شناسایی گونه‌های مهاجم جنس *Trichoderma* از بسترهای پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی*

Identification of aggressive species of *Trichoderma* from button mushroom farms (*Agaricus bisporus*) using morphological and molecular methods

دریافت: ۱۳۹۰/۲/۲۸/ پذیرش: ۱۳۹۰/۴/۸

Received: 18.05.2011 / Accepted: 29.06.2011

ژاله زرگرزاده: دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

ابراهیم محمدی گل‌تپه✉: استاد گروه بیماری‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
(E-mail: emgoltapeh@yahoo.com)

یونس رضایی دانش: استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه

مصطفی مهرپرور: دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

Zh. Zargarzadeh: M.Sc. Student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

E. Mohammadi Goltapeh✉: Prof., Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehren, Iran
(E-mail: emgoltapeh@yahoo.com)

Y.R. Danesh: Assistant Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran

M. Mehrparvar: M.Sc. Student, Department of Plant Pathology, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran

چکیده

گونه‌های مختلف جنس *Trichoderma* بویژه گونه *T. harzianum* و بیوتیپ‌های Th2 در اروپا و در آمریکا Th4 به عنوان عامل مولد ایجاد بیماری کپک سبز در بسترهای پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) محسوب می‌شوند. در این تحقیق، ۱۰۰جدایه از مراکز مختلف پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای در استان تهران و شهرستان ارومیه جمع‌آوری، جداسازی و خالص شدند. با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر، ۶۰ جدایه از گونه *T. harzianum*، ۲۷ جدایه از گونه *T. virens*، هفت جدایه از گونه *T. hamatum* و شش جدایه از گونه *T. inhamatum* شناسایی شدند. عامل اصلی آلودگی بسترهای پرورش قارچ خوراکی گونه *T. harzianum* تشخیص داده شد. برای تشخیص دقیق‌تر عامل بیماری، از آغازگرهای اختصاصی جهت شناسایی بیوتیپ‌های مربوط به گونه عامل بیماری استفاده شد. آغازگرهای اختصاصی برای شناسایی بیوتیپ‌های Th2 و Th4 قادر به تکثیر قطعه ۴۵۰ جفت بازی بودند. با استفاده از این آغازگر، از میان ۶۰ جدایه مربوط به گونه *T. harzianum*، تعداد ۳۰ جدایه از بیوتیپ‌های Th2 و Th4 موسوم به *T. aggressivum* f. *aggressivum* و *T. aggressivum* f. *europeaum* شناسایی شدند. همچنین برای تعیین دمای بهینه رشد گونه بیمارگر، سرعت رشد پرگنه ۶۰ جدایه در دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که دمای بهینه رشد برای جدایه‌های استان تهران ۳۰ درجه سلسیوس و برای جدایه‌های شهرستان ارومیه ۲±۲۲ درجه سلسیوس بود.

واژه‌های کلیدی: بیوتیپ‌های Th2 و Th4، پراکنش، درجه حرارت بهینه، شناسایی مولکولی

Abstract

Different species of *Trichoderma* especially *T. harzianum* (Th2 biotype in Europe and Th4 in America) considered as causal agent of green mould disease on button mushroom (*Agaricus bisporus*) casing beds. In this study, 100 fungal isolates were collected and purified from different mushroom growing units in Tehran province and Urmia (NW Iran). Totally, 60 isolates of *T. harzianum*, 27 isolates of *T. virens*, seven isolates of *T. hamatum* and six isolates of *T. inhamatum* were morphologically identified. The main infectious agent was *T. harzianum*. Specific primers were used for identification of different biotypes. Th2 and Th4 biotypes specific primers amplified 450bp fragment. Using these primers, 30 isolates of Th2 and Th4 biotypes called *T. aggressivum f. aggressivum* and *T. aggressivum f. europeaum* were identified from 60 isolates of *T. harzianum*. Colony growing rates of 60 fungal isolates were measured at 15, 20, 25, 30 and 35º C for determination of optimum growth temperature. These optimum temperatures for Tehran and Urmia isolates were 30º C and 22±2º C, respectively.

