شناسایی قارچ‌های بیماریزای متداول در مراکز پرورش قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) استان اردبیل با روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی

مهدی داوری[۱*]، احمد شهریار[۲]، مهدی بهنامیان[۳]، سارا دژستان[۴] و فاطمه علی‌حسین زاده [۵]

۱- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه محقق اردبیلی.
۲- فارغ‌التحصیل کارشناسی ارشد علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی.
۳- استادیار گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی.
۴- دانشیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشگاه محقق اردبیلی.
۵- کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.
* مسئول مکاتبه: mdavari@uma.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۲۵ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱/۲۷

چکیده

با توجه به اهمیت بالای قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus*) به عنوان منبع غذا و پروتئین، شناسایی و کنترل بیماری‌های مرتبط با این محصول در دنیا مورد توجه قرار گرفته است. در استان اردبیل چندین واحد تولیدی قارچ دکمه‌ای فعالیت می‌کنند. در این تحقیق، نمونه‌های آلوده از واحدهای پرورش این محصول در شهرهای اردبیل، نمین، سرعین، مشگین‌شهر و پارس‌آباد جمع‌آوری شد. پس از جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌های بیمارگر از قارچ‌های خوراکی و خاک پوششی آلوده، از ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی شامل مشخصات پرگنه روی محیط کشت MEA و PDA و اندازه و شکل کنیدیوم‌ها و کنیدیوم‌برها برای شناسایی اولیه با استفاده از کلیدهای معتبر استفاده شد. سپس جدایه‌ها با توالی‌یابی ناحیه ژنی ITS-rDNA مورد تایید نهایی قرار گرفتند. در این پژوهش از بین ۷۲ جدایه شناسایی شده، گونه‌های *Lecanicillium fungicola* عامل بیماری حباب خشک، *Trichoderma harzianum* و *T. virens* عوامل بیماری کپک سبز، *Mycogone perniciosa* عامل بیماری حباب تر و *Cladobotryium mycophilum* عامل بیماری تارعنکبوتی به ترتیب با فراوانی ۴۹، ۱۸، ۱۴، ۱۴ و پنج درصد شناسایی شدند. این اولین مطالعه‌ی بیماری‌های قارچی قارچ دکمه‌ای در استان اردبیل محسوب می‌شود. این نتایج می‌توانند پس از تحقیقات تکمیلی، برای به کار گیری راهبردهای مناسب جهت پیشگیری و کنترل بیماری‌های قارچی در مراکز پرورش قارچ دکمه‌ای مور استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: قارچ خوراکی، *Trichoderma*، *Mycogone*، *Lecanicillium*، *Cladobotryium*.

مقدمه

باتوجه به افزایش روزافزون جمعیت کره‌ی زمین امنیت غذایی روز به روز از اهمیت برخوردار می‌شود. در این میان، یکی از منابع جدید غذایی، قارچ‌های خوراکی می‌باشند. قارچ‌های خوراکی از نظر ارزش غذایی و دارویی بسیار حائز اهمیت بوده و در سال‌های اخیر، پرورش این قارچ‌ها از پیشرفت چشمگیری برخوردار بوده است، به‌طوری که توسط سازمان خوار و بار جهانی (FAO) به عنوان یک منبع پروتئین در کشورهای در حال توسعه معرفی شده اند. قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید با نام علمی *Agaricus bisporus* (Lange) Singer، از مهم‌ترین انواع قارچ‌های خوراکی است که کشت آن برای اولین بار در فرانسه و در سال ۱۶۵۰ میلادی آغاز شد. با وجود این، تولید تجاری قارچ در ایران یک صنعت نسبتا جوان بوده و طی سال‌های اخیر، تاسیس کشت و صنعت‌های تولید قارچ به تدریج در اطراف شهرهای بزرگ و سپس شهرهای دیگر آغاز شده است (محمدی گل‌تپه و پورجم ۱۳۸۹). ایران با داشتن

۶۷۴ هکتار سطح زیر کشت ، هشتمین تولیدکننده‌ی قارچ خوراکی در دنیا است. بر اساس آمار رسمی وزارت جهاد کشاورزی در سال ۱۳۹۴ میزان تولید قارچ دکمه‌ای در کشور ۱۳۲ هزار و ۵۸۸ تن بوده که سهم استان اردبیل از این میان، تولید دو هزار و ۹۵۰ تن قارچ از ۱۵/۵ هکتار سطح زیر کشت با متوسط عملکرد ۱۹ کیلوگرم به ازای هر متر مربع می‌باشد که حاکی از توجه بالا به این بخش در استان می‌باشد (بی‌نام ۱۳۹۴). در حال حاضر، تولید کنندگان قارچ در ایران ارقام A15، A512، A180 و A2200 قارچ *A. bisporus* را کشت می‌کنند. در حال حاضر در استان اردبیل تنها رقم A15 مورد کشت قرار دارد (جمالی، ۱۳۸۰).

قارچ‌های خوراکی نیز همانند سایر محصولات کشاورزی مورد حمله‌ی انواع آفات و عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرند و در برخی موارد، خسارت‌های قابل توجهی را متحمل می‌شوند. این خسارت‌ها، کاهش محصول، افت کیفیت و در نهایت، کاهش بازده اقتصادی واحدها را به همراه دارد. حتی در مواردی مشاهده شده است که در اثر حمله‌ی عوامل بیماری‌زای قارچی، محصول غیر قابل برداشت شده یا به‌شدت کیفیت محصول پایین آمده و غیر قابل عرضه به بازار می‌شود. با توجه به نزدیکتر بودن شرایط محیطی به ویژه دمای واحدهای تولیدی قارچ خوراکی به دمای بهینه برای رشد عوامل بیماری‌زای قارچی، این عوامل به عنوان مهم‌ترین عوامل بازدارنده‌ی پرورش قارچ خوراکی در ایران به‌شمار می‌روند. از مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌زا در قارچ دکمه‌ای سفید می‌توان به گونه‌های مختلف جنس‌های قارچی *Mycogone* (عامل بیماری حباب تر)، *Lecanicillium* (عامل بیماری حباب خشک)، *Trichoderma* (عامل بیماری کپک سبز)، *Cladobotryum* (عامل بیماری تار عنکبوتی)، *Trichothecium* (عامل بیماری کپک صورتی)، *Peziza* (عامل بیماری کپک دارچینی) و از باکتری‌های مهم بیماری‌زا می‌توان به لکه‌قهوه‌ای باکتریایی (*Pseudomonas talaasi*) اشاره کرد (زارع و خبازجلفایی ۱۳۸۴ و جمالی و همکاران ۱۳۹۳).

