

بیماری‌زایی *Mycogone perniciosa* عامل بیماری حباب‌تر قارچ خوراکی دکمه‌ای در ایران\*

## PATHOGENESIS OF *MYCOGONE PERNICIOSA* THE CAUSAL AGENT OF WET BUBBLE OF WHITE BUTTON MUSHROOM IN IRAN

مصطفی جمالی<sup>۱</sup>، ابراهیم محمدی گل تپه<sup>۱\*</sup>، فاطمه علی حسین زاده مقدم<sup>۱</sup>، سید محسن نساج  
حسینی<sup>۱</sup> و عرفان محمدی<sup>۲</sup>

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۶/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۷/۶)

### چکیده

قارچ *Mycogone perniciosa* عامل بیماری حباب‌تر قارچ خوراکی دکمه‌ای *Agaricus bisporus*، بسیار مسری بوده و منجر به کاهش شدید محصول می‌شود. در این تحقیق بیماری‌زایی عامل بیماری حباب‌تر و وقوع تغییرات ظاهری و ساختمانی بافتها از نقطه نظر ریخت شناسی (مورفولوژی) مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات با استفاده از میکروسکوپ نوری و میکروسکوپ الکترونی نگاره انجام و شیوه بیماری‌زایی قارچ، همچنین تغییرات به وجود آمده در بافت میزبان بررسی شد. نتایج نشان داد چسبیدن بیمارگر و نفوذ به بافت میزبان، طی مراحل توسعه اندامهای باردهی (کلاهکها) انجام می‌شود. این مایکوپاتوزن موجب تغییرات سلولی شدید در بافت میزبان می‌شود. ریشه میزبان در تقابل با ریشه بیمارگر دچار تغییرات شدیدی می‌شود که با عدم تمایز، بزرگ شدن بیش از حد، گره دار شدن و واکنش تغییرات هیپرپلازی همراه است. تراوش توده مایع خارج سلولی ناشی از فعالیت باکتریهای تخمیرکننده (Putrifying)، منجر به پدیده قطره اشک (Tear drop) در سطح قارچ خوراکی می‌شود. وقتی اندامهای باردهی اولیه آلوده می‌شوند، توده قارچی خوراکی تشکیل شده خیلی نامنظم، بزرگ و حالت توموری شکل توسعه پیدا می‌کند و هیچگونه علائم تمایز سلولی و تشکیل اندامهای باردهی در قارچ خوراکی دیده نمی‌شود. بنظر می‌رسد ساختمان ریشه بیمارگر ضمن نفوذ به بافت میزبان، هیچگونه تغییری نمی‌کند اما منجر به تغییرات شدید سلولی در بافت میزبان خود شده و در نهایت سبب لیز شدن میزبان می‌گردد.

کلیدواژه: حباب تر، قارچ خوراکی دکمه‌ای، باکتری‌های تخمیرکننده، قطره اشک، بیماری‌زایی

\* بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

\*\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیک: emgoltapeh@yahoo.com و emgoltapeh@modares.ac.ir

۱- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، استاد بیماری شناسی گیاهی، دانشجویان سابق بیماری شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس

۲- بخش قارچ های خوراکی و دارویی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

## مقدمه

بیمارگر قارچی *Mycogone perniciosa* یکی از مهمترین بیماریهای قارچ خوراکی، بیماری حباب تر (Wet bubble) می باشد که بنام های La Mole, White Mould و بیماری مایکوگون نیز نامیده می شود. اطلاعات درمورد جنبه های مختلف این بیماری در ایران محدود و گزارشهای پراکنده است. تلئومورف عامل بیماری به جنس *Hypomyces* تعلق دارد (Cagnolati, 1995). طبق مطالعات اسمیت (Smith, 1924) اولین ثبت علمی این بیماری که توسط گونه های *Mycogone* ایجاد می شود، توسط کوک و مگنوس انجام شد اگرچه این قارچ بیماریزا در آن زمان گونه اختصاصی (Species-Specific) نداشت، ولی بنظر میرسد هرجایی از جهان که قارچ *A. bisporus* کشت می شود بیماری نیز وجود داشته باشد (Umar et al., 2000 ; Brady and Gibson, 1976 ; Sohi and Grewal, Fletcher et 1987 ; Zehi et al., 1995 ; Pathak, 1998 al., 1995).

عکس العمل متقابل *A. bisporus* میزبان با *M. perniciosa* بیمارگر منجر به تغییرات قابل مشاهده در میزبان می شود. اندامهای باردهی *A. bisporus* بصورت غیرعادی رشد کرده و نمود ماکروسکوپیکی پیدا می کند و بوضوح دیده می شود (Umar and Van Griensven, 1999). طی سالهای ۹۹-۱۹۹۷ ظهور شیوع بیماری در کشت و صنعتهای مختلف مناطق هیمالچال پیرداش و هاریانا بین ۵-۱۰۰ درصد گزارش شده است. بیشترین میزان بیماری ۱۰۰٪ در ساپرون، ۸۰٪ در بیلاسپور و ۷۰-۶۰ درصد در سولان و کوه های مورنی بوده است (Sharma and Kumar, 2000). بسته به طغیان بیماری حتی در مکانهایی هم که بیماری شایع نبوده رخ داده و بارها موجب خسارت اقتصادی قابل ملاحظه ای در هندوستان و

هند گردیده است (Sharma and Kumar, 2000 ; Umar et al., 2000).

