

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

پذیرش: 1384/6/26

دریافت: 1384/3/3

چکیده

طی سالهای 83-1382 واحدهای عمده پرورش قارچ خوراکی در استان تهران مورد بازرسی و نمونه برداری قرار گرفت و تعداد 103 جدایه قارچ به دست آمد. از میان گونه‌های به دست آمده *Verticillium fungicola* (با 50 جدایه)، *Trichoderma harzianum* (با 24 جدایه)، *Cladobotryum dendroides* (با 16 جدایه) و *Acremonium crotoconigenum* (با 11 جدایه) بالاترین فراوانی را داشتند. گونه *A. crotoconigenum* 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 وارسته *fungicola* و *flavidum* در ایران وجود دارند. این دو وارسته با معیارهای مورفولوژیکی از یکدیگر قابل تشخیص نمی‌باشند.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های قارچی، *Agaricus bisporus*، *Verticillium fungicola*،

Cladobotryum، *Acremonium*، *Trichoderma*

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*، *Smith 1924*, *Treschow 1941*, *Zare*) *Lecanicillium psalliotae* *Mycogone perniciosa* (*Gams 2001*)، *Trichoderma harzianum* و گونه‌های *Cladobotryum* (آصف و محمدی گل‌تپه 1381) اشاره کرد. در گونه *V. fungicola* سه واریته *flavidum fungicola* 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 (2004) 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 37 درجه سانتی‌گراد تعیین نمودند، این در حالیست که حتی گرمادوست‌ترین واریته این گونه (*aleophilum*) نیز در دمای 33 درجه قادر به رشد نمی‌باشد (*Gams & van Zaayen 1982*). 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

پایه برداشت شده و در ظروف یک بار مصرف قرار داده شدند. پس از یادداشت مشخصات لازم از جمله وضعیت علائم 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 70 درصد و گذراندن از روی شعله با اسکالپل سترون بریده و در سطح محیط کشت عصاره مالت - آگار (MEA) حاوی 50 قسمت در میلیون از هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استریتومایسین 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 100 بسته کمپوست سه کیلوگرمی تحت شرایط دمایی 25 درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی 85 درصد نگهداری شدند. پس از گذشت 15 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 70 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 ساعت) داده شد. پس از گذشت سه روز از خاک‌دهی، روی خاک هر بسته، مقدار 10 میلی لیتر سوسپانسیون جدایه مورد نظر که حاوی حدود 10^6 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 (BioMICS, BioAware)

Dr. Vincent Robert (S.A., 2003, Version 1.0.2) ارایه شده توسط انجام شد. در مورد کنیدیومها حداقل از 30 عدد و در مورد فیالیدها حداقل از 20 عدد اندازه گیری شد.

مطالعات مولکولی

استخراج DNA: از محیط کشت مایع CM (complete medium) با ترکیب 20 گرم دکستروز، 2 گرم پیتون، 2 گرم عصاره مخمر، 0/5 گرم سولفات منیزیوم $7H_2O$ ، 0/45 گرم KH_2PO_4 و 1 گرم K_2HPO_4 جهت تولید میسلیوم استفاده شد. جهت استخراج DNA از کیت سریع استخراج FastDNA®Kit (Cat. No. 6540-400, OmniLab 6050073, BIO101, Carlsbad CA) استفاده شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): یک میکرولیتر از هر نمونه DNA (حاوی 50-100 نانوگرم DNA در میکرولیتر) برای انجام PCR استفاده شد. برای تکثیر منطقه ITS (شامل ITS1-5.8S-ITS2) از آغازگرهای ITS1 با توالی '5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' و ITS4 با توالی '5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White *et al.* 1990) و برنامه دمایی 94 درجه (60 ثانیه) به عنوان چرخه ابتدایی (واسرشت سازی) و سپس 35 چرخه شامل 94 درجه (40 ثانیه) 55 درجه (50 ثانیه) و 72 درجه (120 ثانیه) و در نهایت به مدت 7 دقیقه در دمای 72 درجه استفاده شد. برای تکثیر از دستگاه PCR (BioRad, GeneAmp, PCR System 9700) استفاده شد. مخلوط واکنش برای هر نمونه 50 میکرولیتر حجم داشت و شامل 25 پیکومول از هر آغازگر، 200 میکرومول از هر dNTP (Amersham, Bioscience, Uppsala, Sweden) بافر X1 شامل 3 میلی‌مول $MgCl_2$ ، 1/5 واحد آنزیم پلیمرز *Taq* (SuperTaq, HT Biotechnology, UK) polymerase، بود که حجم آن با استفاده از آب دو بار تقطیر به 50 میکرولیتر رسید.

