دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده کشاورزی

پایان نامه دوره کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی

عنوان

بررسی مورفولوژی، فیزیولوژی و تنوع ژنتیکی گونه های قارچ *Mycogone* در استان‌های تهران و البرز

مجری

فاطمه‌علی‌حسین‌زاده‌مقدم

استاد راهنما

دکتر ابراهیم‌محمدی‌گل‌تپه

استاد مشاور

دکتر ابراهیم‌پورجم

بهار1390

تقدیم به:

اسوه های گذشت و فداکاری

آنان که امروزم ثمره دیروز آنهاست و کلام را توانایی و

یارای بازگویی مقام والایشان نیست

پدر و مادر عزیزم

سپاسگزاری

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 محمدی‌گل‌تپه 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 ابراهیم پورجم 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 ناصر صفایی و دکتر حسن ریاحی که سعادت شاگردی این دو بزرگوار را داشته ام به خاطر پذیرش داوری پایان نامه اینجانب کمال تشکر را دارم.

همچنین از محضر اساتید فرزانه ای چون جناب آقای دکتر مسعود شمس‌بخش، دکتر حشمت‌الله رحیمیان که شاگردی این بزرگواران افتخاری برای من بود سپاس و قدردانی می کنم.

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

از دوستان عزیزم مهندس امینی، دهاقین، زرگرزاده، سلمانی، اصغری، مهرپرور، کریمی، فلاحی،نیکپور، قائمی، صدیقی، زند، زاهدی و بزرگوارانی چون مهندس طلیعی، پاکدامن، نساج، عبدلی‌نصب، باکویی، مجرلو که انجام این تحقیق بدون مساعدت و همکاری ایشان میسر نبود صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم و از درگاه ایزد منان روزهای سبز و درخشانی را برایشان خواستارم.

در پایان از اسوه های گذشت و فداکاری، پدر و مادر و خواهر و بـرادران عزیـزم کـه همـواره مشـوق و پشتوانه من در زندگی بوده اند صمیمانه تشکر و قدردانی می کنم و از درگاه خداوند تمنای سـلامتی و طول عمر با عزت برای ایشان دارم.

چکیده

امروزه قارچ‌های خوراکی یکی از منابع مهم تامین مواد غذایی در دنیا هستند. کشت این قارچ‌ها هم‌زمان با افزایش مصرف آنها به عنوان غذا به طور پیوسته تا امروز افزایش یافته است. قارچ خوراکی-دکمه‌ای با نام علمی *Agaricus bisporus (lang) singer* یکی از مهمترین انواع قارچ‌های خوراکی می‌باشد. با تشخیص ارزش بالای قارچ‌های خوراکی و توسعه کشت و پرورش انواع این قارچ‌ها بخصوص گونه *A. bisporus*، مدیریت واحدهای پرورش از نظر کنترل بیماری‌ها از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. قارچ‌های بیماری‌زا در کشورهای مختلف؛ از جمله ایران، خسارت قابل توجهی را به پرورش‌دهندگان تحمیل می‌نمایند. در