در ایران وضعیت این بیماری روی قارچ های خوراکی برای اولین بار توسط محمدی گل تپه و کاپور (۱۹۹۰) گزارش گردیده و در حال حاضر نیز سبب خسارت بالایی در کشت و صنعت های قارچ خوراکی است محمدی گل تپه و پورجم (۲۰۱۰). هدف از این تحقیق بررسی مکانیسم بیماریزایی قارچ بیمارگر می باشد.

## روش بررسی

### آزمون بیماریزایی

در این مطالعه از کلاهک های قارچ *A. bisporus* که در شرایط کنترل شده رشد کرده بودند (دما، رطوبت، دی اکسید کربن و اکسیژن) علائم بیماری را نشان می دادند استفاده شد. بیمارگر (*Mycogone perniciosa*) از ۲۰۰ نمونه جمع آوری شده، جداسازی و خالص سازی شدند. جهت اجرای اصول کخ، سوسپانسیون آبی اسپور ( $10^5$  cfu/ml) تهیه شد و در شرایط کنترل شده سالن های کشت بخش قارچ های خوراکی و دارویی دانشگاه تربیت مدرس آزمون بیماریزایی انجام گردید. جداسازی مجدد عامل بیماری از کلاهکهایی که علائم بیماری را نشان می دادند روی محیط کشت PDA ۲٪ انجام گردید. قارچ عامل بیماری جداسازی وبا استفاده از کلید های شناسایی *M. perniciosa* تشخیص داده شد (Fletcher et al., 1995). برای مشاهده پدیده هایی چون کلنیزه کردن پارازیتسم، پیچش دور ریشه ای، آنتی بیوز و نیز لیز کردن آزمایشها به شرح ذیل انجام گردید:

**الف-** روش کشت متقابل قارچ *A. bisporus* و

جدایه‌های قارچ *M. perniciosus* در تشتک حاوی محیط کشت مالت آگار (MEA) ۲٪ (شرکت لیوفیلکم ایتالیا) انجام گردید. MEA حاوی قند‌های آلی سهل الوصول است که در مسیر فیزیولوژیک قارچ بیمارگر سیستم بیان ژن‌های بیماری‌زایی و مخصوصاً کیتینازها را بلوکه می‌کند. این محیط پس از تهیه و استریل شدن در تشتکهای ۹ سانتیمتری ریخته شد. سپس با توجه به کند بودن رشد میسلیم قارچ خوراکی، در ابتدا در یک طرف تشتک قرصهایی به قطر پنج میلیمتر بطور معکوس کشت شد و پس از انکوباسیون در دمای  $1 \pm 25^\circ\text{C}$  درجه سانتیگراد به مدت ۳-۴ روز، در طرف مقابل اقدام به کشت دیسکهای پنج میلیمتری جدایه‌های بیمارگر (مایکوگون ۷ روزه) از محیط کشت تازه گردید و تشتکها در دمای  $1 \pm 25^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس (سانتیگراد) مجدداً انکوبه شد. پس از رسیدن ریشه‌های دو قارچ (عامل بیماری‌زا و میزبان) به یکدیگر، نحوه تاثیر بیمارگر بر میزبان بررسی گردید. در سری دوم آزمایشها قبل از ریختن محیط کشت به درون تشتک ابتدا در وسط تشتکها لام استریلی قرار داده شد و سپس محیطهای تهیه شده بصورت لایه نازکی در تشتکها ریخته شد تا یک لایه ظریف روی لامها را بپوشاند. سپس در یک طرف لام دیسکی به قطر پنج میلی‌متر از محیط کشت قارچ خوراکی ۱۴ روزه بطور معکوس کشت گردید و تشتکها به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $1 \pm 25^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس انکوبه شد. پس از این مدت در طرف مقابل لام به فاصله سه سانتیمتر از دیسک کشت شده، دیسکی به قطر پنج میلیمتر از جدایه‌های انتخاب شده قارچ مایکوگون مایه‌زنی شد و مجدداً تشتکها در دمای  $1 \pm 25^\circ\text{C}$  درجه سلسیوس قرار داده شدند. با گذشت حدود ۳-۴ روز و رسیدن ریشه‌های دو قارچ به یکدیگر لامها برداشته و در زیر استریو میکروسکوپ و رنگ آمیزی و یا بدون عمل رنگ آمیزی

جهت پدیده‌هایی چون پیچش دور ریشه ای و یا تماس ریشه ای بررسی گردیدند. با گذشت حدود ۷-۱۰ روز نیز این لامها جهت بررسی امکان لیز شدن میسلیم قارچ خوراکی توسط عامل بیماری‌زا بررسی گردیدند (Mumponi et al., 1997).

ب- تثبیت و تهیه مقاطع برای بررسیهای هیستوپاتولوژیک با میکروسکوپ نوری:

نمونه‌های آلوده وسالم به مدت ۲۴ ساعت در محلول فرمالین- اسید استیک- الکل (FAA) تثبیت شدند پس از شستشو در سری اتانول آبگیری و از سری پارافین- زایلول (Parafin-Xylol) درصد گذرانده شدند و در پارافین (با نقطه ذوب ۵۸-۵۰ درجه سانتیگراد) قرار داده شدند. از بلوک‌های پارافین مقطعی به قطر ۷-۱۰ میکرومتر بوسیله میکروتوم دوار دستی (مدل) تهیه شد. مقاطع پارافین بر روی اسلایدهای آغشته به چسب هاپت (Haupt) منتقل شدند. اسلایدها در دمای ۳۵-۴۰ درجه سلسیوس خشک گردیدند (Dnyansagar, 1986). مقاطع در محلول یک درصد سافرانین-او در ۳۰٪ اتانول به مدت ۱۵-۲۰ دقیقه و در محلول یک درصد متیلن بلو آبی بمدت ۳-۶ دقیقه رنگ‌آمیزی شدند (Dhingra and Sinclair, 1995) و بوسیله میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفتند.