تعیین توالی: DNA تکثیر شده توسط کیت خالص سازی DNA PCR (GFX Purification Kit (Amersham Pharmacia, 27-9602-01, USA) طبق توصیه شرکت سازنده تمیز شد. با استفاده از آغازگرها و DNA تکثیر شده فوق PCR دیگری برای تعیین توالی انجام شد. حجم هر مخلوط واکنش در این PCR برابر 10 میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از DNA (حاوی 0/1 تا 0/2 پیکومول)، یک میکرولیتر آغازگر (حاوی 4 پیکومول)، یک میکرولیتر sequencing reagent premix (HPLC grade) بود. برنامه PCR در این مرحله شامل 25 چرخه 95 درجه (20 ثانیه) 50 درجه (15 ثانیه) و 60 درجه (60 ثانیه) بود. محصول این PCR با استفاده از سفادکس

(Amersham Pharmacia, (17-0041-01 G-50) خالص سازی و توسط دستگاه توالی‌یاب 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 (DNASTAR Inc., Madison, Wisconsin, 1984) DNA*Lasergene 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 1000 تکرار Bootstrap با روش Neighbor-Joining و گزینه Jukes & Cantor ساخته شد.

نتیجه و بحث

در مجموع تعداد 103 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 1 ارایه شده است. قارچ‌های به دست آمده شامل *Trichoderma harzianum*, *T. atroviride*, *T. virens*, *Verticillium fungicola* شامل دو وارسته *flavidum* و *fungicola*، *Acremonium crotocinigenum* و *Cladobotryum dendroides* بودند. گونه *A. crotocinigenum* و دو وارسته *V. fungicola* برای اولین بار از ایران گزارش می‌شوند. گونه‌های تریکودرما قبلاً توسط ظفری و همکاران (2004, 2002) گزارش شده‌اند. گونه *Cladobotryum dendroides* نیز قبلاً توسط آصف و محمدی گل تپه (2002) گزارش و توصیف شده است. بر اساس مطالعات سامونلز 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 سامونلز و همکاران (2002) در *T. aggressivum* قرار می‌گیرند اما بر اساس مطالعات مولکولی (AFLP) انجام شده توسط وهابی (1383)، این جدایه‌ها با هر دو گونه *T. harzianum* و *T. aggressivum* اختلاف دارند. با توجه به اینکه معیار حداکثر دمای رشد گزارش شده توسط سامونلز و همکاران (2002) 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 سریع‌الرشد به طوری که قطر رشد آن پس از 10 روز به 30-40 میلی‌متر می‌رسد. پرگنه تا حدی پنبه‌ای، در حاشیه سفید و به

طرف مرکز نارنجی مایل به زرد کمرنگ و در سطح زیرین بیرنگ است. کنیدیوم‌زایی فراوان، فیالیدها 20-65 میکرومتر طول و 2-3 میکرومتر ضخامت در پایه که در انتها به 1-1/3 میکرومتر باریک می‌شود. کنیدیوم‌ها در سرهای کنیدیومی مرطوب تولید شده، اغلب تک سلولی (ندرتاً دو سلولی)، شفاف، استوانه‌ای و بعضاً کمی خمیده‌اند. طول کنیدیوم‌ها 4-7 میکرومتر و عرض آن‌ها 1/5-2/5 میکرومتر می‌باشد. اگرچه جدایه‌های ایرانی حتی پس از 20 روز هم کلامیدوسپور تولید نکردند اما کلامیدوسپورهای بینابینی و زنجیری با سلول‌های کروی و اندازه 5-8 میکرومتر توسط گمس (1971) گزارش شده‌اند. این گونه اغلب از گونه‌های جنس‌های مختلف قارچی شامل *Polyporus*, *Fomes*, *Heterobasidion*, *Trametes*, *Agaricus* و *Hypoxylon*, *Tuber* جدا شده است (گمس 1971).