Keywords: Distribution, molecular identification, optimum temperature, Th2 and Th4 biotypes

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی دکتر محمدی گل تپه ارایه شده به دانشگاه تربیت مدرس

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

قارچ خوراکی با وجود استفاده از بقایای مواد زاید گیاهی و صنعتی از منابع غنی از پروتئین، کلسیم، فسفر، ویتامین و انواع اسیدهای آمینه ضروری بوده و امروزه پرورش قارچ خوراکی از اهمیت خاصی برخوردار است. قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید رنگ *Agaricus bisporus* (Lange) Singer در مراحل مختلف رشدی خود در معرض بسیاری از عوامل بیماری‌زا و آفات می‌باشد (Rezaei Danesh *et al.* 2001). از مهمترین عوامل محدود کننده تولید و پرورش تجاری قارچ خوراکی را می‌توان بیماری کپک سبز ناشی از گونه‌های تریکودرما نام برد (Chen *et al.* 1999). اگر چه گونه *T. harzianum* گونه اصلی کلنیزه کننده کمپوست قارچ خوراکی می‌باشد، ولی گونه‌های دیگر نظیر *T. viride, T. longibrachiatum, T. hamatum* و *T. pseudokoningii* نیز از بستر قارچ خوراکی معرفی شده‌اند (Muthumeenakshi *et al.* 1994). جدی‌ترین اپیدمی این بیماری در بستر قارچ‌های خوراکی دکمه‌ای در ایرلند و طی سالهای ۸۶-۱۹۸۵ اتفاق افتاد و منجر به بروز خسارتی بالغ بر ۴-۳ میلیون دلار شد (Fletcher 1990). پس از آن این بیماری در انگلستان، اسکاتلند، نیوزیلند و فرانسه نیز باعث ایجاد خساراتی شدید گردید (Hatvani *et al.* 2006). با مطالعات صورت گرفته مشخص شد که بیوتیپ‌های گونه *T. harzianum* خصوصا دو بیوتیپ Th2 و Th4 عامل اصلی این آلودگی‌ها بوده و بیشترین مقدار خسارت را ایجاد می‌کنند (Hatvani *et al.* 2006). پیشرفت در مطالعات مولکولی سبب گردید که گونه *T. hazianum* بعدها به گونه *T. aggressivum* با دو فرم اختصاصی به نام‌های *T. aggressivum* f. *europeaum* از اروپا و *T. aggressivum* f. *aggressivum* از آمریکا تغییر نام دهد (Chio *et al.* 2003, Hatvani *et al.* 2006, Magdalina *et al.* 2008). گونه *T. harzianum* با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (Rifai 1969, Domsch *et al.* 1980, Bissett 1984, 1991, 1992) و نیز خصوصیات میکروسکوپی قابل شناسایی می‌باشد. با این حال، برخی از ویژگی‌های میکروسکوپی بین گونه‌های مختلف هم‌پوشانی داشته و شناسایی گونه را سخت و غیرقطعی می‌کند. با وجود خسارت نسبتا قابل توجه این قارچ تاکنون شناسایی مولکولی دقیقی برای گونه *T. harzianum* و بیوتیپ‌های آن در ایران صورت نگرفته است و هدف از این مطالعه بررسی ویژگی‌های میکروسکوپی و ریخت‌شناسی در دماهای مختلف و نیز امکان تشخیص مولکولی برخی گونه‌های مهاجم قارچ خوراکی دکمه‌ای در استان تهران و شهرستان ارومیه می‌باشد.

روش بررسی

- نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری

نمونه‌برداری از واحدهای پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای در استان تهران و شهرستان ارومیه در سال ۱۳۸۸ به عمل آمد. نمونه‌ها از کمپوست پاستوریزه شده و پاستوریزه نشده، بسترهای کشت قارچ و نیز خاک پوششی جمع‌آوری و با ثبت مشخصات کامل به آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. در این مطالعه، از واحدهای تولیدی مختلف در مجموع ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری گردید. برای جداسازی قارچ‌ها از محیط کشت اختصاصی داوه (Davet 1979) استفاده گردید. پس از خالص‌سازی جدایه‌ها به روش نوک ریسه و کشت جدایه‌های خالص روی محیط کشت عصاره مالت آگار (MEA) دو درصد، اقدام به شناسایی مورفولوژیکی گونه‌های تریکودرما با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر (Rifai 1969, Domsch *et al.* 1980, Bissett 1984, 1991, 1992) و براساس ویژگی‌هایی چون نحوه هاگزایی، ویژگی‌های ظاهری نظیر رنگ و تیپ رشد پرگنه، آرایش فیالوسپورها روی فیالیدها، نحوه انشعاب کنیدی‌برها، خصوصیات فیالیدها؛ فیالوسپورها و نیز کلامیدوسپورها گردید.