ج- آماده سازی نمونه‌ها و تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی اسکن (SEM)

در بررسیهای میکروسکوپ الکترونی اسکن، بالاخص مشاهده تعامل ریشه‌های قارچ *M. perniciosus* با ریشه قارچ *A. bisporus* از روش کینگ و براون (King and Brown, 1983) با اندکی تغییرات استفاده شد. در این روش نمونه‌ها با تتراکسید اسمیوم (Osmium tetroxide (Oso4)) دو درصد به مدت دو ساعت تثبیت شده، سپس نمونه‌ها بمدت چند دقیقه در معرض بخار آب قرار گرفته،

آنگاه طی فرایند آبیگری وی-دی-دی { Diffusion Dehydration Vaper (V.D.D) } انجام شده توسط کینگ و براون، آبیگری شدند. در این تحقیق به منظور آماده سازی نمونه ریشه قارچ (میزبان، بیمارگر و هردو همزمان) برای تهیه تصاویر میکروسکوپ الکترونی اسکن، از روش دیگری استفاده شد. به منظور تهیه قطعاتی مناسب از مجموعه ریشه های قارچ بیمارگر و قارچ خوراکی دکمه ای، قبل از ریختن محیط کشت درون تشتکها لامهای میکروسکوپی برش داده شده به چهار قسمت تقسیم شدند. تعدادی از این قطعات درون تشتکها قرار گرفته، استریل شده، آنگاه محیط کشت به تشتکها اضافه گردید. بدنبال اضافه کردن قارچ بیمارگر و قارچ خوراکی به محیط پس از حدود یک هفته و رشد ریشه ها در سطوح مختلف تشتک و تلاقی ریشه ها، قطعات لامهای بریده شده به همراه محیط کشت و مجموعه قارچهای عامل بیماری و قارچ میزبان، از محیط جدا شدند. سپس با تهیه محفظه ای از فویل آلومینیومی، نمونه ها درون این محفظه ها قرار گرفته و سپس محفظه کاملاً مسدود گردید. در مرحله بعد هر کدام از این قطعات بمدت ۷۵-۴۵ ثانیه بر اساس ضخامت نمونه، درون ازت مایع ۱۹۶- درجه سانتیگراد قرار گرفتند. پس از طی مدت زمان لازم و خارج کردن نمونه ها از ازت مایع محفظه ها باز شده، نمونه ها بیرون آورده شدند. آنگاه نمونه ها روی استاب های ویژه میکروسکوپ منتقل گردیده و با مقدار بسیار کمی چسب روی استاب ها چسبانده شدند. سپس استاب ها به دستگاه پوشش دهنده طلا (Sputter coater) مدل SCD005 منتقل شده و سطح نمونه ها توسط طلا پوشش داده شد. پس از اضافه کردن پوشش طلا، نمونه ها خارج شده ارتباط بین ریشه های قارچ قرار گرفته روی قطعات لام بریده شده و پایه استاب توسط چسب نقره برقرار گردید. سپس نمونه ها

به محفظه ویژه میکروسکوپ الکترونی فیلیپس مدل XL30 منتقل شده آنگاه تصاویر با حالت های مختلف ۱۰، ۱۲، ۱۵، ۲۰ KV مورد بررسی قرار گرفتند. در خصوص تثبیت و آماده سازی اندامهای باردهی آلوده و سالم قارچ خوراکی برای میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM)، نمونه ها در گلو تار آلد هید دو درصد در بافر فسفات 0.2 M (pH=7.2) در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت غوطه ور شدند. پس از تثبیت نمونه ها در بافر شستشو و برای بار دوم در محلول یک درصد آبی اسمیوم تتراکسید (OsO4) به مدت دو ساعت تا یک شب تثبیت و سپس مجدداً در بافر شستشو شدند، یا اینکه نمونه ها به مدت پنج روز در فرمالین- پروپیونیک اسید- الکل (FPA) تثبیت شدند (Bauer et al., 1997). نمونه ها در سری اتانول آبیگری و بوسیله دستگاه Sputter coater مدل SCD005 پوشش طلا داده شد و بوسیله میکروسکوپ الکترونی نگاره فیلیپس مدل XL30 در ۲۵ کیلو ولت بررسی گردیدند. در هر نمونه سه قطعه مورد بررسی قرار گرفت.

