بسم الله الرحمن الرحيم

مدیریت تحصیلات تکمیلی
دانشکده کشاورزی
گروه گیاه‌پزشکی

پایان‌نامه جهت اخذ درجه دکتری در رشته بیماری شناسی گیاهی

شناسایی قارچ‌های همراه قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) و بررسی فعالیت ضدقارچی جدایه‌های برتر درون‌زی جداسازی شده علیه برخی عوامل بیماریزا از طریق امتزاج پروتوپلاست‌ها

اساتید راهنما:
دکتر محمد سالاری
دکترمحمد جوان‌نیکخواه

اساتید مشاور:
دکتر مهدی پیرنیا
دکتر محمدرضا آصف

تهیه و تدوین:
کوثر شیرازی

مهرماه ۱۴۰۱

چکیده

قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) به عنوان یکی از مهمترین انواع قارچ‌های خوراکی، جزء باصرفه‌ترین و اقتصادی‌ترین محصولات غذایی و دارویی می‌باشد که به دلیل کالری کم و محتوای بالای کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها، فیبرها، ترکیبات فنلی، اسیدهای چرب اشباع نشده، ویتامین‌ها و مواد معدنی منبع غذایی قابل توجهی برای انسان‌ها به‌حساب می‌آید و همانند سایر محصولات کشاورزی مورد حمله بیمارگرهای قارچی گوناگون قرار می‌گیرد. آلودگی قارچ دکمه‌ای سفید به قارچ‌های بیمارگر *Mycogone perniciosa*، *Lecanicillium fungicula* و *Trichoderma harzianum* به عنوان مهمترین عوامل بیمارگر آن، منجر به کاهش کیفیت و بازدهی محصول شده که قابل عرضه به بازار نمی‌باشد و خسارت قابل توجهی را به پرورش‌دهندگان قارچ‌خوراکی وارد می‌کنند. به دلیل تأثیر مضر مصرف سموم شیمیایی مانند آلودگی‌های زیست محیطی و به خطر افتادن سلامت انسان، حیوانات و مسئله مقاومت بیمارگرها، تاکید زیادی روی کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی با استفاده از آنتاگونیست‌ها و کنترل کننده‌های زیستی می‌باشد. برای شناسایی قارچ‌های درون‌زی (mycoendobiont) قارچ دکمه‌ای، نمونه‌برداری از کلاهک، تیغه و پایه قارچ‌های دکمه‌ای سالم و بیمار از سالن‌های پرورش قارچ خوراکی در سراسر ایران انجام گرفت. در مجموع، ۳۱۰ جدایه قارچی به دست آمد که ۱۴۴ جدایه از کلاهک، ۶۴ جدایه از تیغه و ۱۰۲ جدایه از پایه جداسازی شد. علاوه بر این، ۹۰ جدایه بیمارگر نیز، از بافت‌های آلوده جداسازی شد. در نهایت، بر اساس ویژگی‌های ریخت شناختی و توالی ناحیه ژنومیrDNA-ITS، سی آرایه قارچ درون‌زی و ده آرایه قارچ بیمارگر به دست آمد که تا سطح گونه شناسایی شدند. گونه‌های *Cephalotrichum purpureofuscum*، *Cladosporium allicinum*، *Clonostachys pseudochroleuca*، *Paecilomyces sinensis*، *Penicillium parvum*، *Peziza ostracoderma* و *Scedosporium apiospermum* برای بیوتای قارچی ایران جدید می‌باشند. جنس‌های ***Peziza*** و ***Scedosporium*** تاکنون از هیچ میزبان گیاهی به عنوان اندوفیت گزارش نشده‌اند. غربالگری اولیه جدایه‌های قارچ‌های درون‌زی علیه بیمارگرهای قارچ دکمه‌ای به روش کشت متقابل و اختلاط در محیط کشت انجام گرفت و دوازده جدایه انتخاب شد. غربالگری ثانویه جدایه‌های برتر با ارزیابی فعالیت ضدقارچی جدایه‌های درون‌زی علیه بیمارگرهای قارچ دکمه‌ای در شرایط گلخانه انجام گرفت که در نهایت، دو جدایه والدی *Fusarium venenatum* KS-S32 و جدایه *Clonostachys rosea* KS-C22 که بیشترین اثر بازدارندگی را در برابر هر سه بیمارگر مهم قارچ دکمه‌ای نشان دادند، به عنوان جدایه‌های برتر شناسایی و برای امتزاج پروتوپلاست انتخاب شدند. بهترین زمان انکوباسیون برای آزادسازی پروتوپلاست‌ها برای هر دو والد چهار ساعت تعیین شد و بیشترین تولید میزان پروتوپلاست با غلظت شش میلی‌گرم در میلی‌لیتر آنزیم تخریب کننده دیواره سلولی Glucanex با ۰/۶ مولار کلرید پتاسیم حاصل شد. بیشترین نرخ امتزاج پروتوپلاست با ۴۰ درصد پلی اتیلن گلیکول به‌دست آمد و باززایی پروتوپلاست‌ها بررسی گردید. مقایسه و ارزیابی فعالیت ضدقارچی امتزاج‌یافته‌ها و والدین به روش‌های کشت متقابل و اختلاط در محیط کشت و همچنین بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که امتزاج‌یافته FC2 به طور معنی‌داری بیشتر از جدایه‌های والدی باعث کنترل بیمارگرها در قارچ دکمه‌ای می‌شود. جداسازی و شناسایی متابولیت‌های تولیدی موثر در فعالیت ضدقارچی امتزاج‌یافته FC2 و جدایه‌های والدی به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) انجام شد که بیشترین فعالیت در امتزاج‌یافته FC2 مشاهده شد. همچنین، ترکیب موثر علیه بیمارگرهای *M. perniciosa*، *L. fungicula* و *T. harzianum*، ترکیب ۹-اکتادکنوئیک اسید یا اسید اولئیک مشخص شد. در مجموع، امتزاج پروتوپلاست بین دو جدایه درون‌زی *F. venenatum* و *C. rosea* باعث افزایش فعالیت ضدقارچی علیه بیمارگرهای قارچ دکمه‌ای و افزایش رشد و بازدهی محصول می‌شود.