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

در این آزمایش، از حاشیه کشت‌های سه روزه جدایه‌های گونه *T. harzianum*، قرص‌هایی به قطر پنج میلی‌متر برداشته و در مرکز تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. تشتک‌های پتری پس از مایه‌زنی در دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس نگهداری شده و میزان رشد پرگنه قارچی و نیز مدت زمان رشد کامل درون تشتک‌های پتری هر ۲۴ ساعت یک بار مورد بررسی قرار گرفت.

- تهیه توده میسلیومی برای مطالعات مولکولی

به منظور تهیه توده میسلیوم مورد نیاز جهت استخراج DNA ژنومی از روش رومین و همکاران (Romain *et al.* 1999) استفاده گردید. ابتدا محیط غذایی عصاره سیب زمینی و دکستروز (حاوی ۱۵ گرم دکستروز در یک لیتر محیط) تهیه و ۴۰ میلی‌لیتر از این در ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و ضدعفونی گردید. پس از استریل نمودن محیط غذایی، هر یک از ارلن‌ها توسط سه قرص به قطر پنج میلی‌متر، از حاشیه پرگنه در حال رشد قارچ مایه‌زنی شدند. ارلن‌های مایه‌زنی شده بر حسب سرعت رشد جدایه‌ها، به مدت ۴-۲ روز روی شیکر با سرعت ۱۵۰-۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. پس از رشد توده

Archive of SID

www.SID.ir

قارچی، میسلیوم‌ها توسط پمپ خلاء و شستشو با آب مقطر استریل جداسازی و پس از خشک شدن در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

- استخراج DNA ژنومی از توده میسلیومی قارچ

برای استخراج DNA ژنومی از میسلیوم جدایه‌های قارچی نیم گرم از توده میسلیومی قارچ با استفاده از نیتروژن مایع پودر گردید و DNA ژنومی با استفاده از روش CTAB (Doyle & Doyle 1990) با اندکی تغییرات انجام گرفت.

- آغازگرهای مورد استفاده

در این مطالعه، از دو آغازگر ویژه بیوتیپ‌های Th2 و Th4 برای گونه *T. harzianum* به نام‌های Th-F و Th-R استفاده گردید. این دو آغازگر از ناحیه ITS1 و ITS2 در DNA ریبوزومی طراحی شده است (Chen *et al*. 1999). توالی نوکلئوتیدی آغازگرهای مورد استفاده در این تحقیق به شرح زیر می‌باشد:

Th-F (5′- CGG TGA CAT CTG AAA AGT CGT G-3′)
Th-R (5′- TGT CAC CCG TTC GGA TCA TCC G-3′).

– شرایط انجام PCR اختصاصی

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز بهینه شده در این تحقیق در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۱ میلی مولار از هر کدام از آغازگرها به غلظت نهایی ۱۰ پیکومول، ۲ میلی‌مولار کلرید منیزیم ($MgCl_2$)، ۲ میلی‌مولار بافر واکنش ۱۰x، ۰/۱ میلی‌مولار دی‌اکسی نوکلئوتید تری‌فسفات (dNTPs)، دو میکرولیتر از DNA ژنومی و ۰/۲ واحد آنزیم پلی‌مراز (*Taq* DNA polymerase) (سیناژن، تهران) انجام شد. واکنش مزبور در دستگاه ترموسایکلر اپندروف (Eppendorf, Germany) انجام شد. واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۲ درجه سلسیوس به مدت دو دقیقه صورت گرفت. سپس ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی DNA ژنومی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ ثانیه؛ اتصال آغازگرها به رشته الگو در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه؛ گسترش رشته جدید در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه انجام و در پایان مرحله گسترش نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه انجام شد. محصول PCR روی ژل آگاروز ۱٪ الکتروفورز گردید.

نتیجه و بحث

- جداسازی و شناسایی مورفولوژیک گونه‌ها

از نمونه‌برداری‌های به عمل آمده از کمپوست، بسترهای کشت قارچ و نیز خاک پوششی در استان تهران و شهرستان ارومیه در مجموع ۱۰۰ جدایه قارچی به دست آمد که ۶۰ جدایه مربوط به گونه *T. harzianum*، ۲۷ جدایه مربوط به گونه *T. virens*، هفت جدایه مربوط به گونه *T. hamatum* و شش جدایه مربوط به گونه *T. inhamatum* تشخیص داده شدند.