ایران رقم این خسارت برآورد نشده است، اما در مواردی مشاهده شده که در اثر حمله عوامل بیماری‌زای قارچی یا محصول قابل استحصال نیست یا کیفیت محصول به شدت پایین بوده و قابل عرضه به بازار نمی‌باشد. از جدی‌ترین عوامل بیماری‌زا در قارچ‌های خوراکی دکمه‌ای می‌توان به گونه *Mycogone perniciosa* عامل بیماری حباب‌تر اشاره کرد. این بیماری باعث کاهش عمده محصول در مراکز پرورش قارچ‌خوراکی دکمه‌ای می‌شود. در این مطالعه خصوصیات ریخت شناسی، فیزیولوژیک و بیماری زایی جدایه‌های جمع‌آوری شده از مراکز کشت و صنعت قارچ خوراکی‌دکمه‌ای در استان‌های تهران و البرز مورد بررسی قرار گرفت. همچنین با توجه به اهمیت قارچ خوراکی به لحاظ ارزش غذایی و دارویی، انجام مطالعات ژنتیکی بیمارگرهای این قارچ ضروری به نظر می‌رسد. جهت شناسایی و تشخیص قارچ بیمارگر، نمونه‌هایی از کلاهک‌های دارای علائم از مراکز کشت و صنعت تهران و البرز جمع‌آوری و مورد مطالعه قرار گرفت. پس از گروهبندی جدایه‌ها، برخی خصوصیات مهم قارچ بیمارگر؛ از جمله خصوصیات ریخت شناسی و بیماری‌زایی آنها، مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه تنوع ژنتیکی 23 جدایه منتخب با استفاده از نشانگر URP مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصله موید این مطلب می‌باشند که جدایه‌های مورد بررسی (60 جدایه) متعلق به دو گونه *M. rosea* و *M. perniciosa* می‌باشند که گونه *M. rosea* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. نتایج حاصل از بررسی میزان رشد میسلیوم جدایه‌های قارچ *Mycogone* در حرارت 2±24درجه‌سلسیوس نشان داد که بین جدایه‌های مختلف از لحاظ سرعت رشد تفاوت بارزی وجود دارد، به طوری که جدایه‌ها در سه گروه کم، متوسط و پر رشد طبقه بندی شدند. دو گونه *M. perniciosa* و *M. rosea* از لحاظ خصوصیات ریخت شناسی از هم تفکیک شدند. از لحاظ قدرت بیماری‌زایی جدایه‌های منتخب G48 و P3c97 از گونه *M. perniciosa* دارای بشترین قدرت بیماری زایی نسبت به جدایه J121 از گونه *M. rosea* بودند. در این مطالعه دو آغازگر URP-4R و URP-38F توانستند دو گونه *M. perniciosa* و *M. rosea* را به طور کامل از هم تفکیک کنند که موید نتایج حاصل از مطالعات مورفولوژیکی می‌باشد. بر اساس مطالعات مولکولی در این بررسی تنوع ژنتیکی پایینی بین جدایه‌های مورد مطالعه مشاهده شد، آغازگرهای مورد استفاده قادر به ایجاد رابطه معنی‌دار بین خصوصیات مورفولوژیکی و گروهبندی جدایه‌ها نبودند. در این بررسی برخی جدایه‌ها بر اساس منطقه جمع‌آوری شده تا حدودی از بقیه جدایه‌ها تفکیک شدند. همچنین تمامی آغازگرها به

