قارچ‌های جدا شده از *Agaricus bisporus* در استان تهران و گزارشی از وضعیت *Verticillium fungicola* در ایران

Fungi isolated from *Agaricus bisporus* in Tehran province with special reference to *Verticillium fungicola*

رسول زارع* و حسین خباز جلفایی

موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی

دریافت: ۱۳۸۴/۳/۳ پذیرش: ۱۳۸۴/۶/۲۶

چکیده

طی سالهای ۸۳-۱۳۸۲ واحدهای عمده پرورش قارچ خوراکی در استان تهران مورد بازرسی و نمونه برداری قرار گرفت و تعداد ۱۰۳ جدایه قارچ به دست آمد. از میان گونه‌های به دست آمده *Verticillium fungicola* (با ۵۰ جدایه)، *Trichoderma harzianum* (با ۲۴ جدایه)، *Cladobotryum dendroides* (با ۱۶ جدایه) و *Acremonium crotocinigenum* (با ۱۱ جدایه) بالاترین فراوانی را داشتند. گونه *A. crotocinigenum* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شود. معیار آزمون دمایی جهت تشخیص دو گونه *T. harzianum* و *T. aggressivum* معیار قابل اعتمادی نیست زیرا جدایه‌های ایرانی که تحت نام *T. harzianum* معرفی شده‌اند از نظر دمایی مشابه *T. aggressivum* هستند اگرچه احتمال دارد که جدایه‌های ایرانی نماینده گونه جدیدی از تریکودرما باشند. در مقایسه مولکولی در سطح ITS مشخص شد که از *V. fungicola* دو واریته *fungicola* و *flavidum* در ایران وجود دارند. این دو واریته با معیارهای مورفولوژیکی از یکدیگر قابل تشخیص نمی‌باشند.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های قارچزی، *Agaricus bisporus*، *Verticillium fungicola*، *Trichoderma*، *Acremonium*، *Cladobotryum*

* مسئول مکاتبه

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

با تشخیص ارزش غذایی بالای قارچ‌های خوراکی و توسعه کشت و پرورش انواع این قارچ‌ها بخصوص گونه *Agaricus bisporus*، مدیریت واحدهای پرورش قارچ خوراکی به خصوص از نظر کنترل بیماری‌های قارچ خوراکی از اهمیت قابل توجهی برخوردار است. قارچ‌های بیماریزا در کشورهای مختلف از جمله ایران خسارت قابل توجهی را به پرورش دهندگان تحمیل می‌نمایند. در ایران رقم این خسارت برآورد نشده است، اما در مواردی مشاهده شده است 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 آنجایی که پرورش قارچ خوراکی در اروپا توسعه بیشتری دارد، بیماری‌های این قارچ‌ها نیز در اروپا بیشتر مورد بررسی قرار گرفته‌اند. با توسعه پرورش قارچ‌های خوراکی در ایران، پیش بینی می‌شود که با توجه به گرمتر بودن هوا (یعنی نزدیکتر بودن دما به دمای بهینه برای رشد اغلب عوامل بیماریزا) این عوامل به عنوان مهمترین عوامل بازدارنده پرورش قارچ‌های خوراکی در ایران به شمار روند.

از جدی‌ترین عوامل بیماریزا در قارچ‌های خوراکی می‌توان به *Verticillium fungicola*، *Mycogone perniciosa* (Smith 1924, Treschow 1941, Zare)، *Lecanicillium psalliotae* (& Gams 2001)، *Trichoderma harzianum* و گونه‌های *Cladobotryum* (آصف و محمدی گل تپه ۱۳۸۱) اشاره کرد. در گونه *V. fungicola* سه واریته *fungicola*، *flavidum* و *aleophilum* توسط گمس و ون‌زاین (Gams & van Zaayen 1982) معرفی شده است که اساس تشخیص این واریته‌ها دماهای بیشینه و بهینه رشد ذکر شده است. بختیاری و همکاران (۲۰۰۴) وجود بیماری حباب خشک ناشی از گونه *V. fungicola* را از ایران گزارش نموده و دماهای کمینه، بهینه و بیشینه برای رشد قارچ را اندازه گرفته و دمای بیشینه را ۳۷ درجه سانتی‌گراد تعیین نمودند، این در حالیست که حتی گرمادوست‌ترین واریته این گونه (*aleophilum*) نیز در دمای ۳۳ درجه قادر به رشد نمی‌باشد (Gams & van Zaayen 1982, Zare & Gams 2006, unpubl.). دانستن این دما و مقایسه آن با دمای بهینه رشد میزبان می‌تواند به اتخاذ تصمیم جهت کاهش خسارت بیماری کمک نماید.

روش بررسی

نمونه برداری و بررسی علایم

در این بررسی از واحدهای تولیدی قارچ خوراکی دکمه‌ای ملارد، صدفی، پدم، فرشاد، مهرچین، پارس شهریار و آسیا نمونه‌برداری شد. به طوری که سالن‌های چین اول، دوم یا سوم این واحدها مورد بازدید قرار گرفتند و کارپوفورهای واجد علایم بیماری حباب خشک از قاعده

Archive of SID

www.SID.ir

پایه برداشت شده و در ظروف یک بار مصرف قرار داده شدند. پس از یادداشت مشخصات لازم از جمله وضعیت علایم و محل و زمان نمونه برداری روی ظروف با نایلون پوشانده و جهت جداسازی عامل یا عوامل احتمالی به آزمایشگاه منتقل شدند.

