دکتر رحیمیان، دکتر شمس بخش و دکتر صفایی که شاگردی این بزرگواران افتخاری برای من بود سپاس و قدردانی می کنم.

از کارشناسان محترم آزمایشگاه بیماری شناسی آقایان مهندس وامقی، ساداتی و موسوی کمال تشکر را دارم.

در پایان از تمامی دوستان و عزیزان خصوصا جناب آقای دکتر ابرین بنا و آقایان مهدیزاده و مهرپرورکه در تمام این مدت صمیمانه مرا یاری کردند با نهایت احترام سپاسگزاری کرده و از درگاه ایزد منان برایشان آرزوی صحت، سلامت و موفقیت روزافزون دارم.

در پایان از اسوه گذشت و فداکاری، مادر، خواهران و همسر عزیزم که همواره مشوق و پشتوانه من در زندگی بوده اند صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم و از درگاه خداوند تمنای سلامتی و طول عمر با عزت برای این بزرگواران دارم.

چکیده

قارچ خوراکی دکمه‌ای *Agaricus bisporus* به لحاظ ارزش غذایی و داروئی دارای اهمیت زیادی است. این قارچ در مراحل مختلف رشدی خود در معرض بسیاری از عوامل بیماریزا و آفات می باشد. از مهمترین عوامل محدود کننده تولید و پرورش تجاری قارچ خوراکی می توان بیماری کپک سبز ناشی از گونه های تریکودرما را نام برد. گونه های مختلف قارچ *Trichoderma* از جمله گونه *T. harzianum* و به ویژه بیوتیپ های Th2 و Th4 گونه مذکور از مهمترین عوامل ایجاد این بیماری در بسترهای پرورش قارچ خوراکی دکمه ای محسوب می شوند. در این پژوهش ۱۰۶ ایزوله از مراکز مختلف پرورش قارچ خوراکی دکمه ای در استان تهران (شهرستان های کرج، شهریار و هشتگرد) و استان آذربایجان غربی (شهرستان ارومیه) جمع آوری، جداسازی و خالص شدند. با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر ۶۷ ایزوله متعلق به گونه *T. harzianum*، ۲۷ ایزوله متعلق به گونه *T. virence*، هفت ایزوله متعلق به گونه *T. hamatum* و پنج ایزوله متعلق به گونه *T. inhamatum* شناسایی شدند. بر این اساس عامل اصلی آلودگی بسترهای پرورش قارچ خوراکی گونه *T. harzianum* تشخیص داده شد. برای تشخیص دقیق تر عامل بیماری، از آغازگرهای اختصاصی بیوتیپ های Th1 ، Th2، Th3 و Th4 استفاده شد. با استفاده از این آغازگرها، از میان ۶۷ ایزوله مربوط به گونه *T. harzianum*، ۱۹ ایزوله از بیوتیپ های Th3 موسوم به *T.atroviride* ، و ۳۰ ایزوله از بیوتیپ های Th2 و Th4 موسوم به *T. aggressivum f. aggressivum* و *T. aggressivum f. europeanum* شناسایی شدند. هیچ ایزوله ای مربوط به بیوتیپ Th1 شناسایی نشد. برای تعیین دمای بهینه رشد گونه بیمارگر، سرعت رشد پرگنه ۶۷ ایزوله در دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که دمای بهینه رشد برای ایزوله های استان تهران ۳۰ درجه سلسیوس و برای ایزوله های شهرستان ارومیه ۲±۲۲ درجه سلسیوس بود. بررسی شدت بیماریزایی ایزوله های مربوط به بیوتیپ های Th2 و Th4 نشان داد که بین ایزوله ها اختلاف معنی داری

وجود ندارد. برای بررسی تنوع ژنتیکی بیوتیپ های Th2 و Th4، مجموعه دوازده آغازگر URP مورد استفاده قرار گرفت. بالاترین تعداد لوکوس(۱۶لوکوس) مربوط به آغازگر 9F و کمترین آن (۱۰لوکوس) مربوط به 32F می باشد. آغازگرهای 1F، 2F، 2R، 4R، 6R و 32R بیانگر ۱۰۰ درصد پلی مورفیسم و کمترین درصد مربوط به آغازگر 38F با (۷۰ درصد) بود. تجزیه تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار NTSYSpc بر اساس الگوریتم UPGMA و استفاده از ضریب تشابه جاکارد انجام شد. تجزیه تحلیل خوشه ای داده های حاصل از کاربرد نشانگر URP در سطح تشابه ۷۴ درصد ایزوله ها را به ۱۰ گروه تقسیم نمود. این نشانگر توانست استرین های مورد مطالعه را بر حسب ناحیه جغرافیایی تفکیک کند. این پژوهش اولین بررسی تنوع ژنتیکی گونه *T. aggressivum* با استفاده از نشانگرهای URP بود.