با بررسی پراکنش و فراوانی نسبی گونه‌های تریکودرمای شناسایی شده، مشخص شد که گونه‌های مزبور در کمپوست پاستوریزه شده و بسترهای قارچ دکمه‌ای قابل مشاهده می‌باشند. نتایج بررسی پراکنش گونه‌ای در جدول ۱ نشان داده شده است.

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

نتایج به دست آمده از بررسی سرعت رشد در دماهای ۳۵، ۳۰، ۲۵، ۲۰ و ۱۵ درجه سلسیوس، مشخص کرد که دما تاثیر قابل توجهی بر الگوی رشدی گونه *T. harzianum* دارد. بهینه دمایی رشد جدایه‌های استان تهران، ۳۰ درجه سلسیوس و جدایه‌های شهرستان ارومیه، ۲±۲۲ درجه سلسیوس بود. همچنین مشخص شد نمونه های جدا شده از استان تهران در دمای ۱۵ درجه سلسیوس و نمونه‌های شهرستان ارومیه در دمای ۳۵ درجه سلسیوس دارای کمترین میزان رشد می‌باشند. همچنین می‌توان گفت دماهای مختلف تاثیر متفاوتی در سرعت رشد یک گونه داشته و جدایه‌های یک گونه که مربوط به مناطق مختلف می‌باشند در دماهای مختلف الگوی رشدی متفاوتی دارند (شکل ۱).

- شناسایی گونه‌های قارچی به روش مولکولی

نتایج حاصل از تکثیر DNA با آغازگرهای اختصاصی Th-F و Th-R نشان داد که از بین ۶۰ جدایه شناسایی شده به روش مورفولوژیک به عنوان گونه *T. harzianum*، تعداد ۳۰ جدایه متعلق به بیوتیپ‌های Th2 و Th4 گونه مزبور می‌باشند. همچنین ۵۰٪ جدایه‌های استان تهران مربوط به بیوتیپ Th2 و Th4 می‌باشند (شکل ۲).

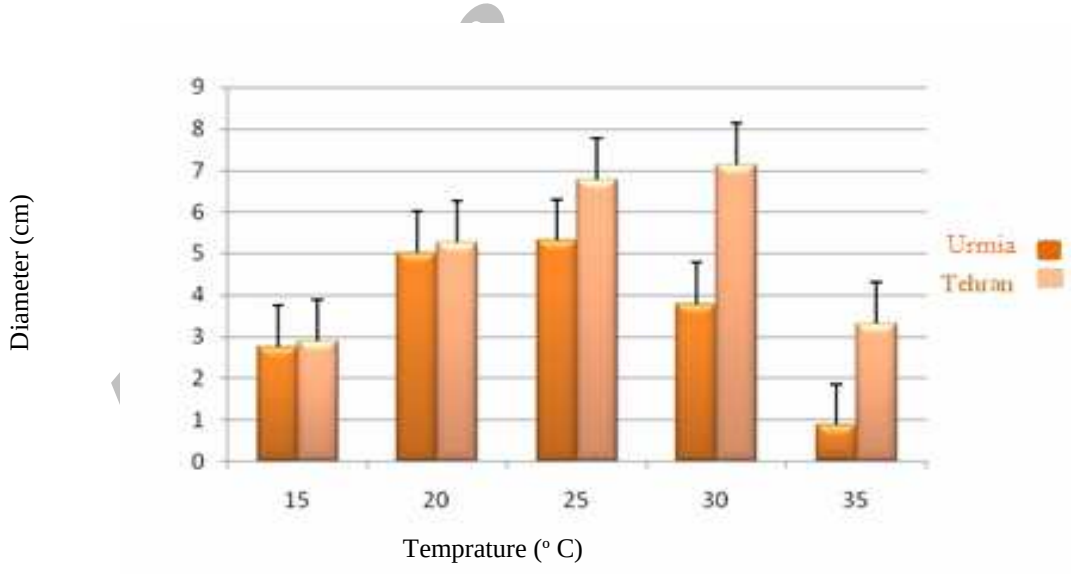
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- پراکنش و فراوانی نسبی گونه‌های جداسازی شده جنس تریکودرما از مراکز پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای در استان تهران و شهرستان ارومیه

Table 1. Distribution and relative abundance of different *Trichoderma* species isolated from button mushroom farms in Tehran province and Urmia city