استثنای آغازگر URP-6R جدایه‌های مورد بررسی را بر اساس قدرت بیماری‌زایی از هم تفکیک کردند. این مطالعه اولین مطالعه بررسی تنوع ژنتیکی این دسته از قارچ‌ها با استفاده از نشانگرهای URP در جهان می‌باشد.

کلمات کلیدی: حباب‌تر، *Mycogone perniciosa*، *Mycogone rosea*، *Agaricus bisporus*

فهرست مطالب

فصل اول.....أ

۱- مقدمه.....1

۱- ۲- تنوع ژنتیکی.....3

۱- ۲- ۱- روش های برآورد سطح تنوع ژنتیکی.....3

۱- ۲- ۲- روش های مولکولی تعیین تنوع ژنتیکی.....3

۱- ۲-۳- نشانگر های DNA در بررسی تنوع ژنتیکی.....4

۱-۲- ۴- URP.....4

۱-۲-۵- عوامل موثر در انتخاب نشانگر مناسب.....4

فصل دوم.....6

بررسی منابع.....6

۲-۱- اهمیت قارچ های خوراکی.....6

۲-۲-۱- نقش آنها در طبیعت.....6

۲-۲-۲- به عنوان غذا برای انسان.....6

۲-۲-۳- به عنوان مواد دارویی.....6

۲-۳- اهمیت بیماری های قارچ خوراکی.....6

۲- ۴- عوامل موثر بر کیفیت و کمیت تولید قارچ خوراکی دکمه ای.....7

۲-۵- بيماري هاي قارچ خوراكي.....7

۲-۵-۱- بيماري هاي قارچي.....8

۲-۶- مروری بر تحقیقات انجام شده.....8

۲- ۶-۱- تشخیص پاتوژن.....8

۲-۶-۲- تاکسونومی.....10

۲-۶-۴- مورفولوژی قارچ عامل بیماری.....11

۲-۶- ۵- علائم بیماری روی قارچ های آلوده.....12

۲-۶-۶- انتشار، بقاء و منبع آلودگی.....13

۲-۶-۷- محیط کشت و احتیاجات غذایی:.....14

۲-۶-۸- دمای نقطه مرگ (Thermal Death Point).....14

۲-۶-۹- pH بهینه 15
۲-۶-۱۰- زیست شناسی 15
۲-۶-۱۱- نشانگرهای مولکولی 16
فصل سوم 19
مواد و روشها 19
۳-۱- جدا سازی عامل بیماری 19
۳-۱-۱- نمونه برداری و جمعآوری نمونه ها 19
۳-۱-۲- جداسازی عامل بیماری 19
۳-۲- خالص‌سازی 19
۳- ۲- ۱- نگهداری قارچ عامل بیماری 20
۳-۳- شناسایی جدایه های قارچ *MYCOGONE* 20
۳-۳-۱- شناسایی قارچ عامل بیماری 20
۳-۳-۲- خصوصیات ظاهری و مورفولوژیکی: 20
۳-۴- بررسی درجه حرارت های کمینه، بهینه و بیشینه قارچ *MYCOGONE* 21
۳-۵- کشت قارچ خوراکی دکمه ای (*AGARICUS BISPORUS*)در سالنهای پرورش 21
۳-۶- انتخاب جدایه های مناسب و موثر جهت ارزیابی‌های آزمایشگاهی 21
۳-۷- آزمایش بیماری زایی 21
۳-۷-۱- آزمایش بیماری زایی در آزمایشگاه 21
۳-۷-۲- آزمایش بیماری زایی در سالن پرورش قارچ خوراکي دکمه اي 22
۳-۸ - مراحل استخراج DNA 22
۳-۸-۱- تهیه بیوماس (توده زنده قارچ) 22
۳-۸-۲- استخراج DNA 23
۳- ۸- ۳- بررسي خلوص و غلظت نمونه DNA 24
۳-۹- نشانگرهاي DNA 24
۳-۱۰- آغازگرهاي مورداستفاده 24
۳- ۱۰-۱- آماده سازی مخلوط PCR 25
۳-۱۰-۲- برنامه حرارتی واکنش های PCR 26
۳-۱۱- تجزیه هاي آماري 27
۳-۱۱-۱- تفکیک قطعات تکثیری 27
۳-۱۱-۲- امتیاز دهي باند هاي حاصل از الکتروفورز 27

فصل چهارم 19

نتایج و بحث 19

۴-۱- نتایج جداسازی و تشخیص عامل بیماری 28

۴-۱-۱- ویژگی های ماکروسکوپی 32

۴-۱-۲- ویژگی‌های میکروسکوپی 33

۴-۱-۵- سایر ویژگی‌ها 35

۴-۲- نتایج بررسی درجه حرارت های کمینه، بهینه و بیشینه قارچ *MYCOGONE* 37

۴-۳- نتایج آزمایش های بیماری زایی 41

۴-۳-۱- نتایج آزمایش بیماری زایی در آزمایشگاه 41

۴-۳-۲- نتایج آزمایش بیماری زایی در مزرعه 42

۴-۴- نتایج بررسی تنوع ژنتیکی 50

۴-۴-۱- کمیت و کیفیت نمونه های DNA استخراج شده 50

۴-۶- بررسی تنوع ژنتیکی گونه *M. PERNICIOSA* با استفاده از نشانگرهای مولکولی URP 52

۴-۶-۱- نشانگر URP-1F 52

۴-۶-۲- نشانگر URP-2F 53

۴-۶-۳- نشانگر URP-2R 55

۴-۶-۴- نشانگر URP-4R 56

۴-۶-۵- نشانگر URP-6R 58

۴-۶-۶- نشانگر URP-9F 59

۴-۶-۸- نشانگر URP-25F 61

۴-۶-۹- نشانگر URP-32F 62

۴-۶-۱۰- نشانگر URP-38F 64

۴-۷- بررسی تنوع ژنتیکی جدایه های قارچ *M. PERNICIOSA* با استفاده از نشانگر مولکولی URP 67