با تو.جه به نوپا بودن مراکز پرورش قارچ دکمه‌ای در استان اردبیل و خسارت ناشی از بیمای‌های قارچی در آن مراکز و عدم اطلاع کافی از وضعیت گونه‌های قارچی بیمارگر قارچ‌های خوراکی در این استان، در مطالعه‌ی حاضر، عوامل بیماری‌زای قارچی مراکز مهم تولید قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید این استان جداسازی و با روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی مورد شناسایی قرار گرفتند تا در اقدامات پیشگیری و کنترلی مناسب مورد استفاده قرار گیرند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌ها، جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌های بیماری‌زا

در این پژوهش، در مجموع ۱۶۵ نمونه از شش واحد تولیدی استان واقع در شهرهای اردبیل، مشگین شهر، پارس‌آباد، نمین و سرعین از چین‌های اول، دوم و سوم جمع‌آوری گردید. نمونه‌برداری از کلاهک و ساقه قارچ‌های دکمه‌ای و خاک پوششی آلوده صورت گرفت و نمونه‌ها به صورت جداگانه در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه منتقل گردیدند. سپس قطعاتی از قارچ‌های دارای علایم آلودگی پس از فرو بردن در داخل الکل ۷۰ درجه به مدت ۲۰ ثانیه، از روی شعله به سرعت عبور داده شده و به کمک چوب‌پنبه سوراخ‌کن استریل ، مقداری از نمونه روی محیط کشت عصاره‌ی جو آگار (MEA)[1] حاوی ۵۰ میلی‌گرم در لیتر از هر یک از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها قرار داده شد. این کشت‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتیگراد قرار گرفتند. به منظور خالص‌سازی قارچ‌ها از روش تک اسپور[2] استفاده گردید. در نهایت، کشت‌های خالص در یخچال با دمای چهار درجه‌ی سانتیگراد نگهداری شدند.

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی

برای شناسایی جدایه‌های قارچی، ویژگی‌های ماکروسکوپی جدایه‌ها شامل رنگ و نرخ رشد پرگنه، شکل پرگنه و تولید یا عدم تولید رنگدانه یادداشت شد. اسلاید میکروسکوپی از جدایه‌های خالص رشد یافته

[1]Malt Extract Agar
[2]Single spore

روی محیط کشت PDA[3] و PCA[4] با استفاده از لاکتوفنل کاتن‌بلو تهیه شده و با میکروسکوپ زایس (Zeiss Axio, Germany)، ویژگی‌های ریخت‌شناسی میکروسکوپی شامل تشکیل و یا عدم تشکیل کنیدیوم، مکانیسم کنیدیوم-زایی و ویژگی‌های کنیدیوم (رنگ، شکل و دیواره‌بندی) مورد بررسی قرارگرفت. سپس قارچ‌ها تا حد گونه با استفاده از منابع معتبر از جمله ریفای (۱۹۶۹)، دومش و گمس (۱۹۸۰) و بیست (۱۹۹۱) (برای جنس *Trichoderma*)، گلامولیجا (۲۰۰۸) و آرنولد و یورخنکو (۲۰۰۷) (برای جنس *Mycogone*)، زارع و گمس (۲۰۰۸) (برای جنس *Lecanicillium*) و گمس و هوزمنز (۱۹۷۰) (برای جنس *Cladobotryum*) و برخی مقالات معتبر دیگر مورد شناسایی قرار گرفتند. تمامی قارچ‌های شناسایی شده با کد اختصاری FCUMA (Fungal Collection of University of Mohaghegh Ardabili) در کلکسیون قارچ-شناسی دانشگاه محقق اردبیلی ثبت و نگهداری شدند.

شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی

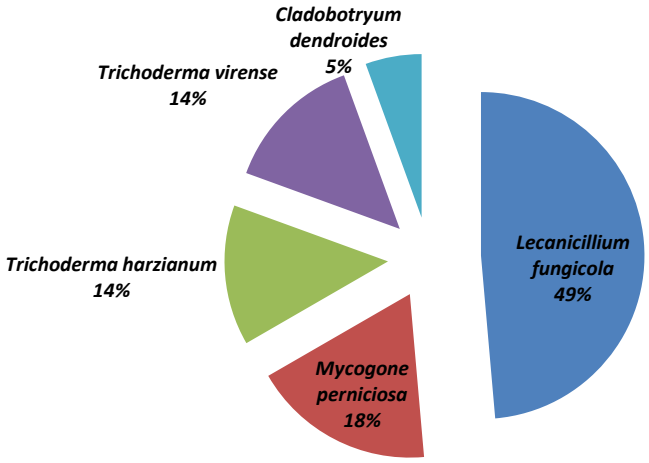
استخراج و تکثیر DNA ژنومی جدایه‌ها و توالی‌یابی

برای تایید شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها از توالی-یابی DNA در مورد جدایه‌های منتخب استفاده شد. بدین منظور، جدایه‌های مورد نظر در محیط کشت PDA کشت داده شده و در تاریکی به مدت ۷ تا ۱۰ روز در دمای ۲۵°C نگهداری شدند. DNA جدایه‌ها با استفاده از روش مولر وهمکاران (۱۹۹۲) استخراج گردید. در این بررسی، ناحیه‌ی فاصله‌انداز داخلی[5] DNA ریبوزومی (ITS -rDNA) تکثیر شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۱۲/۵ میکرولیتر جهت تکثیر ناحیه ITS and 5.8S -rDNA با استفاده از آغازگرهای ITS1 (5´- TCCGTAGGTGAACCTGCGG -3´) و ITS4 (5´- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3´) (وایت و همکاران ۱۹۹۰) مطابق شرایط ذکر شده قبلی (داوری و همکاران ۲۰۱۳) اجرا شد. محصول واکنش PCR از ژل آگاروز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید در بافر TAE ×1 (1mM EDTA (PH=8)، 20 mM acetic acid، 40 mM Tris base) عبور داده شد و عکسبرداری با استفاده از دستگاه ژل داک انجام شد. واکنش توالی‌یابی با استفاده از کیت توالی‌یابی ABI prism BigDyeTM terminator cycle (Applied Biosystems, Foster City, USA) و در یک توالی‌یاب اتوماتیک ABI 3730XL و مطابق دستورالعمل ارایه شده توسط شرکت سازنده انجام شد. اطلاعات توالی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SeqMan (DNASTAR, Madison, WI, USA) ویرایش شدند. توالی-های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن (GenBank) با استفاده از BLAST مقایسه شدند و جدایه-های با بیشترین مشابهت (بالای ۹۹٪) برای تعیین دقیق هویت و تایید مولکولی گونه‌های قارچی مد نظر قرار گرفتند. توالی یک جدایه منتخب از هر گونه در بانک ژن ثبت و شماره دسترسی دریافت شد.