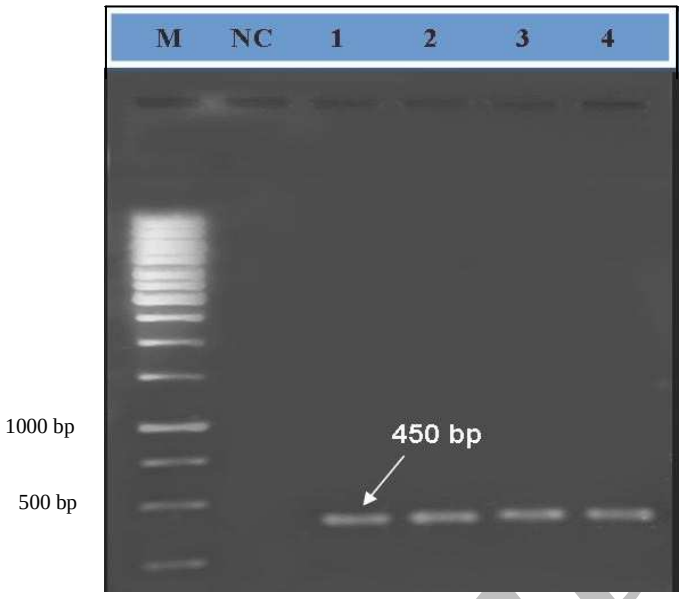
واحد پرورشی (Mushroom farm)	تعداد جدایه قارچی (Fungal isolates No.)	گونه قارچی شناسایی شده (Fungal species identified)
پدم (کرج) Padam (Karaj)	30	*T. harzianum*
رویان (هشتگرد) Royan (Hashtgerd)	11	*T. harzianum*
فرشاد (شهریار) Farshad (Shahriar)	6	*T. harzianum*
گلبرگ (شهریار) Golbarg (Shahriar)	4	*T. harzianum*
ارومیه Urmia	9	*T. harzianum*
پدم (کرج) Padam (Karaj)	27	*T. virens*
پدم (کرج) Padam (Karaj)	7	*T. hamatum*
پدم (کرج) Padam (Karaj)	6	*T. inhamatum*



شکل ۱- بهینه سرعت رشد جدایه‌های قارچی استان تهران در دمای ۳۰ درجه سلسیوس و شهرستان ارومیه در دمای ۲±۲۲ درجه سلسیوس.

Fig. 1. Optimal growth temperature of obtained isolates in Tehran (30° C) province and in Urmia city (22±2° C).

www.SID.ir



شکل ۲- تشخیص باند اختصاصی جدایه‌های گونه *T. harzianum* با کاربرد آغازگرهای Th-R و Th-F، M: نشانگر اندازه ۱kb، NC: کنترل منفی.

Fig. 2. PCR amplification of genomic DNA *T. harzianum* using Th-F and Th-R. M.: 1kb DNA ladder, NC: negative control.