۴-۸- فاصله ژنتیکي 70

۴-۸-۱- فاصله ژنتیکي جمعیت ها براساس نشانگرهای URP 70

۴-۸-۲- تجزیه به مختصات اصلي (PCA) با استفاده از نشانگرهايURP 70

۴-۹- جمع بندی: 72

۴-۹-پیشنهادات: 73

فهرست منابع 75

فهرست جداول

جدول(۱-۳). فرمولاسیون مربوط به محیط کشت PDA..... 19
جدول(۲-۳). مشخصات آغازگرهاي URP..... 25
جدول(۳-۳). غلظت نهايي مواد استفاده شده براي تكنيك هاي PCR..... 26
جدول(۴-۳). چرخه هاي حرارتي PCR براي تكنيك URP..... 27
جدول(۱ - ۴). مشخصات جدایه های *M. PERNICIOSA* و *M. ROSEA* جداسازی شده از قارچ خوراکی دکمه ای بر اساس نام جدایه، محل جمعآوری و تاریخ..... 30
جدول(۲-۴) اندازه گیری اسپورهای قارچ عامل بیماری حبابتر (۴۰مورد اندازهگیری انجام شده)..... 36
جدول(۷-۴). تجزیه واریانس آزمایش بیماری زایی جدایههای منتخب در مراحل مختلف بر روی قارچ خوراک. 43
جدول(۹-۴) مقایسه میانگین چهارگونه قارچ *MYCOGONE* در آزمایش بیماريزايي بر اساس آزمون دانکن در سطح ۱% = A بر مبناي ميانگين عملكرد محصول..... 44
جدول(۱۰-۴). مقایسه میانگین سه زمان تلقیح در آزمایش بیماريزايي بر اساس آزمون دانکن در سطح ۱% = A بر مبناي ميانگين عملكرد محصول..... 44
جدول(۱۱-۴). نتايج اسپكتروفتومتري براي تعيين كميت و كيفيت DNA..... 50
جدول(۱۲-۴). دمای اتصال مناسب برای آغازگرهای استفاده شده در نشانگرهای URP برحسب درجه سلسیوس52
جدول(۱۳-۴). خلاصه نتایج به دست آمده برای آغازگرهای استفاده شده در نشانگر URP..... 68
جدول(۱۴-۴). مقادیر ویژه و میزان توجیه تغییرات توسط هر مولفه..... 71

فهرست اشکال

شکل (۱-۴). نمایی از کلنی قارچ A: گونه *MYCOGONE PERNICIOSA*؛B : گونه *MYCOGONE ROSEA*.....29

شکل (۲-۴). نمایی از فیالوسپور های گونه *M. PERNICIOSA* (A,B,C) و گونه (D) *M. ROSEA* با درشت نمایی ×۴۰ 34

شکل (۳-۴). نمایی از فیالیدهای قارچ *M. PERNICIOSA* با درشت نمایی ×۴۰ 35

شکل (۴-۴). نمایی از آلئوروسپور های تولید شده توسط گونه *M. PERNICIOSA* (A,B) و گونه *M. ROSEA* (C,D,E) با درشت نمایی ×۴۰ 35

شکل (۵-۴). میزان رشد جدایه های گونه *M. PERNICIOSA* طی نه روز پس از کشت و در پنج دمای A. ۱۵ B. ۲۰ C. ۲۴ D. ۳۰ E. ۳۵ درجه سلسیوس.....39

شکل (۶-۴). میزان رشد جدایه های گونه *M. ROSEA* طی نه روز پس از کشت و در پنج دمای A. ۱۵ B. ۲۰ C. ۲۴ D. ۳۰ E. ۳۵ درجه سلسیوس.....40

شکل (۷-۴) گروهبندی جدایه های گونه *M. PERNICIOSA* با استفاده از دمای بهینه رشد 41

شکل (۸-۴). نمایی از علائم ناشی از اسپری قارچ عامل بیماری روی کلاهک های قارچ خوراکی دکمهای *A. BISPORUS* در شرایط آزمایشگاه (A. G48, B. P3C97, C. J121).....42

شکل (۹-۴). علائم بیماری بر روی قارچ خوراکی دکمه ای ناشی از گونه *M. PERNICIOSA* (A,B,C,D,E) و گونه *M. ROSEA* (E) در روی قارچ خوراکی دکمه ای *A. BISPORUS* در شرایط مزرعهای (F شاهد).....49

شکل (۱۰-۴). کیفیت نمونه هايي از DNA استخراج شده در ژل آگارز ۱درصد 50

شکل (۱۳-۴). مقایسه نقوش الکتروفورزی DNA تکثیر شده برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-1F، نشانگر DNA یک کیلو بازی، NC: کنترل منفی.....53

شکل (۱۴-۴). دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-1F 53

شکل (۱۵-۴). مقایسه نقوش الکتروفورزی DNA تکثیر شده برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-2F، نشانگر DNA یک کیلو بازی، NC: کنترل منفی.....54