جداسازی

قطعاتی از نمونه‌ها پس از ضدعفونی سطحی با الکل اتیلیک ۷۰ درصد و گذراندن از روی شعله با اسکالپل سترون بریده و در سطح محیط کشت عصاره مالت - آگار (MEA) حاوی ۵۰ قسمت در میلیون از هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین برای ممانعت از رشد باکتری‌ها به منظور جداسازی قارچ‌ها استفاده شد. کلیه کشت‌ها به روش تک اسپور کردن خالص سازی شدند و تا استفاده بعدی روی محیط کشت MEA در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون بیماریزایی

برای این منظور در سالن کوچکی قفسه بندی شده، تعداد ۱۰۰ بسته کمپوست سه کیلوگرمی تحت شرایط دمایی ۲۵ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی ۸۵ درصد نگهداری شدند. پس از گذشت ۱۵ روز از زمان بذرزنی، پنجه دوانی این بسته‌ها کامل شد. آنگاه روی کمپوست پنجه دوانی شده به ضخامت حدود سه سانتی‌متر خاک پوششی پاستوریزه شده (در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت) داده شد. پس از گذشت سه روز از خاک‌دهی، روی خاک هر بسته، مقدار ۱۰ میلی لیتر سوسپانسیون جدایه مورد نظر که حاوی حدود $۱۰^{۶}$ هاگ در میلی‌لیتر آب بود، پاشیده شد. پس از ظهور سرسنجاقی‌ها و تکامل آن‌ها به کلاهک‌ها، جدایه‌هایی که ایجاد بیماری حباب خشک در کلاهک‌ها کردند به عنوان جدایه‌های بیماریزا انتخاب و مورد شناسایی قرار گرفتند. در این آزمایش برای هر جدایه سه بسته کمپوست سه کیلوگرمی در نظر گرفته شد. تیمار شاهد هم سه بسته کمپوست سه کیلوگرمی منظور گردید.

شناسایی قارچ‌ها

جهت شناسایی قارچ‌ها از محیط‌های کشت PDA (برای مشاهده پرگنه و اندازه گیری رشد و دمای بهینه) و PCA (جهت مطالعه میکرومورفولوژی) استفاده شد. عکسبرداری با استفاده از میکروسکوپ اولیمپوس (BH2) و دوربین دیجیتال اولیمپوس (C-4000) انجام شد. اندازه‌گیری‌ها به روش دیجیتال با استفاده از نرم افزار بیولومیکس (BioloMICS, BioAware,

Archive of SID

www.SID.ir

S.A., 2003, Version 1.0.2) ارایـه شـده توسـط Dr. Vincent Robert انجـام شـد. در مـورد کنیدیوم‌ها حداقل از ۳۰ عدد و در مورد فیالیدها حداقل از ۲۰ عدد اندازه‌گیری شد.

مطالعات مولکولی

استخراج DNA: از محیط کشت مـایع CM (complete medium) بـا ترکیـب ۲۰ گـرم دکستروز، ۲ گرم پپتون، ۲ گرم عصاره مخمـر، ۰/۵ گـرم سـولفات منیزیـوم $7H_20$، ۰/۴۵ گـرم KH_2PO_4 و ۱ گرم K_2HPO_4 جهت تولید میسلیوم استفاده شد. جهت استخراج DNA از کیـت سـریع اسـتخراج FastDNA®Kit (Cat. No. 6540-400, OmniLab 6050073, BIO101, Carlsbad CA) استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): یک میکرولیتر از هر نمونـه DNA (حـاوی ۵۰-۱۰۰ نانوگرم DNA در میکرولیتر) برای انجام PCR استفاده شـد. بـرای تکثیـر منطقـه ITS (شـامل ITS1-5.8S-ITS2) از آغازگرهای ITS1 بـا تـوالی '5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 و ITS4 با توالی '5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al*. 1990) و برنامه دمـایی ۹۴ درجه (۶۰ ثانیه) به عنوان چرخه ابتدایی (واسرشت سازی) و سپس ۳۵ چرخـه شـامل ۹۴ درجه (۴۰ ثانیه) ۵۵ درجه (۵۰ ثانیه) و ۷۲ درجه (۱۲۰ ثانیه) و در نهایت به مدت ۷ دقیقه در دمـای ۷۲ درجـه اسـتفاده شـد. بـرای تکثیـر از دسـتگاه PCR (BioRad, GeneAmp, PCR System 9700) استفاده شد. مخلوط واکنش برای هر نمونه ۵۰ میکرولیتر حجم داشت و شامل ۲۵ پیکومول از هر آغازگر، ۲۰۰ میکرومول از هر dNTP (Amersham, Bioscience, Uppsala, Sweden) بافر X1 شامل ۳ میلـی‌مـول $MgCl_2$، ۱/۵ واحـد آنـزیم پلیمـراز *Taq* polymerase, (SuperTaq, HT Biotechnology, UK) بود که حجم آن با استفاده از آب دو بار تقطیر بـه ۵۰ میکرولیتر رسید.