## نتیجه

### علائم ظاهری و تغییرات بافتی

در همه آزمایشها مایه زنی با قارچ بیمارگر *M. perniciosa* باعث ایجاد تغییرات شدید پاتولوژیکی در کلاهکهای قارچ خوراکی دکمه ای *A. bisporus* شد که این تغییرات معمولاً پس از یک دوره کمون یک تا سه روزه اتفاق می افتاد. به حالت توموری شکل (dry bubble and wet bubble) اسکلوئیدی اطلاق می شود. این تغییرات شامل عدم تمایز اندامهای اولیه قارچ (پین ها)، هیپرپلازی اندام باردهی و ایجاد حالت اسکلوئیدی (Sclerodermoid) و عدم تمایز و تکامل در

تمام کلاهکهای آلوده و تر جذابیت زیادی به مگس های فوریده قارچ خوار از خود نشان می‌دهند. کلاهکهای مایه زنی شده با *M. perniciosus* پس از حدوداً شش روز، با انواع باکتریها آلوده می‌شوند که این باکتریها باعث اضمحلال و مرگ قارچ می‌شوند (محمدی گل تپه و پورجم ۱۳۸۹). در اغلب موارد علائم شدیدی از تخمیر و تجزیه شدن در حدود روزهای دهم تلقیح اسپورهای قارچ بیمارگر مشاهده شد. معمولاً زخمها از یک مکان شروع شده و سریعاً به هم پیوسته شده و همه کلاهک را در بر می‌گیرد. گاهی پوشش کتانی و پنبه‌ای شکل *M. perniciosus* در روی سطح اندامهای قارچ دیده شد. بهرحال هیچ قارچ خوراکی سالمی در هیچیک از چهار تکرار آزمایش جدایه های کند رشد مشاهده نگردید (شکل ۲). این مشاهده به این نکته اشاره دارد که ممکن است جدایه های کند رشد قدرت بیماریزائی بیشتری را نسبت به جدایه های تند رشد دارا باشند (محمدی گل تپه و پورجم ۲۰۱۰).

### مقایسه بافتهای آلوده و سالم

در این مطالعه از تکه های یک سانتی متری کلاهکهای سالم و آلوده استفاده شد. ضمن برشهایی که ایجاد شد بافت داخلی و بافت سطحی مورد مطالعه قرار گرفت و با یکدیگر مقایسه شد. در بافتهای آلوده در نتیجه هیپرپلازی و افزایش تعداد اندام های گرد تمایز نیافته بنام حباب ایجاد می شود که وجه تسمیه این بیماری است. (شکل ۳ و ۴). حالت تورم یاخته های میزبان همراه با تغییرات سیتوپلاسمی مشاهده می شود. هیپرتروفی، ضخیم شدن دیواره یاخته ها و پدیده لیز شدن (Lytic) مشاهده



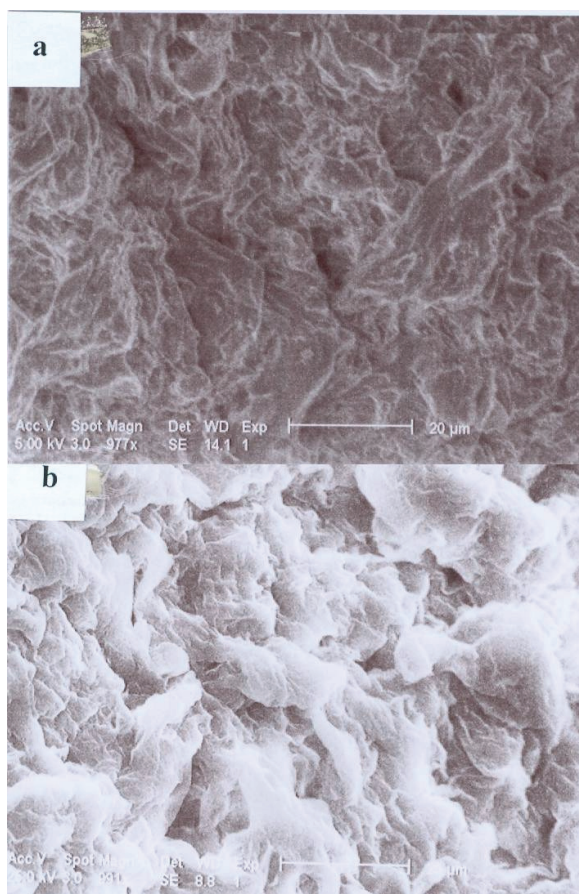
شکل ۱. بد شکلی و پدیده توده بی شکل (Sclerodermaid) همراه با پوشش سفید مایل به خاکستری قارچ عامل بیماری (a)، خروج قطرات اشک (Tear drop) از سطح کلاهک قارچ خوراکی بیمار (b)

Fig 1. Malformation and Sclerodermaid Phenomenon with White to Gray cover pathogen (a) Tear drop (b) from cap *A. bisporus*

بخش تیغه می باشد. به این علائم حباب اطلاق می شود و توده ای درهم فرورفته، نامنظم و بزرگ اندام باردهی قارچ خوراکی که تمایز پیدا نکرده و سطح آن قهوه ای و خشک بوده و گاهی شکاف و ترک در آن ایجاد می شود (شکل ۱)، در ابتدا هیچ یک از قارچهای مومیایی شده قطرات زرد کهربایی را تولید نکردند پس از مدتی قطرات زرد کهربایی در بعضی قسمتهای اندام های باردهی تولید شد. در مراحل اولیه رشد خود در زمان مایه زنی نسبت به این میکوپاتوژن عکس العمل نشان دادند و این عکس العمل مانع رشد بیشتر آنها نمی شود ولی از تمایز (Organogenesis) و تشکیل اسپور جلوگیری می شود.