واژه‌های کلیدی: قارچ خوراکی، درون‌زی، همزیست، بیوکنترل، اسپان، پروتوپلاست، اسید اولئیک

Abstract:
White button mushroom (*Agaricus bisporus*) is one of the most important types of edible mushrooms and one of the most economical food and medicine products. Due to low calorie and high content of carbohydrates, proteins, fiber, phenolic, unsaturated fatty acids, vitamins and minerals are significant sources of food. Infection of white button mushroom by *Mycogone perniciosa*, *Lecanicillium fungicula* and *Trichoderma harzianum* as its most important pathogenic fungi, reduces the quality and yield of the product which are not marketable and cause significant damage to breeders. Due to the detrimental effects of pesticides such as environmental pollution, concerns about human and animal health, and pathogen resistance to pesticides, emphasis is on biological control of plant diseases with antagonists and bio-controllers. To identify mycoendobiont fungi from button mushroom, samples were obtained from the cap, gills and stalk of healthy and infection mushroom, which collected from major mushroom growing farms in Iran. A total of 310 fungal isolates were obtained, 144 isolates were isolated from the cap, 64 isolates from the gills and 102 isolates from the stalk. In addition, 90 pathogenic isolates were isolated from infected cap tissues. Finally, 30 mycoendobiont taxa and 10 pathogenic taxa were identified based on morphological characteristics and rDNA-ITS region sequencing at the species level. Species of *Cephalotrichum purpureofuscum*, *Cladosporium allicinum*, *Clonostachys pseudochroleuca*, *Paecilomyces sinensis*, *Penicillium parvum*, *Peziza ostracoderma* and *Scedosporium apiospermum* are as new taxa for mycobiota of Iran. Primary screening of mycoendobiont isolates against button mushroom pathogens was performed based on the dual culture and mixed-medium methods and 12 isolates were chosen. Secondary screening of the selected isolates was performed with the assessment of antifungal activity of mycoendobiont isolates against button mushroom pathogens in greenhouse conditions. Eventually, two isolates of *Fusarium venenatum* KS-S32 and *Clonostachys rosea* KS-C22, which showed the highest inhibitory effect against pathogen were chosen for protoplast fusion. The best incubation time for the release of protoplasts from both parental isolates was determined to be 4 hours. The maximum protoplast yield was gained with a concentration of 6 mg per ml of glucanex cell wall degrading enzyme using 0.6 M KCL. The highest protoplast fusion rate was achieved with 40% Polyethylene glycol. Evaluation of antifungal activity of fusants and parent isolates on dual culture, mixed-medium methods and greenhouse conditions revealed that FC2 fusant significantly controlled pathogens. Isolation and identification of the generated metabolites affecting FC2 fusant and parental isolates were done based on the preparative TLC and HPLC. The highest activity was observed in FC2 fusant. The effective compound against *M. perniciosa*, *L. fungicula* and *T. harzianum*, 9-octadecanoic acid or oleic acid was identified. In total, protoplast fusion between *F. venenatum* KS-S32 and *C. rosea* KS-C22 causes an increase of antifungal activity, growth and yield in white button mushroom.
Keywords: Edible mushroom, mycoendobiont, symbiosis, biocontrol, spawn, protoplast, oleic acid.

University of Zabol
Graduate School
Faculty of Agriculture
Department of Plant Protection

The Thesis Submitted for the Degree of Ph.D of Plant Pathology

Identification of fungi associated with *Agaricus bisporus* and evaluation of antifungal activity of the best mycoendobiont isolates against some pathogens by protoplast fusion method

Supervisors:
Dr. Mohammad Salari
Dr. Mohammad Javan-Nikkhah

Advisors:
Dr. Mahdi Pirnia
Dr. Mohammad Reza Asef

By:
Kowsar Shirazi

October 2022