شکل (۱۶-۴). دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-2F 55

شکل (۱۷-۴). مقایسه نقوش الکتروفورزی DNA تکثیر شده برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-2R، نشانگر DNA یک کیلو بازی، NC: کنترل منفی 56

شکل (۱۸-۴). دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-2R.....56

شکل (۱۹-۴). مقایسه نقوش الکتروفورزی DNA تکثیر شده برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-4R، نشانگر DNA یک کیلو بازی، NC: کنترل منفی.....57

شکل (۲۰-۴). دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-4R.....58

شکل (۲۱-۴). مقایسه نقوش الکتروفورزی DNA تکثیر شده برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-6R، نشانگر DNA یک کیلو بازی، NC: کنترل منفی.....59

شکل (۲۲-۴). دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-6R.....59

شکل (۲۳-۴). مقایسه نقوش الکتروفورزی DNA تکثیر شده شده برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-9F، نشانگر DNA یک کیلو بازی، NC: کنترل منفی.....60

شکل(۲۴-۴). دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۳ جدایه منتخب *M PRNICIOSA*. با استفاده از آغازگر URP-9F 61

شکل (۴-۲۵). مقایسه نقوش الکتروفورزی DNA تکثیر شده برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-25F، نشانگر DNA یک کیلو بازی، NC: کنترل منفی..... 62
شکل (۴-۲۶). دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۳ جدایه منتخب *M PRNICIOSA*. با استفاده از آغازگر URP-25F 62
شکل (۴-۲۷). مقایسه نقوش الکتروفورزی DNA تکثیر شده برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-32F، نشانگر DNA یک کیلو بازی، NC: کنترل منفی..... 63
شکل (۴-۲۸). دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۳ جدایه منتخب *M.PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-32F..... 64
شکل (۴-۲۹). مقایسه نقوش الکتروفورزی DNA تکثیر شده برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-38F، نشانگر DNA یک کیلو بازی، NC: کنترل منفی..... 65
شکل (۴-۳۰). دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۳ جدایه منتخب *M.PRNICIOSA* با استفاده از آغازگر URP-38F..... 65
شکل (۴-۳۱). دندروگرام ترسیم شده بر اساس روش UPGMA و ضریب تشابه جاکارد برای ۲۳ جدایه منتخب *M. PRNICIOSA* حاصل از تلفیق داده های الگوبندی URP وپلات سه بعدی حاصل از تجزیه به مختصات اصلی به روش ماتریس تشابه JACCARD..... 67

فهرست نمودارها

نمودار (۱-۴). مقایسه گونه های مختلف قارچ MYCOGONE از نظر میزان کاهش عملکرد محصول قارچ خوراکی دکمه ای 45
نمودار (۲-۴). مقایسه سه زمان تلقیح از نظر میزان کاهش در عملکرد محصول قارچ خوراکی دکمه ای 45
نمودار (۳-۴). تعداد کل جایگاههای ژنی تکثیر شده، تعداد جایگاههای ژنی چند شکل و یک شکلی تکثیر شده توسط آغازگرهای مورد استفاده در نشانگر URP 69

فصل اول

1- مقدمه

در حال حاضر با توجه به افزایش جمعیت حتی با پیشرفت‌های بسیار محسوس در تولید محصولات کشاورزی و دامی و با در نظر گرفتن شرایط آب و هوایی و مرغوبیت زمین‌های زیر کشت جهان، تامین میزان زیاد ماده غذایی به آسانی امکان پذیر نخواهد بود(پروانه، 1371). جمعیت جهان در سال (2009) معادل (6800000000) نفر برآورد شده است که بیش از نیمی از جمعیت جهان ساکن قاره آسیا هستند و بعد از آن اروپا پرجمعیت ترین قاره جهان می‌باشد.

قارچ های خوراکی از نظر ارزش غذایی و دارویی بسیار حائز اهمیت هستند و در سال‌های اخیر پرورش این قارچ ها از پیشرفت قابل توجه و چشمگیری برخوردار بود، به طوری که توسط سازمان خوارو بار جهانی (FAO) به عنوان یک منبع مهم پروتیین در کشورهای در حال توسعه که بیشتر متکی به غلات و حبوبات به عنوان منابع غذایی هستند، معرفی شده است. مدارک موجود حاکی از این است که ارزش غذایی این قارچ ها از سال 1940 به بعد یعنی زمان بروز کمبود غذایی در اثر جنگ جهانی دوم مورد توجه قرار گرفت و تحقیقات وسیعی در رابطه با تعیین میزان پروتیین قارچ های خوراکی انجام شد (جمالی، 1380).