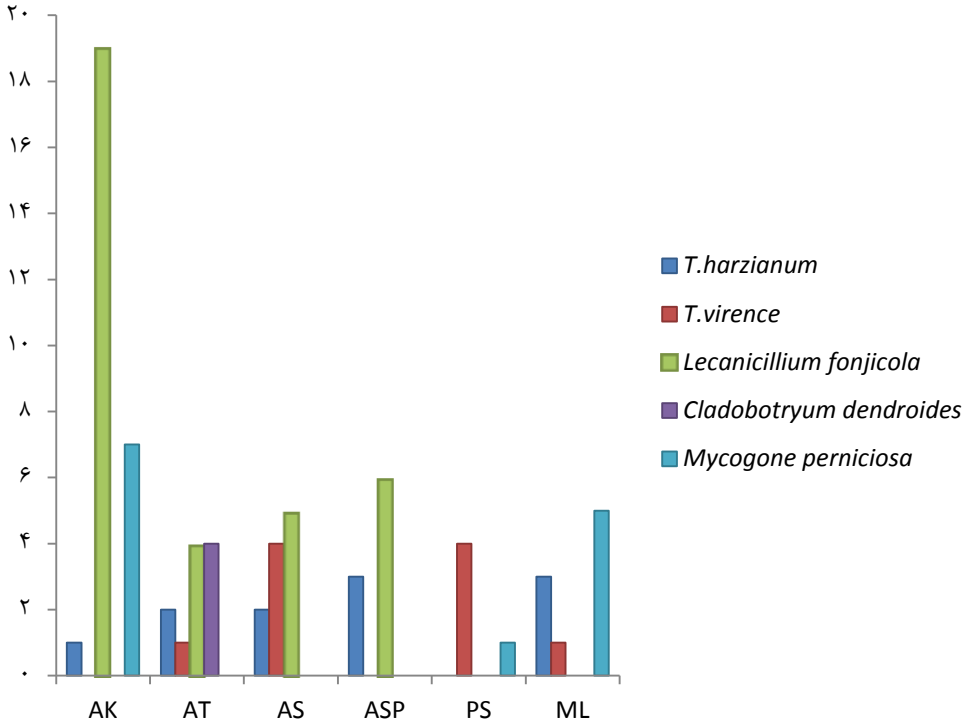
نتایج و بحث

در این پژوهش، ۷۲ جدایه‌ی قارچ بیماری‌زا از بخش-های مختلف نمونه‌های قارچ خوراکی دکمه‌ای و خاک پوششی آلوده به‌دست آمد. طی این تحقیق، با مطالعه‌ی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مطابقت با کلیدهای معتبر، گونه‌های قارچی *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Zare & W. Gams (عامل بیماری حباب خشک)، (Magnus) *Mycogone perniciosa* Delacr. (عامل بیماری حباب تر)، *Trichoderma harzianum* Rifai و *T. virens* (J.H. Mill., Giddens & A.A. Foster) Arx (عوامل بیماری کپک سبز) و *Cladobotryum mycophilum* (Oudem.) W. Gams & Hooz. (عامل بیماری تارعنکبوتی) به ترتیب با فراوانی ۳۵، ۱۳، ۱۰، ۱۰ و ۴ جدایه و درصد فراوانی مندرج در شکل ۱ و به تفکیک شهرستان‌ها مندرج در شکل ۲ شناسایی شدند. همچنین با مقایسه توالی‌های ITSبا توالی‌های موجود در بانک ژن، شناسایی جدایه‌های منتخب نماینده با داده‌های مولکولی نیز مورد تایید قرار گرفت. ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مشخصات گونه‌ها به قرار زیر می‌باشد:

[3]Potato Dextrose Agar
[4]Potato Carrot Agar
[5]Internal Transcribed Spacer



شکل ۱- فراوانی گونه‌های قارچی بیماری‌زا روی قارچ خوراکی دکمه‌ای در استان اردبیل.



شکل ۲- فراوانی گونه‌های قارچی به تفکیک مراکز پرورش قارچ خوراکی دکمه‌ای استان اردبیل (**AK**: نمین، **AT**: اردبیل ۲، **AS**: سرعین، **ASP**: اردبیل ۱ ، **PS**: پارس‌آباد، **ML**: مشگین‌شهر).

مشخصات ریخت‌شناختی جدایه‌های به دست آمده از قارچ‌های دکمه‌ای آلوده به *Trichoderma harzianum* Rifai. عامل بیماری کپک سبز

پرگنه‌ی قارچی روی محیط کشت MEA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد از رشد سریعی برخوردار بوده و در ابتدا تولید یک توده میسلیومی با سطح صاف، سفید و آبکی کرد، ولی به سرعت هیف‌های هوایی رشد کرده و روی سطح را پوشانده و در طول ۴۸ ساعت، تمام سطح تشتک پتری نه سانتی‌متری را پر کردند. اسپوردهی به‌طور معمول از خارج به سمت داخل تشتک پتری صورت گرفت. نواحی کنیدیایی به رنگ سبز مایل به سفید بوده و با گذشت زمان به‌رنگ سبز روشن و براق درآمدند. هیف‌ها دارای دیواره‌ی عرضی، منشعب با دیواره‌ی صاف، بی‌رنگ و به قطر ۱/۵ تا ۶ میکرون بودند. در

محیط کشت PDA، کلامیدوسپورهای بین هیفی و گاهی انتهایی به‌صورت کروی، دارای دیوارهٔ صاف و به قطر شش تا ۱۲ میکرون بودند. انشعابات اصلی کنیدی‌بر تولید انشعابات فرعی متعددی را کردند که به‌طور انفرادی و اکثراً در گروه‌های دو تا سه تایی تشکیل شده و هر یک از آنها خود به انشعابات کوچک‌تری تقسیم می‌شدند (شکل ۳). فیالیدها کوتاه، میله‌ای‌شکل، در قاعده باریک‌تر از ناحیه میانی و در نوک مخروطی بودند. فیالوسپورها به‌طور انفرادی و متوالی در نوک هر فیالید تجمع یافته و تشکیل راس و نوک کنیدیایی کروی‌شکلی را می‌دادند. مشخصات این گونه با شرح ارایه شده توسط ریفای (۱۹۶۹)، بیست (۱۹۹۱) و مقالات مرتبط مطابقت داشت و توالی ITS نمایندگان این جدایه‌ها با توالی‌های ارایه شده در بانک ژن مشابهت بالایی نشان داد. توالی یک جدایه از این گونه قارچی که از یکی از واحدهای تولیدی شهر اردبیل به دست آمده بود، با راس‌شمار[6] KX944695 در بانک ژن ثبت شد.

