مجله پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل
جلد شانزدهم، شماره دوم، ۱۳۸۸
www.gau.ac.ir/journals

جداسازی و شناسایی قارچ‌های همراه بذر بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) در جنگل شصت‌کلاته گرگان

***فریدون فریدی[۱]، محمدرضا کاوسی[۲]، کامران رهنما[۳] و سعید نصرا...نژاد[۴]**

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۲]استادیار گروه جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۳]دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، [۴]استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

گونه بلوط (بلندمازو) از گونه‌های مهم صنعتی جنگل‌های شمال کشور می‌باشد که زادآوری طبیعی این گونه باارزش به‌دلیل وجود آفات و بیماری‌های متعدد از جمله قارچ‌ها، با مشکلات فراوانی مواجه است. به‌منظور جداسازی و شناسایی قارچ‌های همراه بذر بلندمازو در سال ۱۳۸٦ از جنگل آموزشی و پژوهشی شصت‌کلاته گرگان نمونه‌برداری صورت گرفت. بذرهای جمع‌آوری شده به دو قسمت بیرونی (پوسته) و درونی (اندوسپرم) تفکیک و با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضدعفونی سطحی گردید. هر قسمت (بیرونی و درونی) به‌صورت جداگانه در چهار تکرار روی محیط کشت غذایی سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) کشت گردید (در هر تکرار ۲۵ بذر). با استفاده از خالص‌سازی و خصوصیات اسپور، اندازه و رنگ آنها، قارچ‌های *Aspergillus flavus*، *A. niger*، *Curvularia affinis*، *Trichoderma harzianum*، *Trichothecium roseum*، *Eurotium rubrum*، *Penicillium implicatum* و *Diplodia* sp. جداسازی و شناسایی شد. قارچ‌های *E. rubrum*، *T. roseum*، *T. harzianum* و *Diplodia* sp. به‌ترتیب با ۳۵ درصد، ٤١ درصد، ۷ درصد و ۲۳ درصد فراوانی فقط در بخش بیرونی و قارچ *C.*

* مسئول مکاتبه: feridonfaridi@gmail.com

Archive of SID
www.SID.ir

affinis با ۳۹ درصد فراوانی فقط در بخش درونی بذر مشاهده شدند. قارچ‌های *A. flavus*، *A. niger* و *P. implicatum* نیز در هر دو بخش مشاهده شدند. بیشترین فراوانی قارچ مربوط به قارچ *P. implicatum* در بخش درونی با ۷٤ درصد بود. نتایج پژوهش نشان داد که تنوع و فراوانی قارچ‌های بخش بیرونی بذر بیشتر از بخش درونی است. همچنین در طول چندین بار جداسازی، یک قارچ پوده‌رست همیشه روی سطح بذر بلندمازو یافت می‌شود. این اولین گزارش از قارچ‌های همراه بذر بلندمازو در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بلندمازو، قارچ‌های همراه، بذر، جنگل شصت‌کلاته