جدول 1- 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
<i>Acremonium crotoconigenum</i>	V07 = IRAN 706C	Shahriar (Farshad)
<i>Acremonium crotoconigenum</i>	V14	Shahriar (Farshad)
<i>Acremonium crotoconigenum</i>	V15	Shahriar (Farshad)
<i>Acremonium crotoconigenum</i>	V34 = IRAN 708C	Mallard (Mallard)
<i>Acremonium crotoconigenum</i>	V35	Mallard (Mallard)
<i>Acremonium crotoconigenum</i>	V36	Mallard (Mallard)
<i>Acremonium crotoconigenum</i>	V50	Shahriar (Mehrchin)
<i>Acremonium crotoconigenum</i>	P4	Mohammadshahr (Pedam)
<i>Acremonium crotoconigenum</i>	P3	Mohammadshahr (Pedam)
<i>Acremonium crotoconigenum</i>	P1	Mohammadshahr (Pedam)
<i>Acremonium crotoconigenum</i>	P2	Mohammadshahr (Pedam)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	M3	Mallard (Mallard)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	M2	Mallard (Mallard)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F18	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F19	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F15	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F13	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F16	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F9	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F8	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F17	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F14	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F20	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	M1	Mallard (Mallard)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F12	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F11	Shahriar (Farshad)
<i>Cladobotryum dendroides</i>	F10	Shahriar (Farshad)
<i>Trichoderma harzianum</i>	SH8	Shahriar (Pars-e-Shahriar)
<i>Trichoderma harzianum</i>	SH5	Shahriar (Pars-e-Shahriar)

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

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

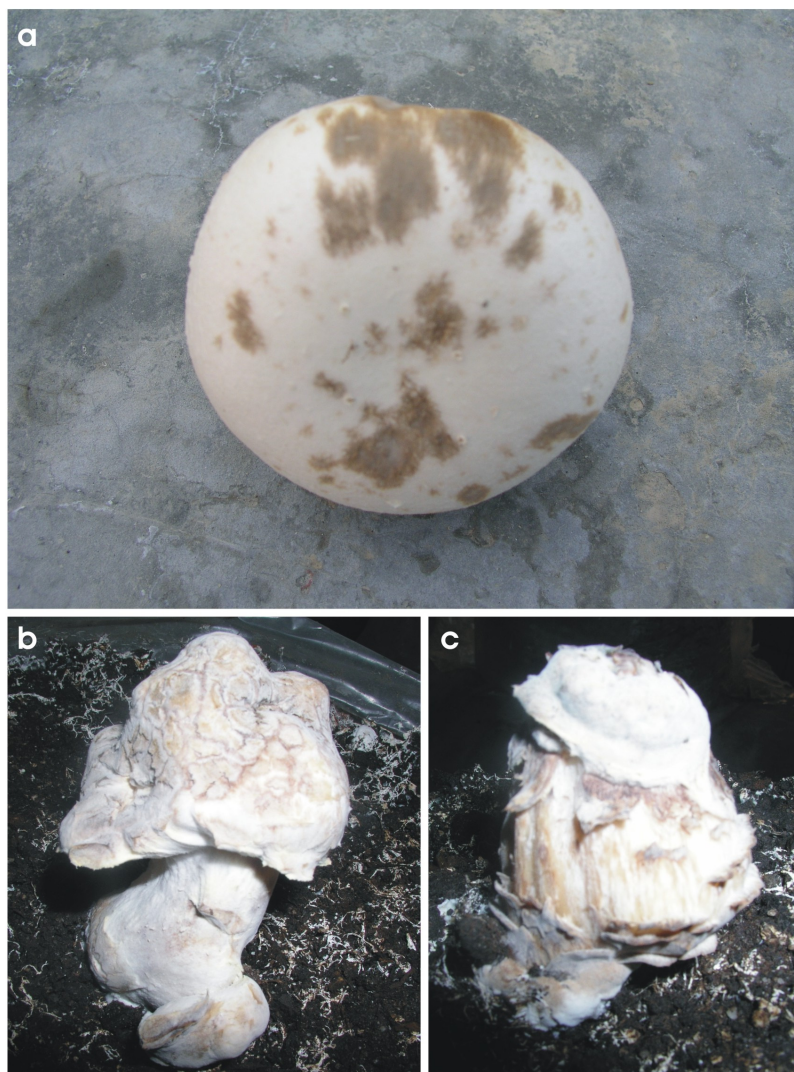
- All isolates were obtained from *Agaricus bisporus*.
 - IRAN...C = Fungal Culture Collection of Herbarium Ministerii Iranici
 Agriculturae, Plant Pests & Diseases Research Institute, Tehran.