عامل بیماری کپک سبز *Trichoderma virens* (Miller, Giddens & Foster) von Arx

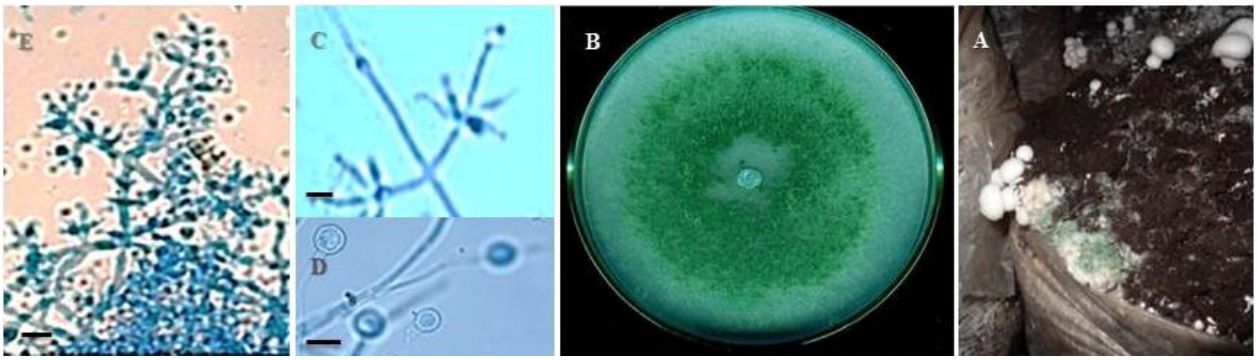
پرگنه‌های این قارچ روی محیط کشت MEA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد دارای رشد سریع بوده و پس از چهار روز تمام سطح تشتک پتری ۹ سانتیمتری را پوشاند. سیمای ظاهری پرگنه کرکی بوده و پس از پر نمودن تشتک پتری، اسپوردهی از کناره‌ها شروع می‌شد. این گونه فاقد هر گونه ترشحی بود. اسپورها به‌صورت توده‌های سبز کم‌رنگ ظاهر می‌شدند (شکل۳). هیفها روشن و شفاف با دیواره‌ی صاف و به‌عرض حدود ۱/۵ تا شش میکرون بودند. کلامیدوسپورها معمولاً قابل مشاهده بوده و به صورت بین هیفی و یا انتهایی، انفرادی، کروی تا بیضوی به طول شش تا ۱۲ میکرون با دیواره‌ی صاف و با ضخامت دیواره حدود یک میکرون بودند. فیالیدها آمپولی‌شکل متورم و فیالوسپورها به رنگ سبز، با دیواره‌ی صاف و تخم‌مرغی نسبتاً کوتاه بودند (شکل۴). مشخصات ریخت‌شناختی با توصیف ریفای (۱۹۶۹)، بیست (۱۹۹۱) و مقالات مرتبط مطابقت داشت و نتایج توالی‌یابی ITS نیز آن را تایید نمود. توالی‌های به‌دست آمده در این تحقیق با توالی جدایه مرجع این گونه در بانک ژن با راس‌شمار KR296867.1، ۹۹٪ مشابهت نشان داد. توالی یک جدایه از این گونه قارچی که از واحد تولیدی سرعین به دست آمده بود، با شماره دسترسی KX944694 در بانک ژن ثبت شد.

تا به حال در دنیا چهار تا شش گونه از تریکودرما از سطح کمپوست قارچ خوراکی گزارش گردیده که عامل بروز کپک سبز می‌باشند (سیبای ۱۹۹۶). در ایران این بیماری در حال حاضر خسارت بالایی را در کشت و صنعت‌های قارچ خوراکی وارد می‌کند (محمدی گل‌تپه و پورجم ۱۳۸۹) و گاهی اوقات خسارت این بیماری در تهران و کرج معادل ۷۵ تا ۸۰ درصد نیز گزارش شده است. در بررسی‌های انجام شده توسط زرگرزاده و همکاران (۱۳۹۰) در واحدهای تولیدی قارچ خوراکی در استان تهران و شهرستان ارومیه مشاهده شد که گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* شایع‌ترین عامل بیماری در این واحدها به شمار می‌آید. حمله‌ی گونه‌های تریکودرما به قارچ خوراکی به صورت کلنیزاسیون سریع کمپوست اسپان زده شده و عمده آلودگی نیز در کمپوست غیر پاستوریزه و ابتدای زمان تلقیح بذر در کمپوست می‌باشد (رضایی‌دانش و همکاران ۱۳۸۰).

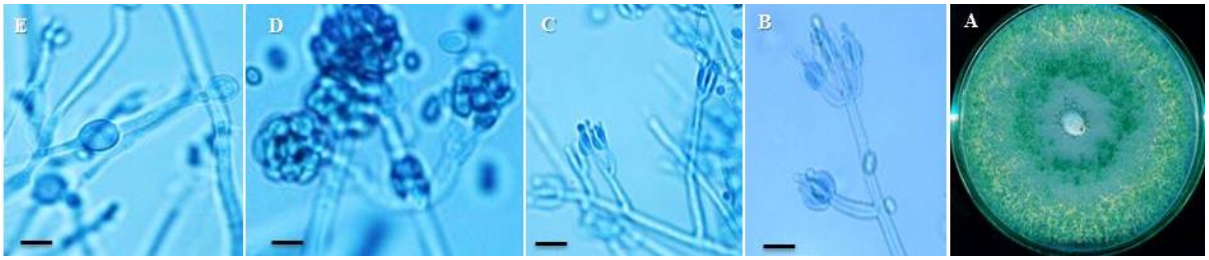
عامل بیماری حباب تر *Mycogone perniciosa* Magn.

پرگنه‌های این گونه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد دارای حاشیه‌ی منظم، سرعت رشد پایین و ریسه‌های هوایی کم‌تراکم تا متراکم بودند و بعد از ده روز، سطح تشتک پتری ۹ سانتیمتری را پوشاند. رنگ پرگنه‌ها از رنگ کرمی تا شیری متغیر بود (شکل B-۵). این گونه دو نوع اسپور تولید می‌کند. نوع اول، کنیدیوم‌ها (آلئوروسپورها) است که به صورت انتهایی و انفرادی تشکیل می‌شدند. در این اسپورهای دو سلولی، سلول بالایی دارای دیواره‌ی تزیین شده ضخیم، گاهی اوقات رنگیزه‌دار، بزرگ‌تر از سلول پایینی و سلول

[6] Accession number

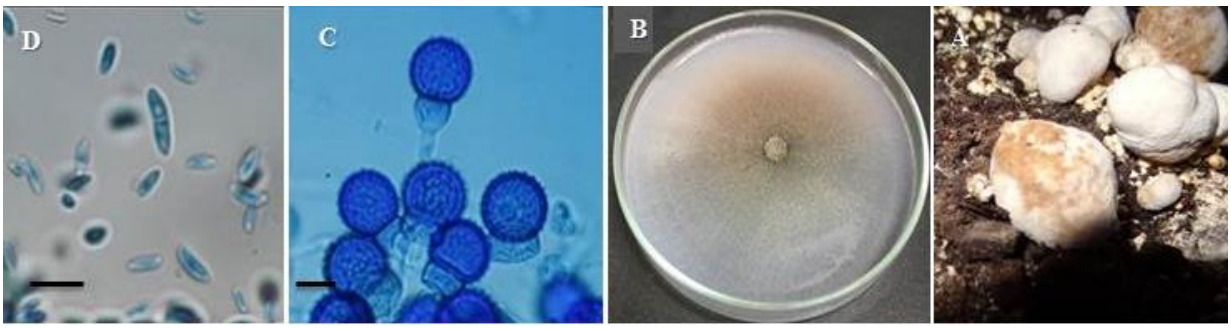


شکل۳- *Trichoderma harzianum*: نمایی از آلودگی به کپک سبز در مرکز پرورش قارچ دکمه‌ای اردبیل ۱ (**A**)، پرگنه روی **PDA** بعد از چهار روز (**B**)، فیالیدها و فیالوسپورها (**C**، **D**). مقیاس **c** و **D**: **۱۰µm**، **E**: مقیاس **۲۰µm**.