واژگان کلیدی: قارچ خوراکی، پرایمرهای اختصاصی، *T.harzianum*، بیوتیپ های Th1،Th2، Th3و Th4 ، تنوع ژنتیکی و نشانگر URP

فهرست عناوین

عنوان	صفحه
فصل ۱: مقدمه	**۱**
۱-۱ مقدمه	**۲**
۱-۲اهداف تحقیق	**۴**
فصل ۲: بررسی منابع	**۶**
۲-۱معرفی میزبان	**۷**
۲-۱-۱فیزیولوژی قارچ	۷
۲-۲اهمیت اقتصادی و خسارت بیماری	**۹**
۲-۳عوامل بیماریزا در قارچهای خوراکی	**۱۱**
۲-۳-۱بیماری کپک سبز با عامل تریکودرما	۱۲
۲-۴تاریخچه تاکسونومی جنس تریکودرما	**۱۴**
۲-۵عوامل فیزیولوژیکی موثردر ایجاد بیماری کپک سبز	**۱۸**
۲-۶عوامل گسترش بیماری	**۲۰**
۲-۷شناسایی گونه های قارچ عامل کپک سبز	**۲۳**
۲-۷-۱شناسایی بر اساس خصوصیات مورفولوژیک	۲۳
۲-۷-۲شناسایی با استفاده از آغازگرهای اختصاصی	۲۶
۲-۸تنوع ژنتیکی	**۲۷**

۲-۸-۱نشانگرهای مولکولی ۲۸

۲-۹مروری بر تحقیقات انجام شده بااستفاده از نشانگرهای مولکولی ۳۰

فصل ۳: مواد و روشها ۳۹

۳-۱جمع آوری نمونه ها ۴۰

۳-۲جداسازی عامل بیماری ۴۰

۳-۳خالص‌سازی عامل بیماری ۴۲

۳-۴نگهداری قارچ عامل بیماری ۴۲

۳-۵شناسایی ایزوله‌های قارچ تریکودرما ۴۳

۳-۶بررسی های مولکولی ۴۴

۳-۶-۱تهیه میسلیوم ۴۴

۳-۶-۲استخراج DNA ژنومی ۴۴

۳-۶-۳ارزیابی DNA استخراج شده ۴۶

۳-۶-۴شناسایی مولکولی قارچ تریکودرما ۴۷

۳-۶-۵ارزیابی محصولات پی.سی.آر ۴۹

۳-۷بررسی سرعت رشد پرگنه قارچ در دماهای مختلف ۵۰

۳-۸بررسی بیماریزایی ایزوله های قارچی ۵۱

۳-۹بررسی تنوع ژنتیکی با استفاده از نشانگرهای مولکولی URP ۵۱

۳-۹-۱ آماده‌سازی مخلوط PCR ۵۲

۳-۹-۲برنامه حرارتی واکنش های PCR ۵۳

۳-۹-۳برنامه حرارتی واکنش URP– PCR ۵۴

۳-۹-۴مشاهده محصول PCR ۵۴

۳-۹-۵تجزیه و تحلیل داده ها ۵۵

فصل ۴: نتایج **۵۶**

۴-۱نتایج جداسازی و تشخیص عامل بیماری **۵۷**

۴-۲شناسایی بیوتیپ های Th1، Th2، Th3 و Th4 گونه *Trichoderma harzianum* با استفاده از نشانگرهای مولکولی **۶۸**

۴-۲-۱شناسایی بیوتیپ های Th1 و Th3 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی SCAR A1 و SCAR A 1c ۶۸

۴-۲-۲شناسایی بیوتیپ های Th2 و Th4 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Th-R و Th-F ۶۹

4-3بررسی سرعت رشد پرگنه گونه *T. harzianum* در دماهای مختلف **۷۰**

۴-۳-۱بررسی سرعت رشد پرگنه گونه *T. harzianum* در دمای ۱۵ درجه سلسیوس ۷۰

۴-۳-۲بررسی سرعت رشد پرگنه گونه *T. harzianum* در دمای ۲۰ درجه سلسیوس ۷۳

۴-۳-۳بررسی سرعت رشد پرگنه گونه *T. harzianum* در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ۷۶