علایم بیماری حباب خشک

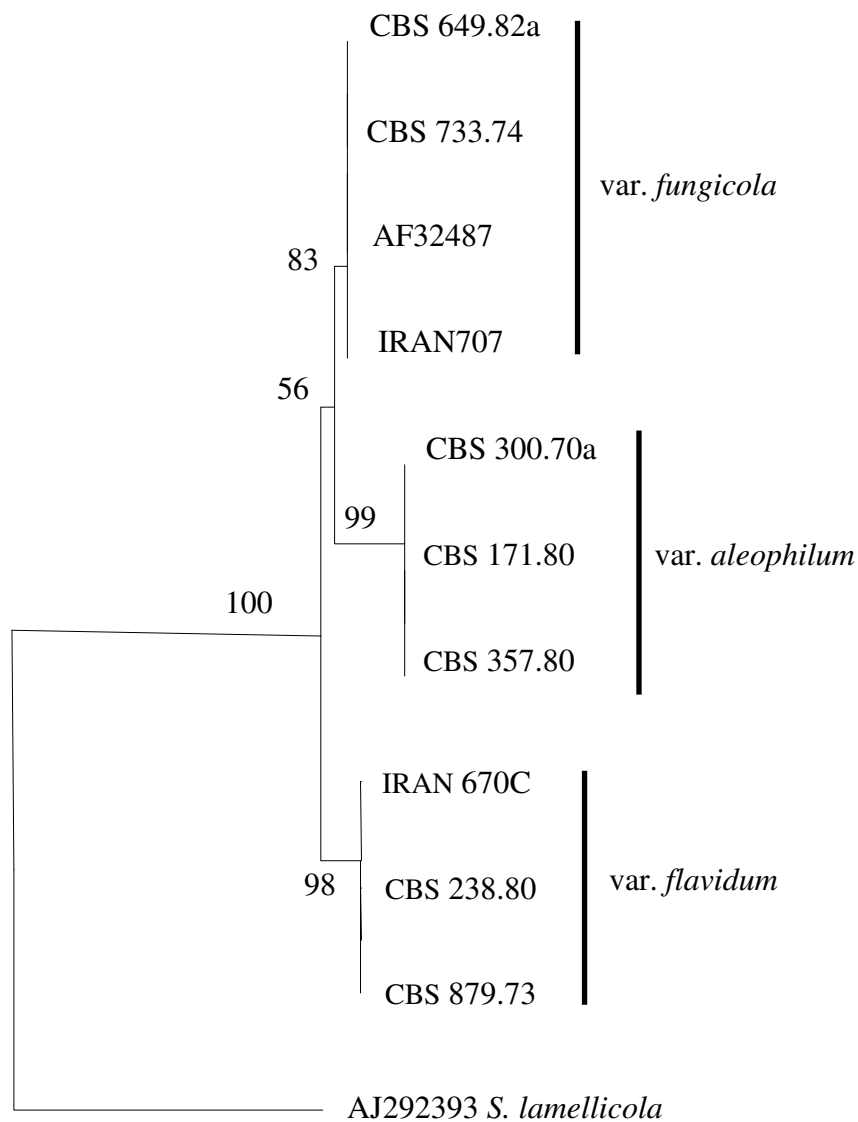
چنانچه عامل بیماری حباب خشک (dry bubble disease) از زمان دادن خاک پوششی (casing soil)، در خاک پوششی بوده باشد، در دمای 25 درجه سانتی‌گراد سالن رشد نموده و موجب کاهش تعداد سرسنجاقی‌ها (pinheads) می‌گردد. پس از ظهور سرسنجاقی‌ها تا بلوغ کلاهک‌ها به طور عمده سه فرم علایم در کارپوفورها قابل مشاهده است: 1- 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