تعیـین تـوالی: DNA تکثیـر شـده توسـط کیـت خـالص سـازی GFX PCR DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia, 27-9602-01, USA) طبق توصیه شرکت سـازنده تمیز شد. با استفاده از آغازگرها و DNA تکثیر شده فوق PCR دیگری برای تعیین توالی انجـام شد. حجم هر مخلوط واکنش در این PCR برابر ۱۰ میکرولیتر شامل یـک میکرولیتـر از DNA (حاوی ۰/۱ تا ۰/۲ پیکومول)، یـک میکرولیتـر آغـازگر (حـاوی ۴ پیکومـول)، یـک میکرولیتـر sequencing reagent premix، ۳ میکرولیتـــر بـــافر و ۵ میکرولیتـــر آب دو بـــار تقطیـــر (HPLC grade) بود. برنامه PCR در این مرحلـه شـامل ۲۵ چرخـه ۹۵ درجـه (۲۰ ثانیـه) ۵۰ درجه (۱۵ ثانیـه) و ۶۰ درجـه (۶۰ ثانیـه) بـود. محصـول ایـن PCR بـا اسـتفاده از سـفادکس

Archive of SID

www.SID.ir

خالص سازی و توسط دستگاه توالی‌یاب (17-0041-01 G-50) ,Amersham Pharmacia Prism 3700 DNA (ABI Analyzer, PE Applied Biosystems Hitachi) تعیین توالی شد.

ردیف کردن توالی‌ها و فیلوژنی: از برنامه های EditSeq، SeqMan که بخش‌هایی از نرم افزار DNA*Lasergene (DNAstar Inc., Madison, Wisconsin, 1984) هستند برای مونتاژ (assemble) و ویرایش (edit) توالی‌های به دست آمده استفاده شد. توالی‌ها ابتدا با استفاده از دستور Pairwise Alignment در برنامه GeneDoc (Nicholas & Nicholas 1997) ردیف شده سپس به صورت دستی این کار تکمیل شد. برای ساخت درخت فیلوژنی به روش Distance از نرم افزار TreeCon (Van de Peer & de Wachter 1994) استفاده شد. درخت فیلوژنی با استفاده از ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap با روش Neighbor-Joining و گزینه Jukes & Cantor ساخته شد.

نتیجه و بحث

در مجموع تعداد ۱۰۳ جدایه از لکه‌های موجود روی کلاهک و تیغه‌های قارچ *Agaricus bisporus* به دست آمد. مشخصات این قارچها از قبیل محل و تاریخ جمع آوری در جدول ۱ ارایه شده است. قارچهای به دست آمده شامل *Trichoderma harzianum*، *T. virens*، *T. atroviride*، *Verticillium fungicola* شامل دو واریته *flavidum* و *fungicola*، *Acremonium crotocinigenum* و *Cladobotryum dendroides* بودند. گونه *A. crotocinigenum* و دو واریته *V. fungicola* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شوند. گونه‌های تریکودرما قبلا توسط *ظفری* و همکاران (۲۰۰۴، ۲۰۰۲) گزارش شده‌اند. گونه *Cladobotryum dendroides* نیز قبلا توسط *آصف* و *محمدی گل تپه* (۲۰۰۲) گزارش و توصیف شده است. بر اساس مطالعات *ساموئلز* و همکاران (Samuels *et al*. 2002) مهمترین اختلاف دو گونه *T. harzianum* و *T. aggressivum* حداکثر دمای رشد است. اگرچه بسیاری از جدایه‌های به دست آمده در این بررسی بر اساس معیارهای *ساموئلز* و همکاران (۲۰۰۲) در *T. aggressivum* قرار می‌گیرند اما بر اساس مطالعات مولکولی (AFLP) انجام شده توسط *وهابی* (۱۳۸۳)، این جدایه‌ها با هر دو گونه *T. harzianum* و *T. aggressivum* اختلاف دارند. با توجه به اینکه معیار حداکثر دمای رشد گزارش شده توسط *ساموئلز* و همکاران (۲۰۰۲) در مورد جدایه‌های ایرانی صدق نمی‌کند، به نظر می‌رسد ارزش این معیار باید مورد بازنگری قرار گیرد. از اینرو تا روشن شدن ارزش معیار حداکثر دمای رشد، نگارندگان از گزارش گونه *T. aggressivum* از ایران خودداری می‌کنند. گونه *Acremonium crotocinigenum* بر اساس *گمس* (Gams 1971) شناسایی شد. این گونه دارای پرگنه سریع الرشد به طوری‌که قطر رشد آن پس از ۱۰ روز به ۴۰-۳۰ میلی‌متر می‌رسد. پرگنه تا حدی پنبه‌ای، در حاشیه سفید و به

Archive of SID

www.SID.ir

طرف مرکز نارنجی مایل به زرد کمرنگ و در سطح زیرین بیرنگ است. کنیدیوم‌زایی فراوان، فیالیدها ۶۵-۲۰ میکرومتر طول و ۳-۲ میکرومتر ضخامت در پایه که در انتها به ۱/۳-۱ میکرومتر باریک می‌شود. کنیدیوم‌ها در سرهای کنیدیومی مرطوب تولید شده، اغلب تک سلولی (ندرتا دو سلولی)، شفاف، استوانه‌ای و بعضا کمی خمیده‌اند. طول کنیدیوم‌ها ۷-۴ میکرومتر و عرض آن‌ها ۲/۵-۱/۵ میکرومتر می‌باشد. اگرچه جدایه‌های ایرانی حتی پس از ۲۰ روز هم کلامیدوسپور تولید نکردند اما کلامیدوسپورهای بینابینی و زنجیری با سلول‌های کروی و اندازه ۸-۵ میکرومتر توسط گمس (۱۹۷۱) گزارش شده‌اند. این گونه اغلب از گونه‌های جنس‌های مختلف قارچی شامل *Polyporus*, *Fomes*, *Heterobasidion*, *Trametes*, *Hypoxylon*, *Tuber* و *Agaricus* جدا شده است (گمس ۱۹۷۱).