موجب تغییرات شدید درون میزبان خود (قارچ خوراکی) می شود. این بیمارگر در اعماق زخمها (قسمت داخلی



شکل ۳. تصویر میکروسکوپ الکترونی اسکن از سطح داخلی بافت کلاهک قارچ *Agaricus bisporus* (a) سطح داخلی بافت سالم ۹۷۷x و (b) سطح داخلی بافت آلوده ۹۹۱x

**Fig 3. Electoronic microscopic escan(EMS) of inner tissue layer of *Agaricus bisporus* cap tissue (a) inner layer of safe tissue ×997 (b) inner layer of infection tissue ×991**

بافت های بیمار) کمتر قابل مشاهده بود و بیشتر در سطح خارجی قابل مشاهده بود. ریشه پاتوژن ظاهراً در بافت های میزبان بدون تغییر باقی می ماند. با طولانی شدن دوره آلودگی سلولهای اطراف محل آلوده به تدریج شروع به اضمحلال می کنند و پدیده لیز شدن رخ می دهد (شکل ۵). ظاهراً این قارچ قادر است وضعیت فیزیولوژیکی سلولهای بافت های میزبان را تحت تاثیر خود قرار دهد. در همه سلولهای میزبان آلوده حالت تورم مشاهده می شود. این تورم ناشی از هیپرپلازی است یعنی افزایش تعداد سلولها



شکل ۲. علائم ناشی از اسپورپاشی قارچ عامل بیماری به خاک پوششی {هیچگونه قارچ سالمی مشاهده نشد و شدت بیماری و درصد خسارت (٪۱۰۰) وارد نمود (a & b)}

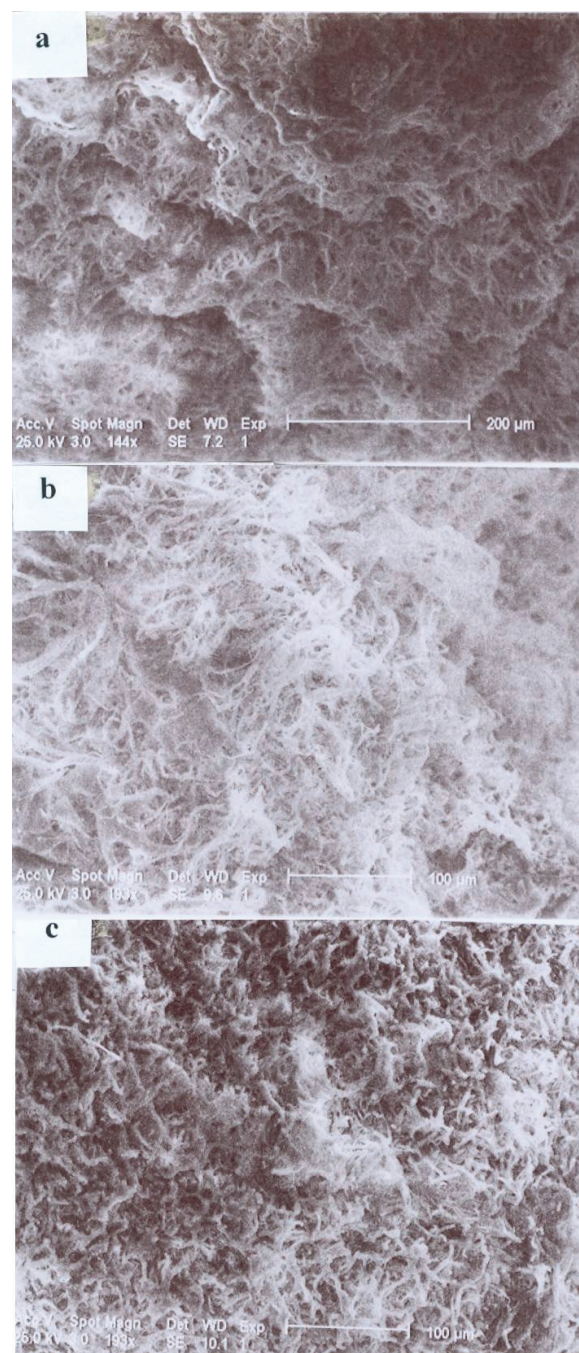
**Fig 2. Symptoms of Pathogen Sporelation {didn't observe any healthy mushroom and rate of damage was (a & b) 100%}**

می شود. قارچ *M. perniciosa* روی سطح میزبان بصورت یک توده پنبه ای شکل رشد می کند و طی چهار تا پنج روز پس از مایه زنی هر دو نوع کنیدیوم یکی دیواره نازک و شفاف بر روی کنیدی بر پنجه ای شکل (کنیدیو فورهای ورتیسیلیتی) و دیگری آلتوروسپوره های دوسلولی، دیواره ضخیم قهوه ای رنگ را تولید نمودند. مقاطع تهیه شده با کاتن بلو رنگ آمیزی شده و در زیر میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد این بیمارگر

بعلت واکنش به یک فاکتور داخلی یا خارجی. احتمالاً *M. perniciosus* موجب تحریک تولید ریشه یا قطعات ریشه‌ای می‌شود.