۴-۳-۴بررسی سرعت رشد پرگنه گونه *T. harzianum* در دمای ۳۰درجه سلسیوس ۷۹

۴-۳-۵بررسی سرعت رشد پرگنه گونه *T. harzianum* در دمای ۳۵ درجه سلسیوس ۸۱

۴-۴بررسی شدت بیماریزایی ایزوله های بیوتیپ Th2 و Th4 گونه *T. harzianum* **۸۶**

۴-۵بررسی تنوع ژنتیکی **۸۹**

۴-۵-۱استخراج DNA ژنومی ۹۰

۴-۶مقایسه پلی مورفیسم نشانگر URP **۱۰۹**

فصل ۵: بحث **۱۱۳**

۵-بحث **۱۱۳**

۵-۲ جمع بندی ۱۲۳

۵-۳ پیشنهادات ۱۲۴

منابع **۱۲۶**

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول۳- ۱ فرمولاسیون محیط اختصاصی داوت ۴۰

جدول ۳- ۲ مواد لازم برای تهیه بافر CTAB ۴۵

جدول ۳-۳ توالی آغازگرهای اختصاصی مورد استفاده ۴۷

جدول ۳-۴ غلظت نهایی مواد استفاده شده در واکنش پی.سی.آر ۵۲

جدول ۳-۵ فهرست آغازگرهای مورد استفاده برای نشانگر URP– PCR ۵۳

جدول ۴-۱ پراکنش و فراوانی نسبی گونه های جداسازی شده قارچ تریکودرما از مراکز پرورش قارچ خوراکی دکمه ای در استان تهران و شهرستان ارومیه ۶۴

جدول ۴-۲ بررسی سرعت رشد پرگنه گونه *T. harzianum* در دمای ۱۵ درجه سلسیوس ۷۰

جدول ۴-۳ گروه بندی آماری ایزوله های مختلف گونه *T. harzianum* بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱٪= α بر مبنای میزان رشد قطری پرگنه قارچ ۷۱

جدول ۴-۴ بررسی سرعت رشد پرگنه گونه *T. harzianum* در دمای ۲۰ درجه سلسیوس ۷۳

جدول ۴-۵ گروه بندی آماری ایزوله های مختلف گونه *T. harzianum* بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱٪= α بر مبنای میزان رشد قطری پرگنه قارچ ۷۴

جدول ۴-۶ بررسی سرعت رشد پرگنه گونه *T. harzianum* در دمای ۲۵ درجه سلسیوس ۷۶

جدول ۴-۷ گروه بندی آماری ایزوله های مختلف گونه *T. harzianum* بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱٪= α بر مبنای میزان رشد قطری پرگنه قارچ ۷۷

جدول ۴-۸ بررسی سرعت رشد پرگنه گونه *T. harzianum* در دمای ۳۰ درجه سلسیوس ۷۹

جدول ۴-۹ گروه بندی آماری ایزوله های مختلف گونه *T. harzianum* بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱٪= α بر مبنای میزان رشد قطری پرگنه قارچ ۸۰

جدول ۴-۱۰ بررسی سرعت رشد پرگنه گونه *T. harzianum* در دمای ۳۵ درجه سلسیوس ۸۲

جدول ۴-۱۱ گروه بندی آماری ایزوله های مختلف گونه *T. harzianum* بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱٪= α بر مبنای میزان رشد قطری پرگنه قارچ ۸۲

جدول ۴-۱۲ بررسی شدت بیماریزایی ایزوله های بیوتیپ Th2 و Th4 گونه *T. harzianum* ۸۸

جدول ۴-۱۳ گروه بندی آماری ایزوله های بیوتیپ Th2 و Th4 گونه *T. harzianum* بر اساس آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح ۱٪= α بر مبنای شدت بیماریزایی ۸۸

جدول۴-۱۴ مقایسه درصد پلی مورفیسم آغازگرهای نشانگر URP مورد استفاده در بررسی تنوع ژنتیکی *Trichoderma harzianum* ۱۱۰

جدول ۴-۱۵ گروه های قابل تمایز جمعیت های *T.aggressivum* شهرستان کرج، شهریار، هشتگرد، ارومیه با استفاده از آغازگرهای نشانگر URP ۱۱۰

فهرست نمودارها

عنوان **صفحه**

نمودار ۴-۱ بهینه سرعت رشد ایزوله های قارچی تهران در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و در شهرستان ارومیه در دمای ۲±۲۲ درجه سلسیوس ۸۵

نمودار ۴-۲مقایسه شدت بیماریزای ایزوله های بیوتیپ های Th2 و Th4 در کلاهک قارچ خوراکی ۸۹

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۴-۱-الف: نمائی از الگوی رشدی؛ ب: نمائی از فیالیدها ی گونه *T. harzianum* ۵۹