شکل۴- *Trichoderma virens*: پرگنه روی **PDA** بعد از پنج روز (**A**)، فیالیدها و فیالوسپورها (**B-D**)، کلامیدوسپورها (**E**). مقیاس **۱۰µm**.

پایینی با دیواره‌ی نازک و بدون آرایش و کوچک‌تر از سلول بالایی بود (شکل C–۵). در این جدایه‌ها مرحله‌ی فیالوسپور قارچ نیز دیده می‌شد که در آن انگشتک‌ها به صورت انشعابات فراهم تشکیل و در انتهای آن، اسپور-های شفاف تشکیل می‌شدند. فیالیدها µm ۳۰-۲۲×۳-۲ و فیالوسپورها بیضوی تا سیلندری‌شکل، روشن، یک یا دو سلولی و به ابعاد µm ۱۵-۱۱×۳/۵-۲/۵ بودند (شکل D–۵). توالی یک جدایه از این گونه قارچی به شماره کلکسیون FCUMA422 که از واحد تولیدی مشگین‌شهر به دست آمده بود، با شماره دسترسی KX944692 در بانک ژن ثبت شد.



شکل۵- *Mycogone perniciosa*: کلاهک‌های آلوده به حباب‌تر در واحد تولیدی نمین (**A**)، پرگنه روی **PDA** بعد از هشت روز (**B**)، آلئوروسپور دو سلولی (**C**)، فیالوسپورها (**D**). مقیاس **۱۰µm**.

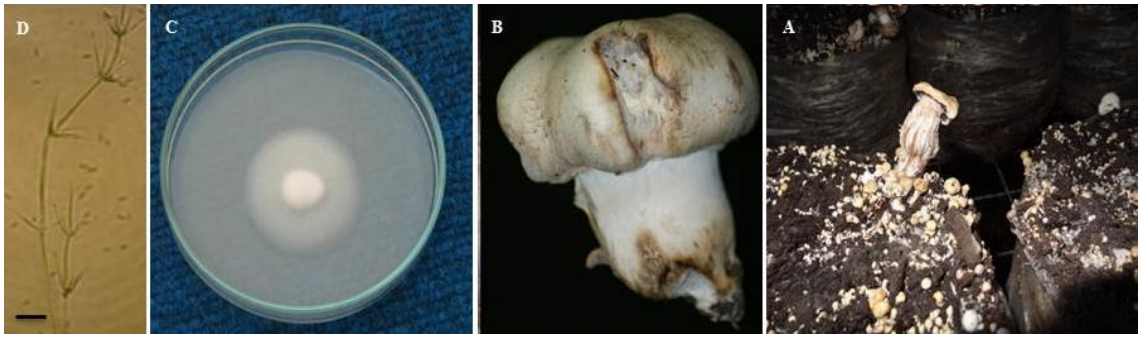
بیماری حباب‌تر که عامل آن دو گونه *Mycogone perniciosa* و *M. rosea* می‌باشد، از بیماری‌های مهم و مخرب قارچ دکمه‌ای سفید به‌شمار می‌رود. فلتچر و گانی (۱۹۶۸) گزارش کردند که قارچ *M. periniciosa* منجر به ایجاد خسارتی معادل ۷/۶ تا ۲۱ درصد در انگلستان می-شود. در تحقیق دیگری بات و سینگ (۲۰۰۰) دریافتند که گونه‌های *M. periniciosa* و *Hypomyces rosells* به ترتیب موجب ۹۵/۶۵ تا ۱۰۰ درصد و ۶۱ تا ۷۲/۰۶ درصد کاهش محصول می‌شوند. علی‌حسین‌زاده و همکاران (۱۳۹۰) قارچ‌های بیماری‌زای جنس *Mycogone* شامل

گونه‌های *M. rosea* و *M. perniciosa* را به عنوان عوامل بیماری حباب تر برای اولین بار از ایران گزارش کردند. بارزترین علامت این بیماری، تشکیل توده‌های بافتی بدشکل روی کلاهک‌ها است که در مراحل ابتدایی، این توده‌های بافتی، سفید و نرم بوده و ضمن توسعه به رنگ قهوه‌ای در می‌آیند. این توده‌ها اصطلاحاً به Sclerodermoid معروف‌اند که ممکن است ارتفاع آنها به ۱۰ تا ۱۵ سانتی‌متر برسد. این توده‌ها اغلب ناشی از آلودگی کلاهک‌های ابتدایی و در حال رشد می‌باشد که ممکن است تشکیل و توسعه آنها ۱۰ تا ۱۴ روز به طول انجامد. در مراحل بعد، قطرات مایع به‌رنگ زرد کهربایی مایل به قهوه‌ای روشن در روی سطح بافت به‌ویژه در شرایط خیلی مرطوب تشکیل می‌شود. وجود این قطرات علامت خاص این بیماری است که نام عمومی انگلیسی بیماری نیز از آن گرفته شده است. در شرایط خشک، کلاهک‌هایی که به‌صورت توده‌ای شکل در آمده‌اند، به‌صورت خشک باقی می‌مانند که وضع آنها بسیار شبیه حالتی است که در بیماری حباب خشک دیده می شود. عامل بیماری حباب تر تنها برای کلاهک‌ها یک عامل بیماری‌زاست و میسلیوم‌ها را آلوده نمی‌کند. به‌طور کلی تغییر شکل کلاهک‌ها به شکل گل‌کلم، ظهور کپک سفید رنگ به‌صورت پوشش نرم و مخملی‌شکل در سطح کلاهک تغییر شکل یافته و تشکیل قطرات مایع همراه با بوی بد از جمله علایم بارز این بیماری به‌شمار می‌رود. این بیماری با ایجاد بدشکلی و تومور همراه بود (شکل A–۵) که با نتایج جمالی قهدریخانی (۱۳۸۰)، علی‌حسین زاده (۱۳۹۰)، شارما و کوما (۲۰۰۰) و گلامولیجا و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت دارد.

عامل *Lecanicillium fungicola* (Preuss) Hassebr بیماری حباب خشک

پرگنه جدایه‌های متعلق به این گونه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد رشد کندی داشتند، به‌طوری‌که بعد از ۱۰ روز قطر پرگنه به سه سانتی‌متر می‌رسید. شکل کنیدیوم‌ها به‌صورت بیضوی کشیده تا استوانه‌ای‌شکل بودند (شکل D–۶). اندازه کنیدیوم‌ها ۸/۵–۳×۲/۵–۱ میکرون بود. کنیدیوم‌ها دارای نوک‌های تقریباً کروی، لزج و چسبناک بوده و اغلب از سمت نوک به صورت منفرد از فیالید جدا شده و همراه با بقیه کنیدیوم‌ها، توده یا توده‌های بزرگی از کنیدیوم-های لزج و چسبناک را تشکیل می‌دادند. جدایه‌های متعلق به این جنس طبق کلید زارع و گمس (۲۰۰۸)، *L. fungicola* تشخیص داده شد. از بین ۷۲ جدایه خالص‌سازی شده، ۳۵ جدایه متعلق به این گونه بود. توالی جدایه FCUMA406 متعلق به این گونه قارچی که از واحد تولیدی نمین به دست آمده بود، با جدایه مرجع دارای راس‌شمار AB107135.1 ، ۹۹٪ مشابهت نشان داد و با - شماره دسترسی KX944691 در بانک ژن ثبت شد.