لکه‌ها بار قارچ بیمارگر به صورت پودری تشکیل می‌شود. 2- تغییر رنگ پایه کلاهک‌ها به کرم مایل به قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای و پوسته پوسته شدن سطح بیرونی کلاهک‌ها. 3- تغییر شکل پایه و کلاهک از ابتدای رشد به طوری که پایه کج و معوج (غیر عادی) شده و کلاهک کاملاً تغییر شکل می‌یابد. رنگ این کارپوفورهای بیمار قهوه‌ای تا قهوه‌ای روشن می‌باشد (شکل 1). 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.

واریت‌های مختلف گونه *Verticillium fungicola* قبلاً توسط گمس و ون‌زاین (1982) بر اساس اختلاف دمای رشد از یکدیگر جدا شده بودند. رابطه دمای بهینه و حداکثر دمای رشد مجدداً برای این واریته‌ها 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 کاملاً مجزا هستند (شکل 2). واریته *aleophilum* با داشتن حداکثر دمای رشد بالاتر (30 درجه سانتی‌گراد در مقایسه با 27 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 3) و تنها راه تشخیص تعیین توالی منطقه ITS یا سایر قسمت‌های ژنوم می‌باشد. کریستال (شکل 3) 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* معمولاً 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.

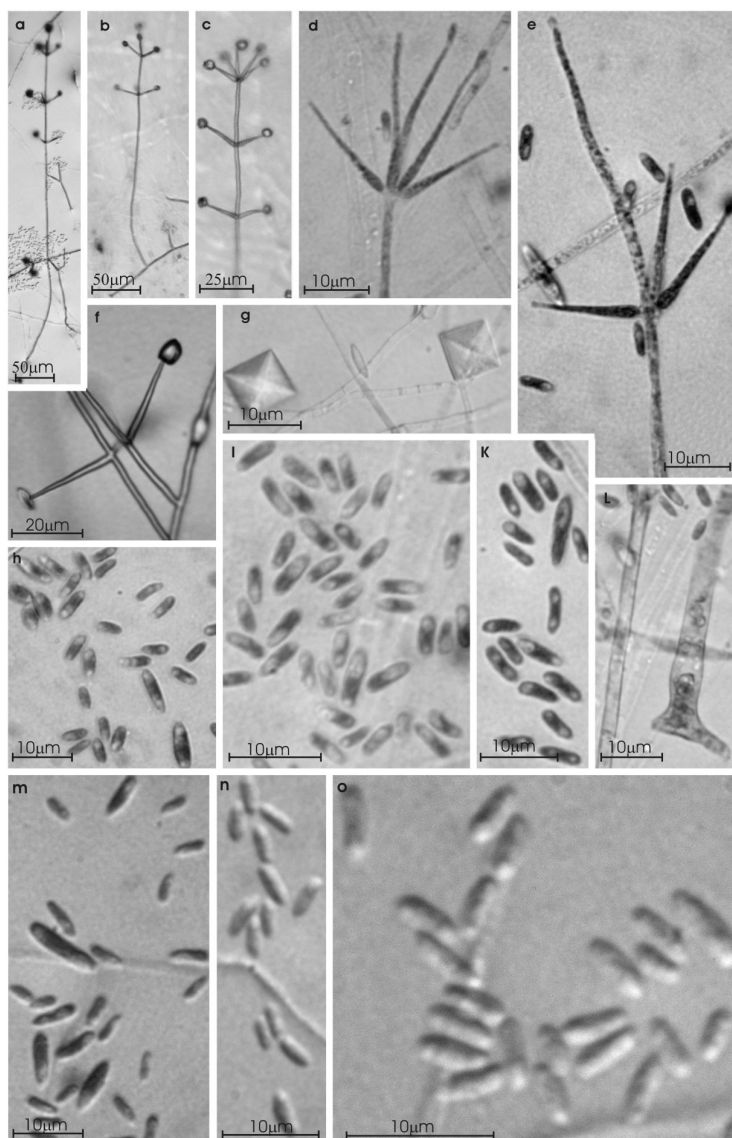


شکل 1- علائم بیماری حباب خشک در *Agaricus bisporus* ناشی از قارچ *Verticillium fungicola*. a. لکه‌های قهوه‌ای روی کلاهک. b و c. بدشکلی و مومیایی شدن کلاهک و پایه.
Fig. 1. Symptoms of dry bubble disease of *Agaricus bisporus* caused by *Verticillium fungicola*. a. brown spots on the cap. b, c. deformation and mummification of fruit-bodies.



شکل 2- درخت فیلوژنی واریته‌های گونه *Verticillium fungicola* (جدایه‌های ایرانی و غیر ایرانی نگهداری شده در CBS) به دست آمده از توالی‌های نواحی ITS و 5.8S از DNA ریبوزومی با روش Neighbor-Joining با 1000 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.



شکل 3- واریته‌های *Verticillium fungicola*. a-f. کنیدیوفور و سرهای کنیدیومی. g. کریستال‌ها. l. پایه کنیدیوفور. m-o و h-k. کنیدیوم‌ها. var. *fungicola* (f, g, m). var. *flavidum* (a, b, e, k, n, o). var. *aleophilum* (c, d, h, i, l). استرین‌ها: 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).