شکل ۴-۲-الف: نمائی از الگوی رشدی؛ ب: نمائی از فیالیدها ی گونه *T. virens* ۶۰

شکل ۴-۳-الف: نمائی از الگوی رشدی؛ ب: نمائی از فیالیدها ی گونه *T. hamatum* ۶۲

شکل ۴-۴-الف: نمائی از الگوی رشدی؛ ب: نمائی از فیالیدها ی گونه *T. inhamatum* ۶۳

شکل ۴-۵- الگوی باندی حاصل از ۱۹ ایزوله بیوتیپ های Th3 گونه *Trichoderma harzianum* با استفاده از جفت آغازگرهای اختصاصی SCAR A1 و SCAR A 1c ۶۸

شکل ۴-۶ الگوی باند حاصل از ۳۰ ایزوله بیوتیپ های Th2 و Th4 گونه *T.harzianum* با استفاده از آغازگرهای اختصاصی Th-R و Th-F ۶۹

شکل۴- ۷-الف: الگوی رشد پرگنه گونه *Trichoderma harzianum* ایزوله های جدا شده از ارومیه در دماهای مختلف ۸۵

شکل ۴- ۷-ب: الگوی رشد پرگنه گونه *Trichoderma harzianum* ایزوله های جدا شده از تهران در دماهای مختلف ۸۶

شکل ۴-۸ علایم بررسی شدت بیماریزایی بیوتیپ های Th2 و Th4 در کلاهک قارچ خوراکی ۸۷

شکل۴-۹ الگوی DNA تکثیر شده در گروه های انگشت نگاری شناسایی شده ،با استفاده از آغازگر 1F در جدایه های *Trichoderma harzianum* ۹۱

شکل۴-۱۰ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگر 1F ۹۲

شکل۴-۱۱ الگوی DNA تکثیر شده در گروه های انگشت نگاری شناسایی شده، با استفاده از آغازگر 2F در جدایه های *Trichoderma harzianum* ۹۳

شکل۴-۱۲ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگر 2F ۹۳

شکل۴-۱۳ الگوی DNA تکثیر شده در گروه های انگشت نگاری شناسایی شده، با استفاده از آغازگر 2R در جدایه های *Trichoderma harzianum* ۹۴

شکل۴-۱۴ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگر 2R ۹۵

شکل۴-۱۵ الگوی DNA تکثیر شده در گروه های انگشت نگاری شناسایی شده، با استفاده از آغازگر 4R در جدایه های *Trichoderma harzianum* ۹۶

شکل۴-۱۶ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگر 4R ۹۶

شکل۴-۱۷ الگوی DNA تکثیر شده در گروه های انگشت نگاری شناسایی شده، با استفاده از آغازگر 6R در جدایه های *Trichoderma harzianum* ۹۷

شکل۴-۱۸ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگر 6R ۹۸

شکل۴-۱۹ الگوی DNA تکثیر شده در گروه های انگشت نگاری شناسایی شده، با استفاده از آغازگر 9F در جدایه های *Trichoderma harzianum* ۹۹

شکل۴-۲۰ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگر 9F ۹۹

شکل۴-۲۱ الگوی DNA تکثیر شده در گروه های انگشت نگاری شناسایی شده، با استفاده از آغازگر 13Rدر جدایه های *Trichoderma harzianum* ۱۰۰

شکل۴-۲۲ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگر 13R ۱۰۰

شکل۴-۲۳ الگوی DNA تکثیر شده در گروه های انگشت نگاری شناسایی شده، با استفاده از آغازگر 17Rدر جدایه های *Trichoderma harzianum* ۱۰۲

شکل۴-۲۴ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگر 17R ۱۰۳

شکل۴-۲۵ الگوی DNA تکثیر شده در گروه های انگشت نگاری شناسایی شده، با استفاده از آغازگر 25R در جدایه های *Trichoderma harzianum* ۱۰۴

شکل۴-۲۶ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگر 25R ۱۰۵

شکل۴-۲۷ الگوی DNA تکثیر شده در گروه های انگشت نگاری شناسایی شده، با استفاده از آغازگر 32F در جدایه های *Trichoderma harzianum* ۱۰۶

شکل۴-۲۸ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگر32F ۱۰۶

شکل۴-۲۹ الگوی DNA تکثیر شده در گروه های انگشت نگاری شناسایی شده، با استفاده از آغازگر 38F در جدایه های *Trichoderma harzianum* ۱۰۷

شکل۴-۳۰ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از آغازگر 38F ۱۰۸

شکل۴-۳۱ تجزیه خوشه ای جدایه های *Trichoderma harzianum* بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد با استفاده از دوازده آغازگر URP ۱۰۹

فصل اول

مقدمه