مقدمه

بذرهای درختان جنگلی به‌طور پی‌درپی تحت‌تأثیر اختلالات فیزیکی و فیزیولوژیکی قرار می‌گیرند که بیشتر این بیماری‌ها به‌وسیله قارچ‌ها به‌وجود می‌آیند. سلامتی و توانایی رشد در نهال‌ها به‌طور قابل‌توجه‌ای به کیفیت بذر بستگی دارد (میتال و ماتیور، ۱۹۹۸). بیشتر قارچ‌های همراه بذر درختان جنگلی کپک‌ها هستند که برروی سطح بذر توسعه پیدا کرده و در بعضی مواقع عامل آلودگی داخلی هم هستند (هاوس، ۱۹۵٦). تأثیر کپک برروی بذرها به‌صورتی است که بذرها ظاهراً سالم به نظر می‌رسند اما در واقع به‌طور قابل ملاحظه‌ای از نظر قوه نامیه تخریب شده‌اند (شئا، ۱۹۵۷). اخیراً مشخص شده که همه بذرها حامل اسپورهای قارچ‌های میکروسکوپی چه برروی سطح بذر و چه در درون بذر هستند (سینگ و ماتیور، ۱۹۹۳). معمولاً یک قارچ پوده‌رست روی سطح بذر یافت می‌شود زیرا اسپورها به راحتی می‌توانند به سطح بذر بچسبند، از طرف دیگر تعداد اسپورهای سطح بذر به‌طور قابل‌توجه‌ای مختلف هستند به‌طوری‌که از ۵۰ تا ۱۵۰۰۰۰ اسپور در هر یک گرم بذر متغیر می‌باشد (یوروسویک، ۱۹٦۱). در شرایط مناسب، بعضی از اسپورهای جوانه زده و پس از توسعه لوله تندش به داخل لپه‌ها نفوذ می‌کنند که از این طریق جنین بذرها را مورد تغذیه قرار می‌دهند. قارچ‌های همراه بذر هم به طریق مستقیم و هم به طریق غیرمستقیم می‌توانند سبب ضعف جوانه‌زنی بذر شده و بذرها را برای حمله قارچ‌های بیماری‌زای خاکزاد مستعد کنند (گیبسون، ۱۹۵۷). بذر سالم در جنگل جهت زادآوری طبیعی یکی از مهم‌ترین موضوع‌هایی است که حیات آینده جنگل به آن بستگی دارد. بذرهای بیمار و صدمه دیده حتی در شرایط مناسب محیطی هم نمی‌توانند یک زادآوری دلخواه و مطلوب را برای بقای جنگل یا یک گونه خاص را به‌وجود

Archive of SID

www.SID.ir

آورند. درختانی که از بذور بیمار و آسیب‌دیده به وجود می‌آیند دارای رشد کم بوده و بذوری را که در آینده تولید می‌کنند دارای قدرت حیاتی پایین می‌باشند (حجازی، ۱۹۹٤).

پوتلایکوک (۱۹۵۳) قارچ‌هایی را که سبب کپک‌زدگی و همچنین تغییر رنگ سطح بذرهای بلوط می‌شوند را مشخص کرد که شامل جنس‌های: *Mucor*، *Rhizopus*، *Trichothecium*، *Botrytis* و *Penicillium* بودند و اهمیت ثانویه‌ای در از بین رفتن توانایی جوانه‌زنی بذرهای بلوط داشتند. او همچنین نتیجه‌گیری کرد که ۷۰ درصد از بذرهای بلوط در طول انبارداری به‌خاطر آلودگی‌های قارچی درصد جوانه‌زنی خود را از دست می‌دهند. شئا (۱۹۵۷) گزارش داد که تأثیر کپک‌ها روی بذرهای بلوط می‌تواند به‌طور قابل‌توجه‌ای سبب تخریب بذر شود هر چند که در ظاهر صدمه‌ای جدی روی آنها مشاهده نشود. یوروسویک (۱۹٦۱) قارچ‌های همراه بذر بلوط را به دو دسته تقسیم کرد: ۱- پارازیت‌ها یا نیمه پارازیت‌ها شامل قارچ‌هایی مانند *Ciboria batschiana* (Zopf) N.F. Buchw.، *Ophiostoma* spp.، *Gloeosporium quercinum* Westend.، *Phomopsis quercella* (Sacc) Died، *Cytospora intermedia* Sacc، *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries و *Pestalotia* sp.، ۲- گندروها شامل قارچ‌هایی از جنس‌های *Alternaria*، *Aspergillus*، *Fusarium*، *Penicillium* و *Trichoderma*. ساکولووا (۲۰۰۱) نیز قارچ‌های همراه بذر بلوط را به دو دسته کپک‌ها و پوسیدگی‌ها تقسیم‌بندی نمود.

از سوی دیگر بحث بیماری‌شناسی بذر درختان جنگلی در مقایسه با مسایل بذور گیاهان زراعی کمتر در کشور به آن توجه شده است (ارشاد، ۱۹۹۵). در چند سال گذشته بحث قارچ‌های همراه بذر بررسی گردید اما اخیراً بحث حفاظت از بذور درختان جنگلی به‌دلیل مشکلات زیادی که در سطح جهانی برای مدیریت جنگل‌ها به‌وجود آمده، تبدیل به یک موضوع جدی شده است (میتال و ماتیور، ۱۹۹۸). بلندمازو (*Quercus castaneifolia* Browicz & Menitsky) هم به‌عنوان یکی از گونه‌های مهم صنعتی جنگل‌های شمال کشور که ٦/٦ درصد از سطح و ۷ درصد از حجم جنگل‌های شمال را به خود اختصاص می‌دهد از نظر زادآوری طبیعی و همچنین جنگل‌کاری با مشکلات فراوانی مواجه شده است، بنابراین شناخت خصوصیات قارچ‌های همراه بذر بلوط و دست‌یابی به مناسب‌ترین روش‌های احیا این گونه باارزش، بسیار مهم و ضروری می‌باشد.