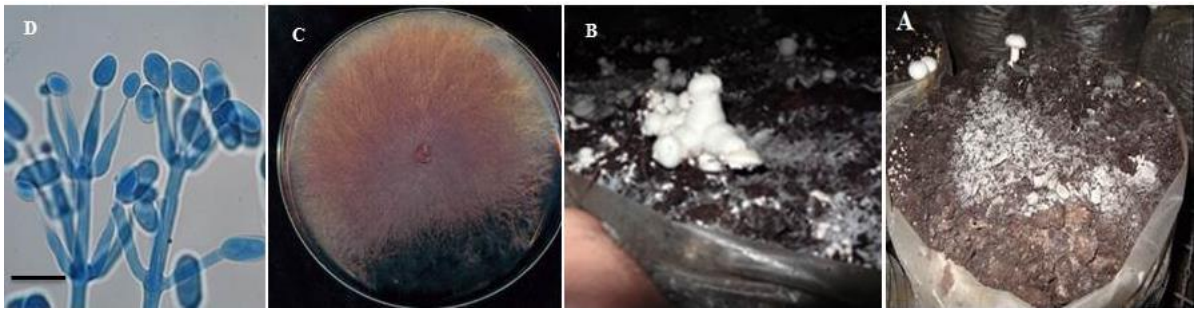
بیماری حباب خشک از مهم‌ترین بیماری‌های قارچی مراکز تولید قارچ خوراکی در ایران است. اساساً این بیماری، سه نوع علایم کلی در میزبان تولید می‌کند که شامل حباب خشک، لکه و زخم‌های بافت مرده و ترکیدن و کنده شدن پوست پایه است. این علایم به‌شدت باعث پایین آمدن ارزش قارچ‌ها می‌شود. علاوه بر این، هم در بسترهای کشت و هم در سایر موارد، قارچ های دیگری از قبیل کپک خاکستری و سفید بر روی لکه‌ها رشد کرده و باعث افزایش هر چه بیشتر خسارت می‌شوند (بختیاری، ۱۳۷۷). تاکنون گونه *L. aleuphilum* فقط از آمریکا گزارش شده است (Collopy *et al.*, 2000) و گونه-ای که به مراکز پرورش قارچ خوراکی کشورهای اروپایی صدمه می‌زند، اغلب *L. fungicola* است (لارجتئو و همکاران، ۲۰۰۶). در ایران نیز گونه *L. fungicola* عامل ایجاد خسارت در مراکز قارچ خوراکی است (مهرپرور و همکاران، ۲۰۱۲) که نتایج تحقیق حاضر نیز موید این نکته بود.



شکل ۶- ***Lecanicillium fungicola***: نمونه‌های آلوده به حباب خشک در واحد تولیدی سرعین (**A-B**)، پرگنه روی **PDA** (**C**)، فیالیدها و فیالوسپورها (**D**). مقیاس **۱۰µm**

Cladobotryum mycophilum (Audemans) W. Gams & Hoozemans **عامل بیماری تارعنکبوتی**

پرگنه قارچ در تشتک پتری روی PDA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد رشد سریعی داشت و در مدت پنج روز تشتک پتری نه سانتی‌متری را پر نمود و با رشد اندام‌های هوایی اسپورزایی کرده و بعد از مدت یک هفته، مواد رنگی صورتی مایل به قرمز در محیط کشت ترشح شد. در این قارچ، کنیدیوم‌ها به‌صورت ایستاده، بی‌رنگ و شفاف بودند که از میسلیوم‌های هوایی خارج شده و به‌صورت فراهم منشعب می‌شدند. انشعابات کنیدیوفورها به دسته‌های ۵-۳ تایی از فیالیدها (انگشتک‌ها) که به طرف انتها باریک می‌شدند، ختم می‌گردید. کنیدیوم‌ها در نوک انگشتک‌ها به صورت انفرادی یا چندتایی تشکیل می‌شدند. این کنیدیوم‌ها شفاف، بی‌رنگ و چند سلولی (معمولا یک تا چهار سلولی) به شکل تخم‌مرغی تا مستطیلی بودند (شکل D-۷). اندازه کنیدیوم‌ها ۹/۹-۶/۶×۲۸/۶-۲۲ میکرون و اندازه فیالیدها بین ۴/۵-۴×۴۲-۳۴ میکرون متغیر بود. با توجه به منابع موجود و کلید مصور گمس و هوزمنز (۱۹۷۰)، قارچ عامل بیماری، گونه *Cladobotryum mycophilum* تشخیص داده شد. در بین جدایه‌های به دست آمده در این پژوهش، تعداد چهار جدایه به گونه *C. mycophilum* تعلق داشت و ۱۰۰٪ با برخی جدایه‌های موجود در بانک ژن از جمله با راس-شمار JF693809.1 مشابهت نشان داد. توالی جدایه‌ای از این گونه قارچی که از واحد تولیدی مشگین‌شهر به دست آمده بود، با شماره دسترسی KX944693 در بانک ژن ثبت شد.



شکل ۷- ***Cladobotryium mycophilum***: نمونه‌های آلوده به بیماری تارعنکبوتی در مرکز پرورش (**A-B**)، پرگنه روی **PDA** (**C**)، فیالیدها و فیالوسپورها (**D**). مقیاس **۲۰µm**.

این بیمارگر انگل اختیاری بوده و در خاک پوششی و روی اندام‌های قارچ‌های دکمه‌ای رشد و نمو می‌کند. میسلیوم بیمارگر ابتدا به رنگ سفید، سپس به رنگ زرد و در نهایت با اسپورزایی شدید به رنگ صورتی مایل به قرمز در سطح بسترهای آلوده مشاهده می‌شود. اولین علایم در بسترهای کشت با گسترش رشته‌های سفید کرکی بوده که با نابود کردن همه اندام‌های قارچ خوراکی در محدوده گسترش، نمایان می‌شود (محمدی-

گل‌تپه و همکاران ۱۳۷۸). در برخی سال‌ها این بیماری یکی از عوامل مهم خسارت‌زا در واحدهای تولیدی برخی مناطق کشور به شمار می‌رود. در مرحله پیشرفته بیماری، توده میسلیوم قارچ انگل، پایه، تیغه و کلاهک قارچ خوراکی را آلوده کرده و سرانجام آن را متلاشی می‌کند و میسلیوم‌ها به‌صورت رشته‌هایی از آن آویزان می‌شوند. به همین علت، این بیماری به بیماری تار عنکبوتی معروف شده است. بیماری تار عنکبوتی اولین بار توسط محمدی‌گل‌تپه و همکاران (۱۳۷۸) گزارش گردیده است. گونه *C. mycophilum* به‌عنوان گونه غالب عامل بیماری تار عنکبوتی از برخی کشورها از جمله کره و اسپانیا گزارش شده است (بک وهمکاران ۲۰۱۰). این گونه توسط زارع و آصف از پنج گونه قارچ کلاهکدار از استان‌های مازندران و گلستان (زارع و آصف ۱۳۸۷) و در سال ۱۳۷۹ از بستر پرورشی قارچ دکمه‌ای توسط محمدی گل تپه و همکاران (۱۳۸۹) گزارش شده است. سطح مرطوب قارچ خوراکی، رطوبت بالای سالن‌های کشت، مرطوب بودن خاک‌های پوششی، تهویه و جریان نامناسب هوا در سالن‌های کشت از عوامل مهم توسعه بیماری می‌باشند.