جدول۱- جدایه‌های به دست آمده از مناطق نمونه برداری شده استان تهران

Table 1. Isolates obtained from different locations in Tehran province

Fungus	Collection number	Location
Acremonium crotocinigenum	V07 = IRAN 706C	Shahriar (Farshad)
Acremonium crotocinigenum	V14	Shahriar (Farshad)
Acremonium crotocinigenum	V15	Shahriar (Farshad)
Acremonium crotocinigenum	V34 = IRAN 708C	Mallard (Mallard)
Acremonium crotocinigenum	V35	Mallard (Mallard)
Acremonium crotocinigenum	V36	Mallard (Mallard)
Acremonium crotocinigenum	V50	Shahriar (Mehrchin)
Acremonium crotocinigenum	P4	Mohammadshahr (Pedam)
Acremonium crotocinigenum	P3	Mohammadshahr (Pedam)
Acremonium crotocinigenum	P1	Mohammadshahr (Pedam)
Acremonium crotocinigenum	P2	Mohammadshahr (Pedam)
Cladobotryum dendroides	M3	Mallard (Mallard)
Cladobotryum dendroides	M2	Mallard (Mallard)
Cladobotryum dendroides	F18	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	F19	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	F15	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	F13	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	F16	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	F9	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	F8	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	F17	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	F14	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	F20	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	M1	Mallard (Mallard)
Cladobotryum dendroides	F12	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	F11	Shahriar (Farshad)
Cladobotryum dendroides	F10	Shahriar (Farshad)
Trichoderma harzianum	SH8	Shahriar (Pars-e-Shahriar)
Trichoderma harzianum	SH5	Shahriar (Pars-e-Shahriar)

Archive of SID

www.SID.ir

Trichoderma harzianum	SH9	Shahriar (Pars-e-Shahriar)
Trichoderma harzianum	SH2	Shahriar (Pars-e-Shahriar)
Trichoderma harzianum	S3	Hashtgerd (Sahar)
Trichoderma harzianum	SH1	Shahriar (Pars-e-Shahriar)
Trichoderma harzianum	S7	Hashtgerd (Sahar)
Trichoderma harzianum	S4	Hashtgerd (Sahar)
Trichoderma harzianum	F4	Shahriar (Farshad)
Trichoderma harzianum	S1	Hashtgerd (Sahar)
Trichoderma harzianum	SH6	Shahriar (Pars-e-Shahriar)
Trichoderma harzianum	SH7	Shahriar (Pars-e-Shahriar)
Trichoderma harzianum	S6	Hashtgerd (Sahar)
Trichoderma harzianum	S2	Hashtgerd (Sahar)
Trichoderma harzianum	S8	Hashtgerd (Sahar)
Trichoderma harzianum	SH4	Shahriar (Pars-e-Shahriar)
Trichoderma harzianum	SH3	Shahriar (Pars-e-Shahriar)
Trichoderma harzianum	S5	Hashtgerd (Sahar)
Trichoderma harzianum	P15	Mohammadshahr (Pedam)
Trichoderma harzianum	P20	Mohammadshahr (Pedam)
Trichoderma harzianum	P16	Mohammadshahr (Pedam)
Trichoderma harzianum	P18	Mohammadshahr (Pedam)
Trichoderma harzianum	P17	Mohammadshahr (Pedam)
Trichoderma harzianum	P19	Mohammadshahr (Pedam)
Trichoderma atroviride	P14	Mohammadshahr (Pedam)
Trichoderma virens	SH10	Shahriar (Pars-e-Shahriar)
Trichoderma virens	SH11	Shahriar (Pars-e-Shahriar)
Verticillium fungicola	F7	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	F6	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	P10	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	P11	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	P12	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	P13	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	P9	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	F5	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	V02 = IRAN 707C	Shahriar (Mehrchin)
Verticillium fungicola	V03	Shahriar (Mehrchin)
Verticillium fungicola	V04	Shahriar (Mehrchin)
Verticillium fungicola	V05	Shahriar (Mehrchin)
Verticillium fungicola	V06	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	V08	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	V12	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	V13	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	V16	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	V17	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	V18	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	V19 = IRAN 710C	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	V20	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	V22	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	V23	Mohammadshahr (Pedam)