هدف از این پژوهش شناسایی قارچ‌های عامل خسارت در دو بخش درونی و بیرونی بذر بلندمازو و مشخص کردن فراوانی آنها از جنگل شصت‌کلاته است.

Archive of SID

www.SID.ir

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در اواسط پاییز سال ١٣٨٦ جنگل آموزشی و پژوهشی شصت‌کلاته واقع در جنوب غربی شهرستان گرگان مورد بررسی قرار گرفت و پس از جنگل گردشی و مشخص کردن منطقه پراکنش درختان بلندمازو به‌صورت تصادفی ١٠٠ بذر در هر منطقه جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در کیسه‌های کاغذی سترون قرار گرفته و پس از درج مشخصات منطقه و تاریخ جمع‌آوری به آزمایشگاه با دما و تهویه مناسب انتقال داده شدند. بدین‌ترتیب ٤ نمونه ٢٥ تایی از بذرهای منطقه جمع‌آوری شدند.

جدا و خالص‌سازی قارچ‌های بذر: به‌منظور جداسازی قارچ از بذر ابتدا بذرها به قطعه‌های کوچک‌تر و همچنین به دو بخش برونی (پوسته) و درونی (اندوسپرم) تقسیم شدند (شکل ١). تفکیک بخش درونی از بخش برونی بذر به‌دلیل مقایسه قارچ‌های دو بخش نام برده، صورت گرفت. پس از اینکه بذر به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد، با هیپوکلریت سدیم ٠/٥ درصد به مدت ٢-١ دقیقه ضدعفونی سطحی گردید و سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده و جهت خشک نمودن در لای کاغذ صافی سترون قرار داده شد. آنگاه قطعات بخش برونی و درونی بذر به‌صورت مجزا و در چهار تکرار برروی محیط کشت غذایی عصاره سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA)[1] حاوی اسید لاکتیک کشت گردید و در انکوباتور با دمای ١±٢٥ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از گذشت ٣ روز از قارچ‌های رشد یافته برروی محیط کشت به‌روش نوک ریسه‌ای کشت فرعی صورت گرفت و به این ترتیب قارچ‌ها خالص‌سازی شدند.

شکل ١- تفکیک بذر بلندمازو به دو قسمت بیرونی (پوسته) و درونی (اندوسپرم).

1- Potato Dextrose Agar

Archive of SID

www.SID.ir

شناسایی قارچ‌ها: شناسایی جنس قارچ‌ها، پس از رویش آنها روی قطعات بذر با استفاده از منابع معتبر بارنت و هانتر (۱۹۹۸) و الیس (۱۹۷٦) و طبقه‌بندی آنها براساس طبقه‌بندی اریکسون و همکاران (۲۰۰٦) و الکسوپولس و همکاران (۱۹۹٦) بود. برای شناسایی گونه‌ها محیط کشت PDA مطابق روش دینگرا و سینکلایر (۱۹۹۵) مورد استفاده قرار گرفت. کلیدهای شناسایی پیت (۱۹۸۸ و ۱۹۹۷) برای شناسایی گونه مربوط به جنس‌های *Penicillium*، *Aspergillus* و *Eurotium*، توصیف‌های لیت وینوف (۱۹٦۷) و الیس (۱۹۷٦ و ۱۹۷۱) جهت شناسایی گونه مربوط به جنس‌های *Trichothecium*، *Curvularia* و برای شناسایی گونه *Trichoderma harzianum* از کلید شناسایی گیمز و بیست (۱۹۹۸) و هارمن و کوبیسک (۱۹۹۸) استفاده شد.