به‌طور کلی به قارچ‌هایی که روی سایر قارچ‌ها به شکل پارازیت یا ساپروفیت زندگی می‌کنند، اصطلاحا قارچ‌های قارچزی (fungicolous fungi) اطلاق می‌شود و در بین آنها گونه‌های متعلق به جنس *Hypocrea* و *Hypomyces* از متداول‌ترین آنها به‌شمار می‌روند. اغلب قارچ‌های بیماری‌زای قارچ دکمه‌ای سفید (*Lecanicillium*، *Trichoderma* و *Cladobotryum*) از مراحل غیرجنسی این دو جنس به شمار می‌روند. با توجه به این که بیماری‌های قارچی باعث کاهش شدید عملکرد، افت شدید کیفیت و کاهش بازارپسندی محصول و در نتیجه سبب پایین آمدن بازده اقتصادی تولید می‌گردند، لذا توجه جدی به مقوله شناسایی به‌موقع این عوامل بیماری‌زا و اتخاذ راهکارهای کنترلی آنها اهمیت فراوانی دارد.

با توجه به فعالیت چندین واحد تولید قارچ دکمه‌ای در استان اردبیل و وجود برخی خسارت‌های کمی و کیفی ناشی از آلودگی‌های قارچی در این واحدها و عدم وجود مطالعات دقیق در این خصوص، در تحقیق حاضر، عوامل قارچی بیماری‌زا در واحدهای تولیدی برخی از شهرهای استان اردبیل شامل اردبیل (دو واحد)، نمین، سرعین، مشگین‌شهر و پارس‌آباد مطالعه و تا حد گونه مورد شناسایی قرار گرفتند. جدایه‌ها پس از خالص‌سازی براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی‌یابی ناحیه ITS مورد شناسایی قرار گرفتند.

بر اساس نتایج، قارچ بیماری‌زای غالب، *Lecanicillium fungicola* عامل بیماری حباب خشک با ۳۵ جدایه بود، در حالی‌که به اشتباه در بین تولید کنندگان استان، این نوع علایم، حباب تر تلقی می‌شد. به نظر می‌رسد این موضوع در پیشگیری و کنترل بیماری در واحدهای پرورشی نقش مهمی ایفا نماید. این بیماری در اغلب واحدهای تولیدی استان اردبیل مشاهده شد. گونه *L. fungicola* در سایر مناطق ایران نیز پراکنش بالایی دارد (زارع و خباز، ۱۳۸۴). قارچ بیماری‌زای دوم از لحاظ شیوع، عامل کپک سبز بود که در هر شش واحد مورد بررسی مشاهده شد. دو گونه *Trichoderma harzianum* و *T. virens* (هر کدام ۱۰ جدایه) عوامل عمده مولد کپک سبز بودند که با نتایج گزارش‌های پیشین در سایر استان‌ها مطابقت دارد (ظفری و همکاران ۱۳۸۱). قارچ *Mycogone perniciosa* عامل بیماری حباب تر با ۱۳ جدایه در رتبه سوم و *Cladobotryum mycophilum* عامل بیماری تار عنکبوتی با چهار جدایه در رتبه چهارم از لحاظ فراوانی قرار دارد. بیمارگر اخیر باعث از بین رفتن کامل قارچ می شود. این بیماری نیز از برخی مناطق از جمله تهران با فراوانی کمتر دیده شده است (زارع و خباز ۱۳۸۴). در این مطالعه، تمام ۵ گونه قارچی برای اولین بار از استان اردبیل گزارش می‌شوند. یکی از نکات جالب توجه این بود که بیماری حباب تر در مناطق سردسیر استان مانند نمین و مشگین‌شهر دیده می‌شد و در نمونه‌های جمع‌آوری شده از مناطق گرمسیری استان مانند پارس‌آباد علایمی از بیماری حباب تر مشاهده نشد. پس از شناسایی دقیق عوامل قارچی موثر در کاهش کمی و کیفی محصول قارچ دکمه‌ای سفید در استان

اردبیل و فراوانی آنها، راه برای اتخاذ راهکارهای مدیریتی این نوع بیماری‌ها هموار می‌شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مراتب قدردانی خود را از دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر تامین بودجه لازم برای انجام این پژوهش و سازمان جهاد کشاورزی استان اردبیل بابت هماهنگی و مساعدت در نمونه‌برداری از واحدهای تولیدی استان ابراز می‌نمایند.

منابع

بختیاری م، ۱۳۷۷. بررسی بیولوژی و کنترل شیمیایی بیماری ورتیسیلیومی (حباب خشک) قارچ *Agaricus bisporus* پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

بی‌نام، ۱۳۹۴. آمارنامه کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، معاونت برنامه‌ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات، محصولات باغبانی، ۱۰۰ صفحه.

جمالی قهدریخانی م، ۱۳۸۰. بررسی بیماری حباب تر قارچ خوراکی دکمه‌ای *Agaricus bisporus* و تاثیر چند عصاره گیاهی در کنترل آن. پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

جمالی قهدریخانی م، محمدی گل تپه الف، علی‌حسین‌زاده مقدم ف نساج حسینی م و محمدی ع، ۱۳۹۳. بیماریزایی *Mycogone perniciosa* عامل بیماری حباب تر قارچ خوراکی دکمه‌ای در ایران. بیماریهای گیاهی، جلد ۵۰، شماره ۴، صفحه‌های ۳۵۹ تا ۳۶۸.

رضائی دانش ی، محمدی گل تپه، الف و روحانی ح، ۱۳۸۰. شناسایی گونه‌های تریکودرمای مولد کپک سبز در واحدهای تولیدی قارچ خوراکی دکمه‌ای، پراکنش و فراوانی نسبی آنها. آفات و بیماریهای گیاهی. جلد ۶۹. صفحه‌های ۸۳ تا ۱۰۹.

زارع ر و آصف، م ر، ۱۳۸۷. مطالعه برخی گونه‌های قارچ‌های فیالیددار قارچزی از سواحل جنوبی دریای خزر. جلد ۹، شماره ۱، صفحه‌های ۱ تا ۲۲.

زارع ر و خبازجلفایی ح، ۱۳۸۴. قارچ‌های جدا شده از *Agaricus bisporus* در استان تهران وگزارشی از وضعیت *Vertcillium fungicola* در ایران. مجله رستنیها. جلد ۶: صفحه‌های ۶۲ تا ۶۸.