Archive of SID

www.SID.ir

Verticillium fungicola	V24	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	V25	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	V26 = IRAN 711C	Kordan (Asia)
Verticillium fungicola	V27	Kordan (Asia)
Verticillium fungicola	V28	Kordan (Asia)
Verticillium fungicola	V29	Kordan (Asia)
Verticillium fungicola	V30	Kordan (Sadaf)
Verticillium fungicola	V31	Kordan (Sadaf)
Verticillium fungicola	V32	Kordan (Sadaf)
Verticillium fungicola	V33	Kordan (Sadaf)
Verticillium fungicola	V37 = IRAN 709C	Mallard (Mallard)
Verticillium fungicola	V40	Mallard (Mallard)
Verticillium fungicola	V41	Mallard (Mallard)
Verticillium fungicola	V42	Mallard (Mallard)
Verticillium fungicola	V43	Shahriar (Mehrchin)
Verticillium fungicola	V44	Shahriar (Mehrchin)
Verticillium fungicola	V45	Shahriar (Mehrchin)
Verticillium fungicola	V46	Shahriar (Mehrchin)
Verticillium fungicola	V47	Shahriar (Mehrchin)
Verticillium fungicola	V48	Shahriar (Mehrchin)
Verticillium fungicola	V49	Shahriar (Mehrchin)
Verticillium fungicola	F1	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	F3	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	F2	Shahriar (Farshad)
Verticillium fungicola	P7	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	P6	Mohammadshahr (Pedam)
Verticillium fungicola	P5	Mohammadshahr (Pedam)

- تمامی جدایه‌ها از قارچ *Agaricus bisporus* به دست آمده‌اند.

- IRAN…C = مجموعه قارچ‌های زنده مربوط به هرباریوم وزارت جهاد کشاورزی مستقر در موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران.

- All isolates were obtained from *Agaricus bisporus*.

- IRAN…C = Fungal Culture Collection of Herbarium Ministerii Iranici Agriculturae, Plant Pests & Diseases Research Institute, Tehran.

علایم بیماری حباب خشک

چنانچه عامل بیماری حباب خشک (dry bubble disease) از زمان دادن خاک پوششی (casing soil)، در خاک پوششی بوده باشد، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سالن رشد نموده و موجب کاهش تعداد سرسنجاقی‌ها (pinheads) می‌گردد. پس از ظهور سرسنجاقی‌ها تا بلوغ کلاهک‌ها به طور عمده سه فرم علایم در کارپوفورها قابل مشاهده است:

۱- بروز لکه‌های قهوه‌ای با حاشیه نامشخص در سطح کلاهک‌ها که ابتدا کوچک (حدود یک میلی‌متر) هستند و با گذشت زمان و رشد کلاهک‌ها، بزرگ شده و در شرایط رطوبتی بالای سالن پرورش، به هم پیوسته و قسمت اعظم سطح کلاهک را اشغال می‌کنند. به مرور روی این

Archive of SID

www.SID.ir

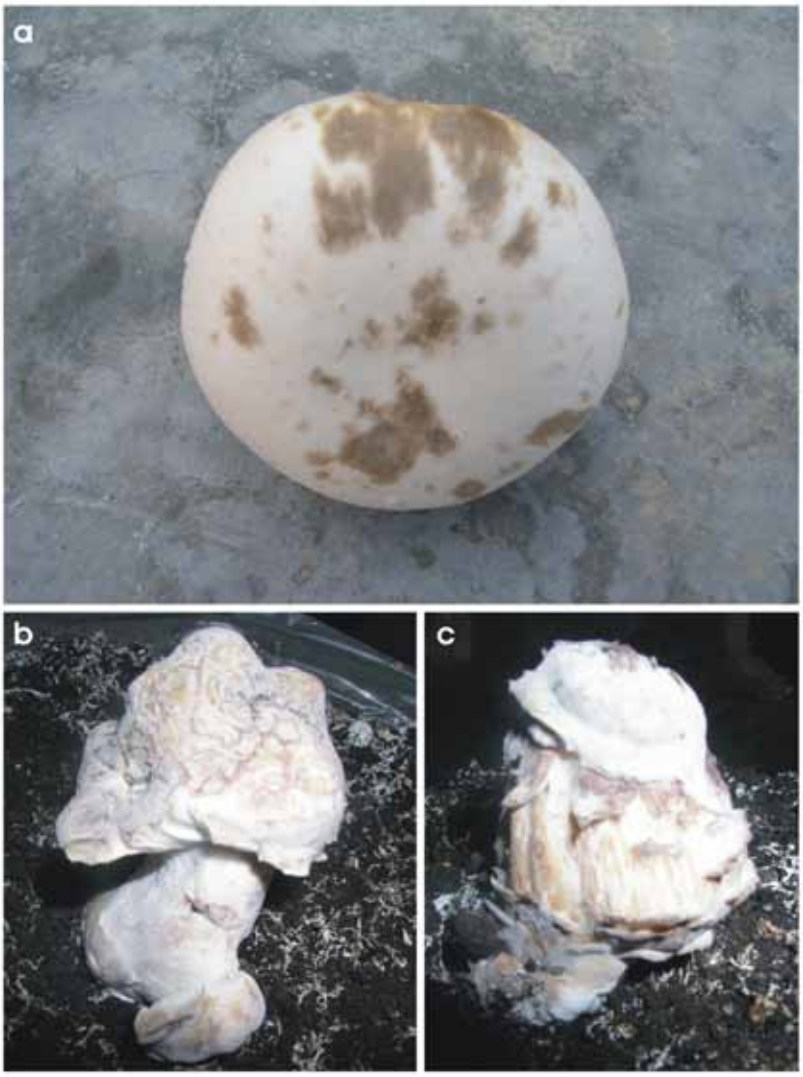
لکه‌ها بار قارچ بیمارگر به صورت پودری تشکیل می‌شود. ۲- تغییر رنگ پایه کلاهک‌ها به کرم مایل به قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای و پوسته پوسته شدن سطح بیرونی کلاهک‌ها. ۳- تغییر شکل پایه و کلاهک از ابتدای رشد به طوری‌که پایه کج و معوج (غیر عادی) شده و کلاهک کاملاً تغییر شکل می‌یابد. رنگ این کارپوفورهای بیمار قهوه‌ای تا قهوه‌ای روشن می‌باشد (شکل ۱).