حمله گونه‌های تریکودرما به قارچ خوراکی به صورت کلنیزاسیون سریع کمپوست اسپان‌زده شده می‌باشد. زیستگاه عمده این قارچ در کمپوست و خاک پوششی بوده و در برخی موارد روی اسپان و بذر هم دیده می‌شود. قارچ تریکودرما در ابتدا تولید میسلیوم سفید رنگی را می‌نماید که در ابتدا به دلیل تشابه رنگ با میسلیوم قارچ خوراکی شاید چندان قابل تشخیص نمی‌باشد. این بخش‌های سفید رنگ به تدریج هم زمان با شروع هاگ‌زایی در قارچ به رنگ سبز در می‌آیند. این لکه‌های سبز رنگ حاصل از هاگ‌زایی عامل از بارزترین علایم بیماری می‌باشد که روی کمپوست، خاک پوششی، قفسه‌ها و غیره دیده می‌شود (Chio *et al.* 2003, Mohammadi Goltapeh & Rezaei Danesh 2006). طی بازدیدهایی که به منظور جداسازی گونه‌های قارچ تریکودرما و بررسی آلودگی واحدهای پرورش قارچ توسط کپک سبز تریکودرمایی در مناطق مختلف استان تهران و شهرستان ارومیه از بخش‌های مختلف مانند کمپوست پاستوریزه شده و بسترهای کشت قارچ و خاک پوششی به عمل آمد، ۱۰۰ جدایه قارچی جداسازی و خالص‌سازی گردید. در اغلب موارد، بیماری کپک سبز تریکودرمایی روی بسترهای کشت به وضوح مشاهده شد. حتی در نمونه‌هایی که علایم بیماری مشاهده نشده بود نیز پس از جداسازی و خالص‌سازی از تمامی نمونه‌ها قارچ تریکودرما جدا گردید که این با نتایج تحقیقات هاتوانی و همکاران (Hatvani *et al.* 2006)، چن و همکاران (Chen *et al.* 1999)، چویی و همکاران (Choi *et al.* 2003)، اوه و همکاران (Oh *et al.* 2003)، محمدی گل‌تپه و رضایی دانش (۲۰۰۶) مطابقت داشت. براساس شناسایی‌های مورفولوژیکی جدایه‌های قارچ عامل بیماری، از بین ۱۰۰ جدایه مورد بررسی، چهار گونه مورد شناسایی قرار گرفت. همچنین مشخص شد که ۶۰ جدایه مربوط به گونه *T. harzianum*، ۲۷ جدایه مربوط به گونه *T. virens*، هفت جدایه مربوط به گونه *T. hamatum* و شش جدایه مربوط به گونه *T. inhamatum* می‌باشد. با بررسی‌های مولکولی نیز مشخص شد که از میان ۶۰ جدایه مربوط به گونه *T. harzianum*، ۳۰ جدایه مربوط به *T. aggressivum* بود. چن و همکاران (۱۹۹۹) با بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی وجود گونه‌های *T. viride*, *T. koningii* و *T. harzianum* را در بستر قارچ خوراکی نشان دادند. رضایی دانش و همکاران (۲۰۰۱) نیز با بررسی‌های مورفولوژیکی وجود گونه‌های *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. virens* و *Trichoderma* sp. را تایید نمودند. هاتوانی و همکاران (۲۰۰۶) با تکیه بر روش‌های مولکولی وجود ۱۷ جدایه مربوط به گونه *T. aggressivum* f. *europeaum*، چهار جدایه مربوط به گونه *T. harzianum*، چهار جدایه مربوط به گونه *T. longibrachiatum*، چهار جدایه مربوط به گونه *T. asperellum*، یک جدایه مربوط به گونه *T. ghanense*، نه جدایه مربوط به گونه *T. atroviride* و ۲۸ جدایه مربوط به گونه *Trichoderma* sp. را در بستر قارچ خوراکی گزارش نمودند. با توجه به این که بازدیدها از مناطق مختلف یک شهر و به طور اتفاقی انجام گرفته، مشخص شد که بیماری در همه مناطق به طور یکسان پراکندگی نداشته و برخی