کمبود جهانی پروتیین، به ویژه در جهان سوم، از سال 1960 به بعد انگیزه جهانی در زمینه تحقیق پیرامون ارزش غذایی قارچ های خوراکی را برانگیخت و متعاقب آن تحقیقات بسیاری در رابطه با پروتیین انواع قارچ های خوراکی صورت گرفت. میزان پروتیین موجود در قارچ های خوراکی از 1/8 تا 5/9 درصد وزن تر قارچ و 35-25 درصد (بر اساس وزن خشک) متفاوت می باشد که این میزان از گونه‌ای به گونه دیگر تفاوت دارد، ولی میزان برآورد شده به مراتب از میزان پروتیین سبزیجات و میوه‌جات بیشتر بوده و در ضمن از انواع پروتیین‌ها با کیفیت مطلوب نیز محسوب می گردد. در مقام مقایسه، پروتیین قارچ تازه در حدود دو برابر پروتیین اغلب سبزیجات (به استثنای نخود سبز و کلم بروکلی) و حبوبات (لوبیا، نخود، عدس و غیره) است. اما قارچ خوراکی از لحاظ پروتیین نسبت به منابع پروتیین استاندارد، مانند گوشت (14 تا 20 درصد)، ماهی (15 تا 20 درصد)، تخم مرغ (13 درصد)، پنیر (25 درصد) و نان (9 درصد)، در درجه دوم اهمیت قرار دارد. با پرورش این قارچ ها می توان ضمن تهیه غذاهای لذیذ، مقوی و ارزان، کمبود پروتیین، ویتامین های A,D,E,K و املاح معدنی، از قبیل کلسیم، آهن و فسفر مورد نیاز بدن بویژه در کودکان و زنان باردار و ... را تامین نمود (محمدی گل تپه و پورجم، 1389). قارچهای خوراکی دارای طیف وسیعی از ویتامین‌هایی چون ویتامین B و C، تیامین، ریبوفلاوین ، نیاسین ، بیوتین و اسید پانتوتنیک هم می‌باشند. علاوه بر وجود ویتامین‌ها، مقادیر زیادی از عناصر و املاح معدنی چون پتاسیم، سدیم و فسفر را نیز می‌توان در قارچهای خوراکی مشاهده کرد (Sohi, 1986, Vijay and Gupta, 1997)

جدول ذیل لیستی از عناصر و ترکیبات تشکیل دهنـدۀ قارچهـای Agaricus را نشـان مـی‌دهـد (جمالی، 1380)

میزان درصد عناصر و ترکیبات تشکیل دهندۀ قارچ های Agaricus برحسب وزن تر است

ترکیب	درصد
آب	89/6
پروتیین	3/94
چربی	0/19
ترکیبات عصاره‌ای	4/01
فیبر	1/09
خاکستر	1/26

قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید رنگ با نام علمی *Agaricus bisporus* (Lang.)Sing ، یکی از مهمترین انواع قارچهای خوراکی است و کشت آن برای اولین بار در فرانسه و در سال 1650 میلادی آغاز شد. در حال حاضر میزان تولید جهانی آن 5 میلیون تن در سال می‌باشد و در ایران نیز شکوفایی تولید صنعتی آن به سالهای 1366- 1360 بر می‌گردد و تا قبل از سال 1364 فقط دو واحد پرورش قارچ دکمه ای وجود داشت که تا سال 1366 چهار واحد دیگر نیز شروع به کار کرد و تولید محصول از 72 تن در سال 1364 به 7795 تن در سال 1372 رسید. طبق آمار منتشره از سوی معاونت باغبانی وزارت کشاورزی در سال 1384، 217 واحد فعال و 12 واحد نیمه فعال پرورش قارچ دکمه ای وجود داشته است که سالانه 34 هزار تن محصول تولید می کرداند، ولی علی رغم این رشد فزاینده در میزان تولید هنوز میزان تولید در مقام مقایسه با سایر کشورهای تولید کننده بسیار کند است (محمدی گل تپه و پورجم، 1389). فرانسه و آلمان از بزرگترین مصرف کنندگان قارچ خوراکی هستند (بیش از 50 درصد آن فرآوری شده است) در حالی که در انگلستان، هلند و بلژیک ترجیحاً قارچ خوراکی تازه مصرف می شود. فروشندگان قارچ خوراکی اگر چه از نظر مکانی در مناطق مختلف پراکنده هستند ولی در حدود 90 درصد در اروپا هستند. از بین دوهزار گونه قارچ خوراکی شناخته شده فقط بیست گونه بصورت تجارتی کشت می شود.