در مواردی قطرات عسلی رنگ در سطح کلاهک‌ها و پایه‌های بیمار دیده می‌شود که شباهت زیادی به بیماری حباب تر (wet bubble disease) ناشی از قارچ *Mycogone perniciosa* دارد ولی در جداسازی، عامل بیماری حباب خشک (*Verticillium fungicola*) جدا می‌گردد.

واریته‌های مختلف گونه *Verticillium fungicola* قبلا توسط *گمس* و *ون‌زاین* (۱۹۸۲) بر اساس اختلاف دمای رشد از یکدیگر جدا شده بودند. رابطه دمای بهینه و حداکثر دمای رشد مجددا برای این واریته ها مورد بررسی قرار گرفت. در نتیجه دو واریته *fungicola* و *flavidum* بر این اساس از یکدیگر قابل تفکیک نبودند. این در حالیست که بر اساس توالی‌های منطقه ITS این دو واریته کاملا مجزا هستند (شکل ۲). واریته *aleophilum* با داشتن حداکثر دمای رشد بالاتر (۳۰ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با ۲۷ درجه در دو واریته دیگر) و نیز توالی متفاوت منطقه ITS قابل تمیز بود. بر این اساس دو واریته *flavidum* و *fungicola* بر اساس مورفولوژی و دمای رشد از یکدیگر قابل تفکیک نمی‌باشند (شکل ۳) و تنها راه تشخیص تعیین توالی منطقه ITS یا سایر قسمت‌های ژنوم می‌باشد. کریستال (شکل ۳) در کشت اغلب جدایه‌ها تولید می‌شود و ارزش تاکسونومیکی آن روشن نیست. اگرچه در برخی از قارچ‌های مشابه (از نظر مورفولوژیکی) مانند گونه‌های جنس *Lecanicillium* معمولا وجود دارد (Zare & Gams 2001) و در برخی دیگر از قارچ‌های مشابه مانند گونه‌های جنس *Pochonia* وجود ندارد (Zare *et al*. 2001). بر اساس مطالعه انجام شده و در مقایسه با نمونه‌های تیپ یا مورد تایید مصنف (authentic) مشخص شد که این دو واریته در ایران وجود دارند. با تکیه بر دانش موجود برای برآورد فراوانی هر یک از واریته‌ها می‌بایست تمامی جدایه‌های به دست آمده تعیین توالی می‌شدند. از آنجایی که این کار در این تحقیق میسر نشد، لذا نمی‌توان درصد تقریبی هر یک از واریته‌ها را در این تحقیق گزارش کرد. بنابر نتایج به دست آمده در این تحقیق یا باید معیارهای جدید و کاربردی تر برای تفکیک واریته‌های گونه *Verticillium fungicola* ارایه گردد و یا اینکه مفهوم واریته در این گونه مورد بازنگری قرار گیرد.