### نتایج تعامل عامل بیمارگر (*M. perniciosus*) و میزبان (*A. bisporus*)

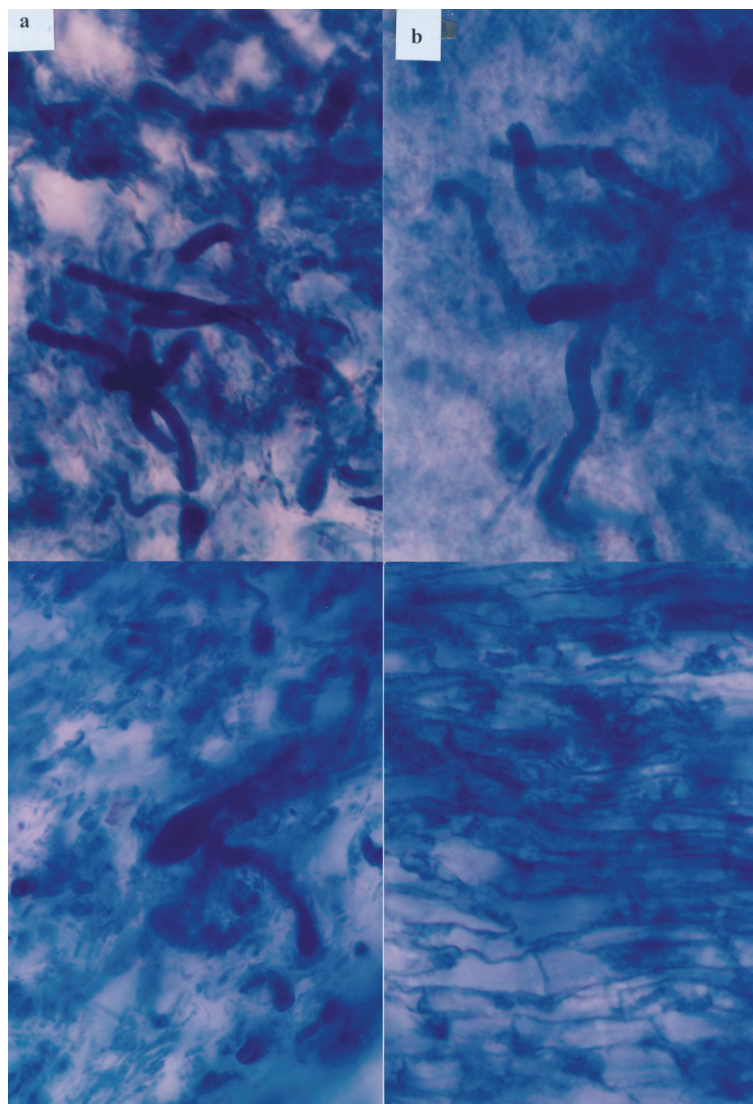
نتایج این مطالعه نشان داد که اولاً هاله بازدارنده رشدی (Zone of inhibition) در هیچیک از جدایه‌های منتخب قارچ *M. perniciosus* با میسلیم قارچ خوراکی تولید یا ایجاد نمی‌شود، ثانیاً روند ونوع عکس‌العمل منتخبین جدایه‌های قارچ *M. perniciosus* با میسلیم قارچ خوراکی *A. bisporus* در محیط کشت PDA ۲٪ درصد تفاوت دارد. جدایه‌ای که تولید آلتوروسپور فراوان می‌کرد، فقط تماس ریشه‌ای بین ریشه‌های این قارچ و ریشه‌های قارچ خوراکی مشاهده گردید و علامتی از پیچش دور ریشه‌ای و یا لیز شدن و متلاشی شدن ریشه میزبان دیده نشد (شکل ۴). در سایر جدایه‌ها، ابتدا علائم پیچش دور ریشه‌ای بر روی ریشه‌های میزبان، بطور واضح دیده شد که پس از گذشت یک هفته به نظر می‌رسید ریشه‌های میزبان متلاشی و لیز شده‌اند و ریشه‌های عامل بیماریزای درون میسلیم میزبان نیز نفوذ کرده‌اند. این پارازیت تقریباً در اطراف ریشه میزبان رشد می‌کند و به حالت سفت و محکم اطراف ریشه میزبان می‌پیچد و رشد داخل یاخته نیز در آن مشاهده می‌شود که بصورت رشد درون ریشه‌ای (Intrahyphal growth) دیده می‌شود. در محلهای تماس، ریشه قارچ *A. bisporus* متورم شده و در این قسمت *M. perniciosus* بطور آزادانه بر روی سطح ریشه قارچ خوراکی، با یک ظاهر توده کتانی پنبه‌ای (Fluffy cottony) و تولید کنیدی‌ها مشاهده می‌شود. همچنین بنظر می‌رسد



شکل ۴. تصویر میکروسکوپ الکترونی اسکن از سطح بیرونی بافت کلاهک قارچ *Agaricus bisporus* (a) بافت سالم ۱۴۴x (b) مراحل اولیه آلودگی ۱۹۳x (c) مراحل پیشرفته آلودگی ۱۹۳x

Fig4. EMS from external cap tissue of *Agaricus bisporus* (a) Healthy tissue  $\times 144$  (b) Primary stages of infection  $\times 193$  (c) Progressive stage of infection  $\times 193$





شکل ۵. چگونگی نفوذ ریشه قارچ بیمارگر *Mycogone perniciosa* به درون بافت قارچ خوراکی دکمه‌ای (a) ادامه نفوذ و ایجاد تغییرات بافتی در بافت میزبان، (b) رخ دادن پدیده لیز شدن، (c) ۴۰x، در مقایسه با بافت سالم (d) ۴۰x

**Fig5. *Mycogone perniciosa* mycelium movement in the button mushroom tissue (a) continue of penetration ×40 (b) lysing ×40, (c) incomparision with safe tissue ×40 (d)**

شامل هیپرپلازی و هیپرتروفی عامل ایجاد تورمها شده باشد و احتمالاً این تغییرات سلولی بخاطر واکنش به یک فاکتور داخلی یا خارجی است. خود ریشه میکوپارازیت ضمن نفوذ به بافتهای میزبان هیچ تغییری نمی‌کند.