قارچ های خوراکی به طور عام و قارچ خوراکی دکمه ای به طور خاص تحت تاثیر عوامل زنده و غیر زنده ای قرار می گیرند که می توانند خسارت های قابل توجهی را از نظر کیفی و کمی به محصول وارد کنند. قارچ ها موثرترین و مهمترین گروه از پاتوژن‌های قارچ خوراکی هستند (Fletcher and Ganney, 1968).

سه بیماری مهم که در کشورهای مختلف باعث خسارت سنگین در تولید قارچ خوراکی شده اند عبارتند از: بیماری حباب تر (*Mycogone perniciosa*)، حباب خشک (*Verticillium fungicola*) و بیماری تارعنکبوتی (*Dactylium dendroides*) (Fletcher and and Gaze, 2008, Gea *et al.*, 2003, Grogan and Gaze, 2000, Tanovi *et al.*, 2009, Umar *et al.*, 2000) یکی از مهمترین بیماری های قارچ خوراکی دکمه‌ای بیماری حباب تر یا wet bubble می باشد که به نامهای Le Mole، White mould، Mycogone disease، هم به کار می‌رود. اطلاعات در مورد جنبه‌های مختلف این بیماری محدود بوده و گزارشهای پراکنده‌ای در این زمینه وجود دارد. این بیماری باعث کاهش عمده محصولات در مراکز پرورش قارچ خوراکی می گردد (Nanagulyan and Yesayan, 2002, Sisto *et al.*, 1997).

1- 2- تنوع ژنتیکی

درک الگوهای گوناگونی ژنتیکی نه تنها برای پاسخ به سؤالات مرتبط با فرایندهای تکاملی و توسعه راهبردهای حفاظتی به‌کار می‌رود بلکه به‌عنوان پیش‌نیازی برای کاربرد موثر ذخایر ژنتیکی در برنامه‌های اصلاحی، بنیادی است. بنابراین، اولین گام در برنامه‌های اصلاحی تعیین روابط ژنتیکی و تنوع ژرم‌پلاسم‌های مختلف است (Urbanelli *et al.*, 2003). میزان تنوع ژنتیکی در یک گونه از اهمیت زیادی برخوردار است که این اهمیت ناشی از اهمیت بقای گونه‌ها در طبیعت در شرایط محیطی در حال تغییر می‌باشد (Miles and Chang, 1997). اطلاع از میزان تنوع ژنتیکی موجود در ژرم‌پلاسم و روابط ژنتیکی موجود بین ژنوتیپ‌ها، یکی از مهم‌ترین مسائل در جهت حفظ موثر و استفاده از منابع ژرم‌پلاسم موجود و شناسایی ژن‌های هدف به‌منظور بهبود صفات تجاری و مبارزه با بیماری‌ها می‌باشد (Pejic *et al.*, 1998, Stewart *et al.*, 1998, Warburton *et al.*, 2002). تنوع ژنتیکی آستانه تحمل یک گونه را در برابر انواع تنش‌ها بالا می‌برد. بنابراین، در هر برنامه اصلاحی وجود تنوع ژنتیکی از عوامل عمده در موفقیت محسوب می‌شود (Buckler, 2002).

1- 2- 1- روش های برآورد سطح تنوع ژنتیکی

درجه یا میزان تنوع موجود در یک ژرم‌پلاسم را می‌توان با استفاده از داده‌هایی مانند اطلاعات شجره‌ای، داده‌های ریخت شناسی، داده‌های پروتیینی و داده‌های حاصل از تفاوت افراد در سطح مولکول DNA مانند تنوع آللی در ژن‌های هدف، تنوع آللی در جایگاه نشانگری و غیره اندازه‌گیری کرد (Mohammadi, 2003).