Archive of SID

www.SID.ir

از واحدها عاری از بیماری بودند ولی در اکثر واحدهای پرورش عامل بیماری در بسترهای کشت قارچ دیده شد. با بررسی جدایه‌های قارچ عامل بیماری مشخص گردید که پراکنش بیماری در استان تهران و شهرستان کرج نسبت به شهرستان ارومیه بیشتر می‌باشد که این به دلیل تمرکز واحدهای پرورشی در یک منطقه محدود و نزدیک بودن آن‌ها به یکدیگر و انتشار عامل بیمارگر به دلیل عدم رعایت مسایل بهداشتی است (رضایی دانش و همکاران ۱۳۸۰). مسلم است که صرفا از جداسازی این تعداد جدایه قارچی نتایج دقیق و حقیقی دال بر پراکنش دقیق بیماری حاصل نمی‌شود چرا که به دلیل محدود بودن فرصت و امکانات، برخی از مناطق، مورد بررسی و بازدید واقع شده است. بنابراین، نتایجی که از جداسازی قارچها طی این مدت به دست آمد، فقط می‌تواند تا حدودی الگوی پراکنش بیماری را مشخص نماید. با توضیحاتی که قبلا اشاره شد، نمی‌توان به طور دقیق از نتایج به دست آمده پراکندگی گونه‌ها را بررسی کرد، ولی به طور تقریبی می‌توان گفت که گونه *T. harzianum* شایع‌ترین گونه با پراکندگی بیشتر در کلیه مناطق مورد بازدید و مطالعه بود. این نتایج با مطالعات محققان دیگر چون پارک و همکاران (Park *et al.* 2003)، هاتوانی و همکاران (۲۰۰۶)، چن و همکاران (۱۹۹۹)، موتومناکشی و همکاران (Muthumeenakshi *et al.* 1994)، میازاکی و همکاران (Miyazaki *et al.* 2008)، روبیو و همکاران (Rubio *et al.* 2005)، ماگدالینا و همکاران (Magdalina *et al.* 2008) مطابقت دارد. لیکن این نتیجه با نظریه رضایی دانش و همکاران (۱۹۹۹) مبنی بر این که گونه *T. virens* نسبت به سایر گونه‌ها در مقابل سمومی چون کاربندازیم و بنومیل مورد استفاده در محیط‌های پرورشی از مقاومت نسبتا بالایی برخوردار بوده و گونه غالب در مراکز پرورش می‌باشد، مطابقت ندارد. از آنجایی که تفکیک گونه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی صورت می‌گیرد که بیشتر با تکیه بر اندازه‌گیری فیالیدها و هاگ‌ها می‌باشد و با توجه به این که اندازه این ضمایم در بعضی گونه‌ها همپوشانی دارند، تفکیک جدایه‌های قارچ تریکودرما زمان‌بر و غیرقابل اعتماد می‌باشد و تغییر در نوع محیط کشت منجر به شناسایی غیرقطعی جدایه‌های این قارچ می‌شود. از طرفی، با توجه به این که تفکیک بیوتیپ جدایه‌های گونه *T. harzianum* با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی امکان‌پذیر نیست و محیط کشت اختصاصی برای جداسازی دقیق بیوتیپ‌های آن وجود ندارد و از آنجایی که جدایه‌های این گونه و خصوصا بیوتیپ‌های Th2 و Th4 موسوم به *T. aggressivum* f. *europeaum* و *T. aggressivum* f. *aggressivum* به عنوان عامل خسارت در ۹۰٪ از اپیدمی‌های ایجاد شده از سال ۱۹۹۶-۱۹۹۴ می‌باشند (Chen *et al.* 1999)، استفاده از روش‌های مولکولی و آغازگرهای اختصاصی به عنوان یک روش دقیق، سریع و حساس برای جداسازی بیوتیپ‌ها ضروری به نظر می‌رسد. استفاده از روش‌های دقیق مولکولی بر خلاف دیگر روش‌ها، توانایی شناسایی بیوتیپ‌های Th2 و Th4 را در میان ترکیبی از قارچ‌های دیگر میسر ساخته است (Chen *et al.* 1999). براساس آزمایش‌هایی که با استفاده از آغازگرهای اختصاصی صورت گرفت مشخص شد که ۸۰٪ از نمونه‌های جدا شده با استفاده از کلیدهای شناسایی مربوط به گونه *T. harzianum* و از این مقدار ۵۰٪ آن مربوط به بیوتیپ‌های Th2 و Th4 می‌باشد که این نتایج با نظریه محققانی چون پارک و همکاران (۲۰۰۳)، هاتوانی و همکاران (۲۰۰۶)، چن و همکاران (۱۹۹۹)، موتومناکشی و همکاران (۱۹۹۴)، میازاکی و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد. همچنین براساس آزمایش‌ها مشخص شد که دمای بهینه رشد گونه *T. harzianum* جدا شده از استان تهران ۳۰ درجه سلسیوس و جدایه‌های شهرستان ارومیه ۲±۲۲ درجه سلسیوس می‌باشد. براساس نتایج تحقیقات چویی و همکاران (۲۰۰۳)، پارک و همکاران (۲۰۰۵) و نیز رضایی دانش و همکاران (۲۰۰۱)، دمای ۲۵ درجه سلسیوس بهینه دمای رشد گونه *T. harzianum* می‌باشد. همچنین دمای توقف رشد جدایه‌های استان تهران ۱۵ درجه سلسیوس و جدایه‌های شهرستان ارومیه ۳۵ درجه سلسیوس بود که با توجه به بررسی‌های محققانی از جمله چویی و همکاران (۲۰۰۳)، پارک و همکاران (۲۰۰۵) و نیز رضایی دانش و همکاران (۲۰۰۱)، دمای توقف رشد گونه مزبور دمای ۳۵ تا ۳۷ درجه سلسیوس است. می‌توان گفت که درجه حرارت محیط در غالب شدن و گسترش بیوتیپ‌های مهاجم Th2 و Th4 در مراکز پرورش تاثیر دارد و نیز می‌توان ادعا کرد آب و هوای استان تهران برای جدایه‌های بیوتیپ Th2 و Th4 مساعدتر است. با توجه به تولید مایکوتوکسین‌هایی از جمله Trichotoxin و Viridian و غیره که برای بشر مضر می‌باشند (Choi *et al.* 2003)، نتایج این تحقیق گامی برای مطالعات ژنتیکی عمیق‌تر گونه‌های تریکودرمای عامل بیماری در بسترهای پرورش قارچ خوراکی می‌باشد و می‌تواند راهگشایی برای دستیابی به روش‌های پیشگیری و کنترل عامل بیماری باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

References

Bissett, J. 1984. A rvision of the genus *Trichoderma*. I. Section *longibrachiatum* sect. nov. Canadian Journal of Botany 62: 924–931.