Archive of SID

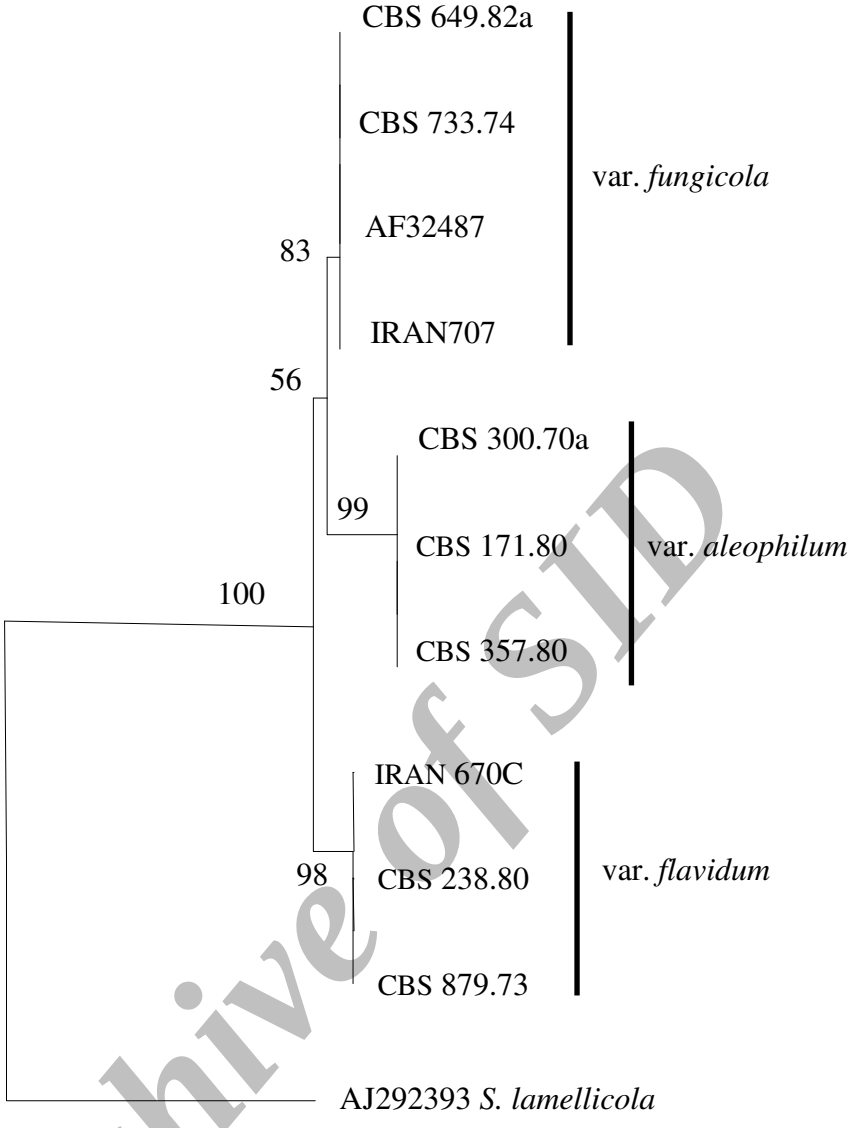
www.SID.ir



شکل ۱- علایم بیماری حباب خشک در *Agaricus bisporus* ناشی از قارچ *Verticillium fungicola*. a. لکه‌های قهوه‌ای روی کلاهک. b و c. بدشکلی و مومیایی شدن کلاهک و پایه.

Fig. 1. Symptoms of dry bubble disease of *Agaricus bisporus* caused by *Verticillium fungicola*. a. brown spots on the cap. b, c. deformation and mummification of fruit-bodies.

www.SID.ir

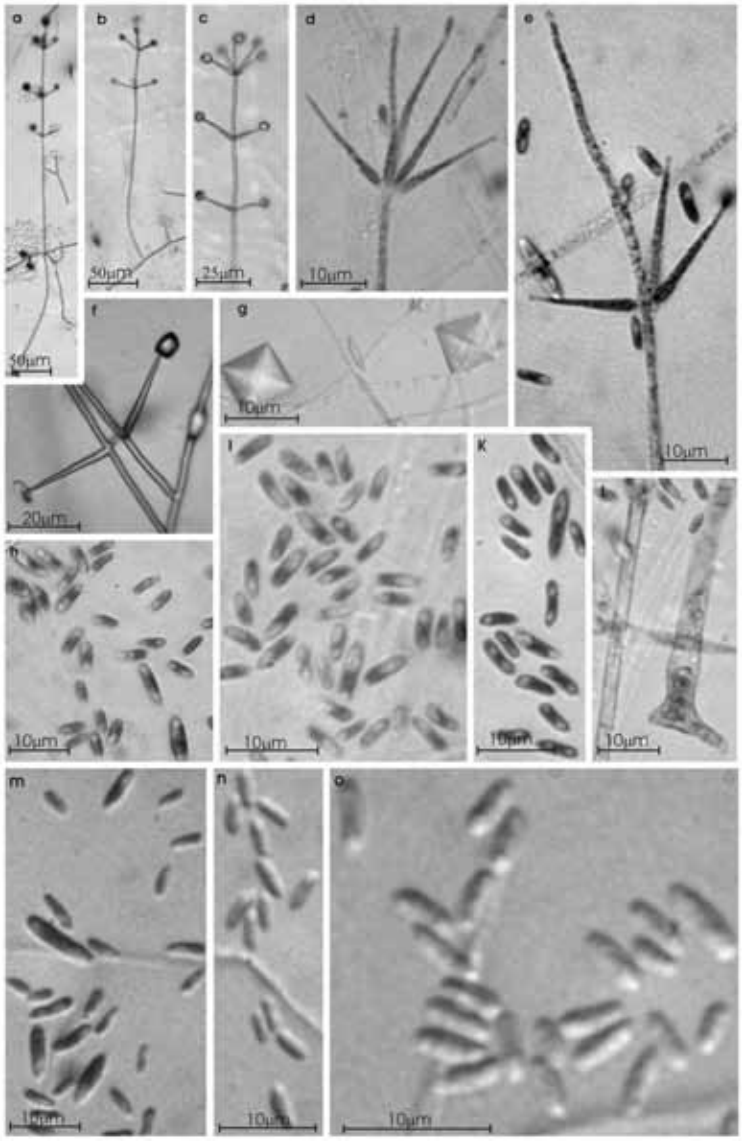


شکل ۲- درخت فیلوژنی واریته‌های گونه *Verticillium fungicola* (جدایه‌های ایرانی و غیر ایرانی نگهداری شده در CBS) به دست آمده از توالی‌های نواحی ITS و ژن 5.8S از DNA ریبوزومی با روش Neighbor-Joining با ۱۰۰۰ تکرار bootstrap. گونه *Simplicillium lamellicola* به عنوان outgroup استفاده شده است.