1- 2- 2- روش های مولکولی تعیین تنوع ژنتیکی

روش‌های متعددی برای بررسی تفاوت افراد در سطح مولکول DNA در ارزیابی تنوع ژنتیکی استفاده شده است که این روش‌ها به دو گروه تقسیم می شوند (باقری و همکاران، 1381)

- روش‌هایی که در آنها هدف، تعیین تفاوت افراد در قسمت‌های مختلف ژنوم است که این تفاوت‌های طولی یا نوکلئوتیدی در مولکول DNA به‌عنوان نشانگرهایی برای تعیین سطح تنوع ژنتیکی و نیز مطالعات فیلوژنی استفاده می‌شود.
- روش‌های مبتنی بر توالی ژن‌های خاص که اغلب در تجزیه فیلوژنتیک به‌کار می‌روند.

در ژرم‌پلاسم‌هایی که سطح تنوع آنها مشخص نشده است، قبل از گروه‌بندی و شناسایی گروه-های ژنتیکی موجود، سطح تنوع ژنتیکی باید براساس روش‌های مختلف تعیین گردد (Mohammadi, 2003).

1-2-3- نشانگر های DNA در بررسی تنوع ژنتیکی

نشانگرهای متعددی در مطالعات تعیین تنوع ژنتیکی ژرم‌پلاسم‌ها استفاده می‌شوند که از جمله آنها می‌توان به نشانگر URP اشاره کرد.

1-2-4- URP

نشانگرهای مبتنی بر توالی‌های تکراری از قبیل ریزماهواره‌ها ابزارهای مناسبی برای بررسی چند شکلی DNA در گیاهان مختلف هستند. کانگ و همکاران (Kang *et al.*, 2002) اخیراً 12 آغازگر را برپایه قطعه DNA تکراری (pKRD) برنج طراحی کرده‌اند که به URP موسوم است. این آغازگرها علاوه‌بر ژنوم برنج قادر به تکثیر ژنوم‌های جانوری، گیاهی و میکروبی نیز می‌باشند. هرچند نشانگرهای URP مبتنی بر آغازگرهای تصادفی می‌باشند ولی طول بیشتر آغازگر و دمای اتصال بالا در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز سبب شده است که تکرارپذیری این تکنیک نسبت به تکنیک‌هایی مثل RAPD بیشتر باشد.

1-2-5- عوامل موثر در انتخاب نشانگر مناسب

امروزه نشانگرهای مولکولی مختلف به وفور در انسان، گیاه، حیوان و ریزموجودات به‌منظور مطالعات پایه‌ای یا کاربردی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این نشانگرها ویژگی‌ها، سودمندی و کاربردهای مختلفی دارند که در بسیاری از موارد بین برخی از نشانگرها مشترک است و در برخی موارد یک نشانگر نسبت به نشانگر دیگر از نظر موارد ذکر شده کارآمدتر می‌باشد. همچنین هر سیستم نشانگری دارای مزایا و معایبی است که با توجه به این مزایا و معایب باید بهترین سیستم نشانگری انتخاب شود. با توجه به تعداد زیاد، تنوع تکنیکی و تفاوت‌هایی که از نظر میزان چندشکلی و مبانی تولید و استفاده از نشانگرهای ژنتیکی وجود دارد ممکن است این پرسش پیش آید که کدام نشانگر مناسب‌تر است و از کدام یک باید استفاده کرد؟ در پاسخ به این سؤال باید به هدف از کاربرد نشانگر، دسترسی به آن، سهولت کاربرد و تفسیر نتایج، تکرارپذیری بالا، پراکنش و توزیع متعادل در کل ژنوم، امتیازدهی هم‌بارز، عدم‌استفاده از مواد خطرناک مانند مواد پرتوزا، هزینه کاربرد و غیره توجه نمود (قره‌یاضی، 1375).

در این مطالعه به منظور بررسی خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولـوژیکی و بیمـاری زایـی جدایـه های جمع آوری شده از مراکز کشت قارچ خوراکی دکمه‌ای در استان‌های تهران و البرز انجـام گرفـت. همچنین با توجه به اهمیت قارچ خوراکی دکمه‌ای به لحـاظ ارزش غـذایی و دارویـی انجـام مطالعـات ژنتیکی بیمارگرهای این قارچ نیز، ضروری به نظر می‌رسد، به طوری که بـا اسـتفاده از الگـوی بدسـت آمده از جدایه‌های قارچ، می‌توان انتشار و پراکندگی جدایه‌های مورد نظر را بررسی نمود.

فصل دوم

بررسی منابع