Bissett, J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. infrageneric classification. III. section *Pachybasium* IV. additional notes, on section *longibrachiatum*. Canadian Journal of Botany 62: 2357–2420.

Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Canadian Journal of Botany 70: 639–641.

Chen, X., Romain, C.P., Schlagnhaufar, B., Tan. Q., Ospina-Giraldo, M.D., Royse, D.J. & Huffs, R. 1999. PCR-based genotyping of epidemic and preepidemic *Trichoderma* isolates associated with green mold of *Agaricus bispours*. Applied Microbiology and Biotechnology 52: 2674–2678.

Choi, Y., Joung, G.T. & Ryu, J. 2003. Physiological characteristics of green mold (*Trichoderma* spp.) isolated from Oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). Mycobiology 31(3): 139–144.

Danesh, Y.R. 1999. Identification of *Trichoderma* species causing green mold in buttom mushroom beds and evaluation of some fungicides in its control. M.Sc. Thesis submitted to Tarbiat Modarres University, Tehran, Iran.

Danesh, Y.R. & Mohammadi Goltapeh, E. 2001. Identification of *Trichoderma* species causing green mold in buttom mushroom farms, distribution and their relative abundance. Iranian Journal of Plant Pathology 69: 87– 83.

Davet, P. 1979. Technique pour l'analyse des populations de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. Annales de Phytopathologie 11: 524–533.

Domsch, K.H., Gams, W. & Anderson, T.H. 1980. Compendium of Soil Fungi pp. 406.

Doyle, J.J. & Doyle, J.L. 1990. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. Focus 12: 13–15.

Doyle, O. 1991. *Trichoderma* green mould-update. Irish Mushrooms Review 3: 13–17.

Fletcher, J.T. 1990. *Trichoderma* and *Penicillium* diseases of *Agaricus bisporus*. A. Literature Review For The Horticultural Development Council. London, ADAS pp. 220.

Hatvani, L., Antal, Z., Manczinger, L., Szekeres, I.S. & Druzhinina, C.P. 2006. Green mold disease of *Agaricus* and *Pleurotus* sp. are caused by related but phylogenetically different *Trichoderma* species. Phytopathology 532–537.

Muthumeenakshi, S. 1994 Intraspecific molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in British Isles. Microbiology pp. 769–777.

Mohammadi Goltapeh, E. & Danesh, Y.R. 2006. Pathogenic interactions between *Trichoderma* and *Agaricus bisporus*. International Journal of Agricultural Technology 2(1): 29–37.

Oh, S.J., Kong, W.S. & Kim, H.K. 2000. Studies on the effect of vinyl covering on *pleurotus* sp. cultivation-improved picking efficiency off *P. ostreatus* and *P. sajor-caju*. in science and cultivation of edible fungi. Mushroom Science 5(2): 949–953.

Park, D.S., Kang, H.W., Park, Y.J., Lee, M.H., Lee, B.M., Hahn, J.H. & Go, S.J. 2004. DNA profiles of *Trichoderma* spp. in Korea. Mycobiology 32(1): 24–34.

Rifiai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116: 1–56.

Robio, M.B. 2005. Specific assay for the detection and quantification of DNA from the biocontrol strain *Trichodrma harzianum* 2413 in soil. Microbial Ecology 49: 25–33.

Szczech, M, Staniaszek, M., Habdas, H., Ulinski, Z. & Szymanski, J. 2008. *Trichoderma* sp. the cause of green mold on Polish Mushroom Farms. Vegetable Crops Research Bulletin 69: 105–114.

Myazaki, K., Tsuchia, Y. & Okuda, T. 2009. Specific PCR assays for the detection of *Trichoderma harzianum* causing green mold disease during mushroom cultivation. Mycoscience 50: 94–99.

Archive of SID

www.SID.ir