Fig. 2. Phylogenetic tree of 3 varieties of *Verticillium fungicola* based on ITS-5.8S sequences of ribosomal DNA using Neighbor-Joining method with 1000 bootstraps.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- واریته‌های *Verticillium fungicola*. a-f. کنیدیوفور و سرهای کنیدیومی. g. کریستال‌ها. l. پایه کنیدیوفور. h-k و m-o. کنیدیوم‌ها. var. *fungicola* (f، g و m). var. *flavidum* (a، b، e، k، n و o). var. *aleophilum* (c، d، h، i و l). استرین‌ها: a، e و k (CBS 300.70C)، b (CBS 238.80)، c، d، h و l (CBS 357.80)، f و g (CBS 992.69)، i (CBS 501.89)، m (IRAN 670C) و n و o (IRAN 707C).

Fig. 3. Varieties of *Verticillium fungicola*. a-f. Conidiophores and conidial heads. g. crystals. l. conidiophore stalk. h-k, m-o. conidia. var. *fungicola* (f, g, m). var. *flavidum* (a, b, e, k, n, o). var. *aleophilum* (c, d, h, i, l). Strains: a, e, k (CBS 300.70C), b (CBS 238.80), c, d, h, l (CBS 357.80), f, g (CBS 992.69), I (CBS 501.89), m (IRAN 670C), n, o (IRAN 707C).

www.SID.ir

سپاسگزاری

مولفین از آقای پروفسور والتر گمس (CBS) به خاطر فراهم کردن امکان انجام بخشی از مطالعات در مرکز قارچشناسی هلند (CBS) و تشخیص گونه *Acremonium crotocinigenum* قدردانی می‌کنند.

منابع

جهت ملاحظه منابع به صفحات 7-5 متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: دکتر رسول زارع، بخش تحقیقات رستنی‌ها و حسین خباز جلفایی، بخش بیماری‌های گیاهی، موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵.

Archive of SID

www.SID.ir

To look at the figures and table, please refer to the Persian text (pages: ۱۷-۲۹).

References

ASEF, M.R. and MOHAMMADI GOLTAPEH, E. 2002. Identification of fungicolous fungi of Iran I. *Cladobotryum* species. Rostaniha 3: 11–22 (English summary: 5-8).

BAKHTIARI, M.H., MOHAMMADI GOLTAPEH, E. and ROUHANI, H. 2004. Effect of temperature and pH on vegetable growth of dry bubble disease agent on *Agaricus bisporus* and effect of temperature regulating at farms and pasteurization of casing soil in disease control. p. 503. 16th Iranian Plant Protection Congress, 28 Aug.-1 Sept. 2004, Tabriz, Iran.

GAMS, W. 1971. *Cephalosporium*-artige Schimmelpilze (Hyphomycete). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

GAMS, W. and ZAAYEN, A. VAN 1982. Contribution to the taxonomy and pathogenicity of fungicolous *Verticillium* species. I. Taxonomy. Neth. J. Pl. Path. 88: 57-78.

NICHOLAS, K.B. and NICHOLAS, H.B. jr. 1997. GeneDoc: A tool for editing and annotating multiple sequence alignments. http://www.psc.edu/biomed/genedoc.

SAMUELS, G.J., DODD, S.L., GAMS, W., CASTELEBURY, L.A. and PETRINI, O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mold spidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. Mycologia 94(1): 146–170.

SMITH, F.E.V. 1924. Three diseases of cultivated mushrooms. Trans. Br. Mycol. Soc. 10: 81–96.

TRESCHOW, C. 1941. The *Verticillium* diseases of cultivated mushrooms. Dansk Botanisk Arkiv 11: 1–31.

VAHABI, K. 2005. Genetic diversity of *Trichoderma* spp. related to button mushroom (*Agaricus bisporus*) using molecular and morphological approaches. M.Sc. Thesis. Isfahan University of Technology. 143 pp.

VAN DE PEER, Y. and De WACHTER, R. 1994. Treecon for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. Comput. Appl. Biosci. 10: 569–570.

Archive of SID

www.SID.ir

WHITE, T.J., BRUNS, T., LEE, S. and TAYLOR, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes from phylogenetics. pp. 315–322. *In*: PCR Protocols (eds Innes, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.S. and White, T.J.). Academic Press: London, UK.

ZAFARI, D., ERSHAD, D., ZARE, R. and ALIZADEH, A. 2002. A contribution to the identification of *Trichoderma* species in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology 38(1-2): 21-45 (in Persian with English summary)

ZAFARI, D., ZARE, R., ERSHAD, D. and ALIZADEH, A. 2004. Three new species of *Trichoderma* for the mycoflora of Iran. Rostaniha 5(2): 159–169 (English summary: 63–65).

ZARE, R. and GAMS, W. 2001. A revision of *Verticillium* section *Prostrata*. IV. The genus *Lecanicillium* and the new genus *Simplicillium*. Nova Hedwigia 73: 1-50.

ZARE, R., GAMS, W. and EVANS, H.C. 2001. A revision of *Verticillium* sect. *Prostrata*. V. The genus *Pochonia*, with notes on *Rotiferophthora*. Nova Hedwigia 73: 51-86.

ZARE, R. and GAMS, W. 2006. White *Verticillium*-like anamorphs. in prep. for Studies in Mycology.

Addresses of the authors: Dr. R. ZARE and H. KHABBAZ-JOLFAEI, Departments of Botany and Plant Pathology, Plant Pests & Diseases Research Institute, P.O. Box 1454, Tehran 19395, Iran.

Archive of SID

www.SID.ir