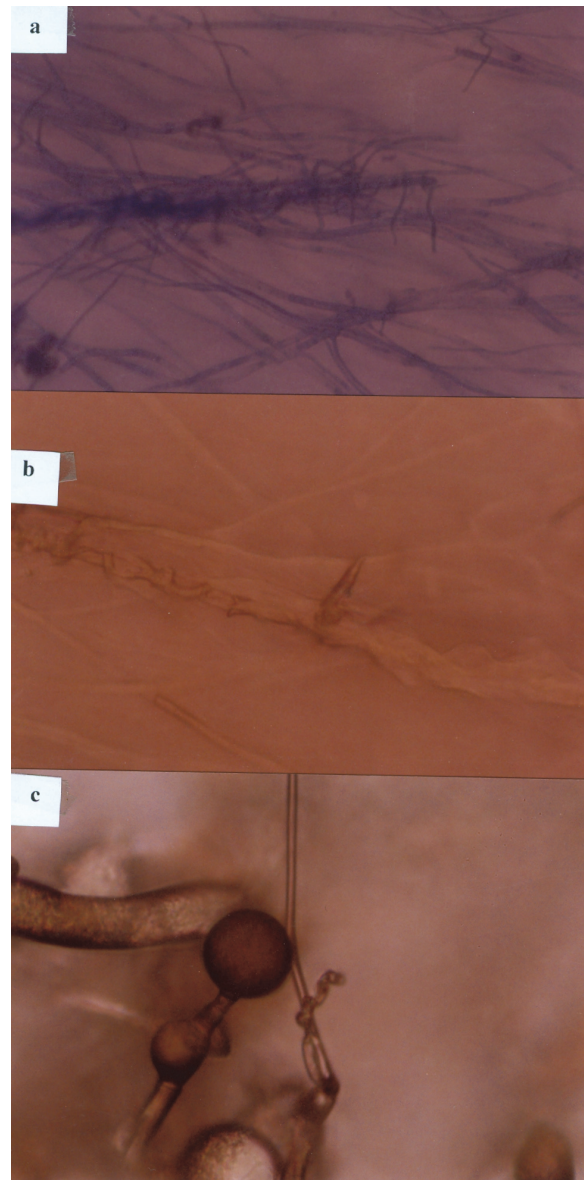
عامل بیماریزا تولید نوعی زوائد ته سنجاقی شکل (مکینه مانند) را می‌نماید که احتمالاً به درون ریشه های میزبان نیز نفوذ می‌کند (شکل ۷) و علائمی از لیز شدن و متلاشی شدن میسلیم میزبان در این حالت به چشم نمی‌خورد. در محل چسبیدن پارازیت (محل پیچش دور ریشه‌ای) ریشه میزبان متورم شده (شکل ۷) به نظر می‌رسد تغییرات سلولی



بیماری ۱۴-۱۰ روز پس از مایه زنی بسترها ظاهر شد. علائم بیماری با گزارشها کاملاً مطابقت داشت.

نتایج مشاهده و مقایسه بافتهای آلوده و سالم قارچ خوراکی با میکروسکوپ الکترونی اسکن، تغییرات بافتی شدیدی را در نمونه‌های آلوده نشان داد که این تغییرات بافتی اکثراً رشد بیش از حد بافت ناشی از هیپرپلازی می‌باشد که با مطالعات عمر و همکاران (Umar et al. 2000) هماهنگی کامل داشت. همچنین مطالعه بافتهای آلوده و سالم با میکروسکوپ نوری نیز تغییرات بافتی مشروح را نشان داد، ضمن اینکه ریشه پارازیت درون بافت میزبان بطور سالم باقی مانده و در ادامه منجر به لیز شدن بافت میزبان می‌شود. اینگونه تغییرات در مطالعات عمر و همکاران (Umar et al., 2000) نیز به چشم می‌خورد. همه انواع اندامک‌های یاخته ای بجز کلروپلاستها در سلولهای قارچی وجود دارند. عدم انجام فتوسنتز (ویژگی هتروتروف بودن سیکل زندگی) اساساً قارچها را به منابع غذایی خارجی وابسته می‌کند. برای نیل به این هدف، قارچها یک دامنه وسیعی از آنزیمهای خارج یاخته ای ترشح می‌کنند که بدنال آن ریشه می‌تواند غذا را از سوبسترای که خود یک اکوسیستم میکروبیولوژیکی در حال رشد است، جذب کند (Umar and Van Griensven, 2000).