سپاسگزاری

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

منابع

جهت ملاحظه منابع به صفحات 5-7 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 1454، تهران 19395.

**FUNGI ISOLATED FROM *AGARICUS BISPORUS* IN
TEHRAN PROVINCE WITH SPECIAL REFERENCE TO
*VERTICILLIUM FUNGICOLA***

R. ZARE* and **H. KHABBAZ-JOLFAEI**
Plant Pests & Diseases Research Institute

Received: 24.05.2005

Accepted: 17.09.2005

During 2003-04 major mushroom production units of Tehran province were sampled and 103 fungicolous isolates were obtained (Table 1). *Verticillium fungicola* (with 50 isolates), *Trichoderma harzianum* (with 24 isolates), *Cladobotryum dendroides* (with 16 isolates) and *Acremonium crotoconigenum* (with 11 isolates) were the most frequent fungi associated with the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. The report of *A. crotoconigenum* and two varieties of *V. fungicola* (*fungicola* and *flavidum*) is new to the mycoflora of Iran. The validity of temperature tests for distinction between *T. harzianum* and *T. aggressivum* is under question as the Iranian isolates of *T. harzianum* have the same growth rate as those of *T. aggressivum*, but based on molecular data (AFLP) they are different from both species. They could however represent a new taxon. *Verticillium fungicola* causes dry bubble disease and also distortion and mummification of the fruit-bodies of *Agaricus bisporus* (Fig. 1). The two varieties are indistinguishable from each other on morphological grounds (Fig. 3), but they are distinct at ITS level (Fig. 2).

Key words: *Agaricus bisporus*, fungicolous fungi, *Verticillium fungicola*, *Cladobotryum*, *Acremonium*, *Trichoderma*

* Corresponding author

To look at the figures and table, please refer to the Persian text (pages: 17-29).

References

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

- 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.