زرگرزاده ژ، محمدی‌گل‌تپه الف، رضایی دانش ی و مهرپرور م،۱۳۹۰. شناسایی گونه‌های کپک سبز در مزارع قارچ خوراکی دکمه‌ای با استفاده از روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی ، مجله رستنیها،جلد ۱۲، صفحه‌های ۸۳ تا ۹۰.

ظفری د، ارشاد ج، زارع ر و علیزاده ع، ۱۳۸۱. تحقیقی در زمینه شناسایی گونه‌های *Trichoderm* در ایران، فصلنامه بیماری‌های گیاهی، جلد ۳۸، شماره‌های ۱و۲، صفحه‌های ۲۱ تا ۴۵.

علی‌حسین‌زاده‌مقدم ف، ۱۳۹۰. بررسی موفولوژی، فیزیولوژی تنوع ژنتیکی گونه‌های قارچ *Mycogone* در استان‌های تهران و البرز، پایان‌نامه کارشناسی ارشد گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

محمدی گل تپه الف، محمدزاده پاشا الف، علیزاده ع، ۱۳۷۸. بیماری تار عنکبوتی قارچ خوراکی دکمه ای در ایران و مدیریت آن. آفات و بیماریهای گیاهی، جلد ۶۸، شماره‌های ۱-۲ صفحه‌های ۸ تا ۱۱.

محمدی گل‌تپه الف، پورجم الف، ۱۳۸۹. اصول پرورش قارچ‌های خوراکی. تهران. انتشـارات دانشـگاه تربیـت مـدرس. چاپ ششم. ۶۲۶ صفحه.

Arnold, GRW and Yurchenko EO, 2007. The first contribution on fungi from Belarus. Mycena, 7: 4-19.

Back CG, Kim YH, Jo WS, Chung H and Jung HY, 2010. Cobweb disease on *Agaricus bisporus* caused by *Cladobotryum mycophilum* in Korea. J Gen Plant Pathol. 76: 232-235.

Bhatt N and Singh RE, 2000. Incidence and losses in yield by fungal pathogens encountered from the beds of *A. bisporus*. Indian Journal of Mushroom, 18: 46-49

Bissett J, 1991. A. revision of the genus *Trichoderma.* II. Infrageneric classification. III. Section Pachybasium IV. Additional notes, on section longibrachiatum. Canadian Jounal of Botany, 62: 2357-2420

Collopy PD, Largeteau-Mamoun ML, Romaine CP and Royes DJ, 2000. Molecular phylogenetic analyses of *Verticilium fungicola* and related species causing dry bubble disease of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus.* Phytopathology, 91: 905-912.

Davari M, Wei SH, Babai-Ahari A, Arzanlou M, Waalwijk C, van der Lee TAJ, Zare R, Gerrits van den Ende AHG, de Hoog SG and van Diepeningen AD, 2013. Geographic differences in trichothecene chemotypes of *Fusarium gramineamru*m in the Northwest and North of Iran. World Mycotoxin Journal, 6(2): 137-150.

Domsch KH, Gams W and Anderson TH, 1980. Compendium of soil fungi. Vol. 1. London: Academica, 21: 859-865.

Fletcher JT and Ganney GW, 1968. Experiment on the biology and control of *Mycogone perniciosa* Magn. Mushroom Science, 7: 221-237.

Gams W and Hoozemans AC. 1970. *Cladobotryum*-konidien formen von hypomyces-Arten. Persoonia, 6: 95-110.

Glamoclija J, Sokovic M, Vukojevi, J, Milenkovic I and van Griensven L. 2008. Morphological characteristics and mycelial compatibility of different *Mycogone perniciosa* isolates. Journal of Microscopy,232: 489-492.

Largeteau ML, Baars JP P, Recognault-Roger C and Savoie, JM. 2006. Molecular and physiological diversity among *Verticillium fungicola* var *fungicola*. Mycological Research, 110: 431-440.

Mehrparvar M, Mohammadi Goltapeh E and Safaie N, 2012 Evaluation of genetic diversity of Iranian *Lecanicillium fungicola* isolates using URP marker. Journal of Crop Protection, 1 (3): 229-238.

Moller EM, Bahnweg G and Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nuclear Acid Research, 20: 6115-6116.

Rifai MA, 1969. A revision of genus *Trichoderma*. Commonwolth Mycologycal institute, Pap. 116-156.

Seaby D, 1996. Investigation of the epidemiology of green mold of mushroom (*Agaricus bisporus*) compost caused by *Trichoderma harizianum*. Plant Pathology, 45: 913-923.

Sharma SR and Kumar S, 2000. Studies on wet bubble disease of white button mushroom (*Agaricus bisporus*) caused by *Mycogone perniciosa*. Balkema.12: 569-612.

Zare R and Gams, W, 2008. A revision of the *Verticillium fungicola* species complex and affinity with the genus *Lecanicillium*. Mycological Research, 112: 811- 824.

Glamolija J, Sokovi M, Ljaljevi Grbi M, Vukojevi J, Milenkovi I and Van Griensven L, 2008. Morphological characteristics and mycelia compatibility of different *Mycogone perniciosa* isolates. Journal of Microscopy, 232: 489-492

White TJ, Bruns TD, Lee SB and Taylor JW, 1990. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). PCR protocols: a Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, CA. pp 315-322

Morphological and Molecular Identification of Common Pathogenic Fungi in White Button Mushroom (*Agaricus bisporus*) Production Units in Ardabil Province

M Davari[1], A Shahriar[2], M Behnamian[3], S Dezhsetan[4] and F Alihosseinzadeh-Moghaddam[5]

[1]Associate Prof., Department of Plant Protection, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
[2]Former MSc. Student of Horticultural Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
[3]Assistant Prof., Department of Horticultural Science, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
[4]Associate Prof., Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohahegh Ardabili, Ardabil, Iran.
[5]MSc of Plant Pathology, Department of Plant Pathology, Tarbiat Modares, Tehran, Iran.
*Correponding author: mdavari@uma.ac.ir

Received: 16 April 2018 Accepted: 15 November 2016

Abstract

Due to the importance of white button mushroom as a source of food and protein, the identification and control of its diseases are taken into consideration in the world. In Ardabil province, there are several mushroom production units. In this research, infected samples were collected from Ardabil, Namin, Sarein, Meshginshahr and Pars-Abad mushroom farms. After isolation and purification of fungicolous fungi from infected mushrooms and casing soil, macroscopic and microscopic features including colony characteristics on MEA/PDA and conidium/conidiophore size and shape were used for tentative-identification of isolates using valid keys. The results were confirmed by sequencing of ITS-rDNA region. In this study, among 72 fungal isolates, *Lecanicillium fungicola*, causal agent of dry buble, *Trichoderma harizianum* and *T. virense* causal agents of green mold, *Mycogone perniciosa* causal agent of wet bubble, and *Cladobotrium mycophilum* causal agent of cobweb were identified with 49, 18, 14, 14 and 5% frequency, respectively. This is the first study on mycopathogens of button mushroom in Ardabil province. The results may help to prevent and control the mycopathogenic fungi in button mushroom production units after additional research.

Keywords: *Agaricus bisporus*, Lecanicillium, Mycogone, Trichoderma, Cladobotrium.