آنالیز عناصر تشکیل دهنده دیواره میسلومی قارچ *A. bisporus* نشان داده که دیواره شامل ۳۸٪ کربوهیدراتهای ختنی، ۳۶٪ کیتین و ۱۰٪ پروتئین بوده و باقیمانده شامل ترکیبات لیپیدی می‌باشد (Novaes-lediu and Mendoza, 1981). ساختار تشکیلات دیواره میسلومهای قارچ *A. bisporus* شامل یک لایه داخلی از میکروفیبریلهای کیتین در ماتریکس بتا-گلوکان (۵۰ نانومتر) یک لایه خارجی از هیدروکسید پتاسیم محلول در گلوکان (۱۰ نانومتر) و یک

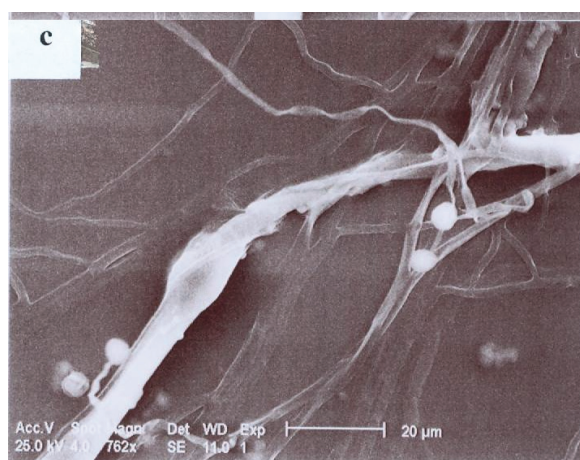
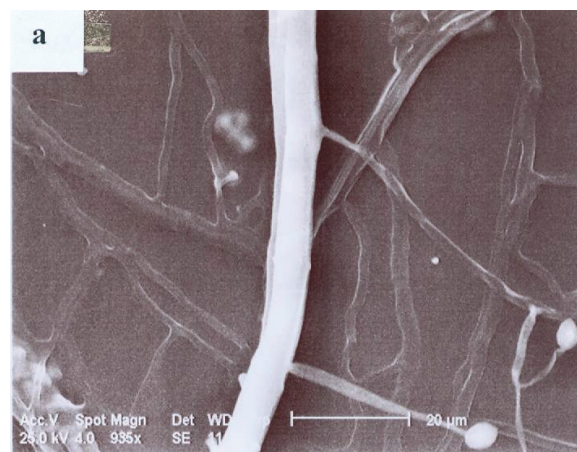
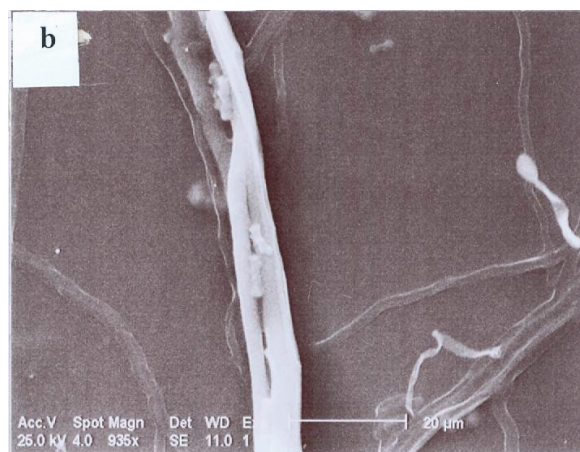


شکل ۶. عکس‌العمل متقابل میسلوم قارچ بیمارگر *Mycogone perniciosa* و قارچ خوراکی دکمه‌ای، پدیده پیچش دور ریشه ای در محیط کشت دو درصد آگار (a و b، ۲۰x)، تماس ریشه ای (c، ۲۰x)

**Fig6.** Reaction of *Mycogone perniciosa* and button mushroom, torsion phenomenon around hyphae in agar 2%(a and b,  $\times 20$ ), hyphal contact (c,  $\times 20$ )

## بحث

برای اثبات بیماریزایی و اجرای اصول کخ از روش اسپور پاشی روی خاک پوششی استفاده گردید. علائم



شکل ۷. تصویر میکروسکوپ الکترونی اسکن از پدیده نفوذ ریشه‌های قارچ *Mycogone perniciosa* به درون ریشه میزبان (a) ۹۳۵x، مشاهده نفوذ و ایجاد زوائد ته سنجاقی قارچ *Mycogone perniciosa* ضمن نفوذ به ریشه میزبان، (b) ۹۳۵x، پدیده پیچش ریشه‌های قارچ *Mycogone perniciosa* در اطراف ریشه میزبان و ایجاد تورم در محل پیچش، (c) ۷۶۲x

Fig7. EMS from *Mycogone perniciosa* hyphal penetration to the mycelium host(a) ×935, Penetration and occurring of *Mycogone perniciosa* hostorium during of penetration time (b) ×935, Torsion phenomenon of *Mycogone perniciosa* around the mycelium host and hypertrophy(c)×762

گردد (Umar and Van Griensven, 1999 and Bernorob et al 2000). تغییرات رشدی منجر به تشکیل اندامکهای باردهی غیر عادی و تغییرات رشدی شدیدی می‌شود. چنین تغییرات رشدی در این مطالعه مشاهده گردید.

## منابع

جهت ملاحظه به صفحات (۱۶۶-۱۶۷) متن انگلیسی مراجعه شود.

لایه ضخیم ۲۰ نانومتری از موسیلاژ بتا گلوکان در سطح دیواره خارجی می‌باشد. موسیلاژ خارجی و هیدروکسید پتاسیم محلول نقش مهمی در حفظ دیواره ریشه در برابر فعالیتهای آنزیمهای لیتیک قارچهای دیگر از خود نشان می‌دهد. بر این اساس احتمالاً قارچ خوراکی دکمه ای (A. bisporus) دارای یک نوع فاکتور تحریک کننده جوانه زنی می‌باشد که منجر به حساسیت بیشتر این گونه در تقابل با گلوکو گالاکتومانان موجود در دیواره سلولی قارچ بیمارگر با پکتین قارچ خوراکی تعامل کرده و شناخت صورت می