شناسایی براساس معیارهای مختلفی مانند وجود یا عدم وجود دیواره عرضی، شکل و اندازه آسک، کنیدیوفور، آسکوسپورها، کنیدیوم‌ها و فیالیدها، نوع آسکوکارپ، تعداد آسکوسپورهای هر آسک، تعداد کنیدیوم‌های قرار گرفته برروی کنیدیوفور و یا فیالیدها، یک یا چند یاخته‌ای بودن آسکوسپورها و کنیدیوم‌ها، در بعضی از گونه‌ها حضور یا عدم حضور متولاها، رشد قطری پرگنه، رنگ و حالت پرگنه و غیره صورت گرفت.

نتایج و بحث

از روی بذرهای بلندمازو قارچ‌های *Aspergillus flavus* Link، *A. niger* Tiegh. nom. cons.، *Curvularia affinis* Boedijn.، *Trichoderma harzianum* Rifai، *Eurotium rubrum* Jos. König etal Bainier & Sartory، *Penicillium roseum* (Pers.) Link، *P. implicatum* Biourge و *Diplodia* sp. جداسازی و شناسایی شد. درصد فراوانی هر قارچ در جدول ۱ نشان داد که بیشترین درصد فراوانی به‌ترتیب مربوط به گونه *P. implicatum* با ۷٤ درصد و *C. affinis* با ۳۹ درصد فراوانی از بخش درونی بذر جداسازی شده است. در حالی‌که کمترین میزان درصد فراوانی از بخش درونی بذر با ۱۱ درصد مربوط به قارچ *A. niger* بود. در بخش پوسته بذر یا بخش بیرونی بیشترین درصد فراوانی به‌ترتیب مربوط به قارچ‌های، *A. flavus* با ٤٦ درصد و *T. roseum* با ٤۱ درصد جداسازی بوده است. کمترین میزان درصد فراوانی (۷ درصد) قارچ جداسازی شده از قسمت بیرونی بذر مربوط به *T. harzianum* بود.

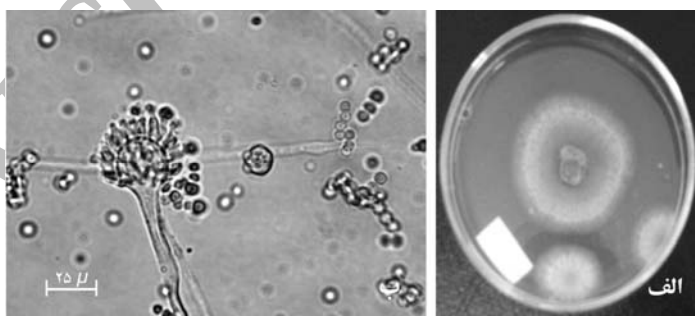
Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- درصد فراوانی قارچ‌های شناسایی شده از روی بذر بلندمازو.

گونه‌ها	درصد فراوانی بخش برونی (پوسته)	درصد فراوانی بخش درونی (اندوسپرم)
Aspergillus flavus	٤٦	۲۷
A. niger	۱٦	۱۱
Curvularia affinis	_	۳۹
Trichoderma harzianum	۷	_
Diplodia sp.	۲۳	_
Penicillium implicatum	۳۱	۷٤
Eurotium rubrum	۳٥	_
Trichothecium roseum	٤۱	_

گونه Aspergillus flavus: پرگنه در محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد زیتونی تا لیمویی سبز که از پشت ظرف کرم رنگ بودند. رشد قطری پرگنه سریع، حدود ۵/۲ سانتی‌متر بعد از سه روز و بافت پشمی تا پنبه‌ای که گاهی دارای دانه‌های ریز یا دانه‌دانه بودند (شکل ۲- الف). هیف دارای دیواره عرضی و روشن، کنیدیوم‌ها به‌صورت شعاعی تا ستونی با یک ترتیب سنی برروی سلول حباب مانند یا وزیکل قرار داشتند. کنیدیوفورها درشت و بی‌رنگ با بیش از ۸۰۰ میکرومتر طول و ۲۰-۱۵ میکرومتر عرض. وزیکل‌ها کروی تا نیمه‌کروی (به قطر ٤۰-۲۰ میکرومتر)، فیالیدها (۱۲-۸ × ٤-۳ میکرومتر) تقریباً تمام سطح وزیکل را پوشش دادند. کنیدیوم‌ها به قطر ٦-۳ میکرومتر، صاف و ظریف و کروی تا نیمه‌کروی بودند (شکل ۲- ب).



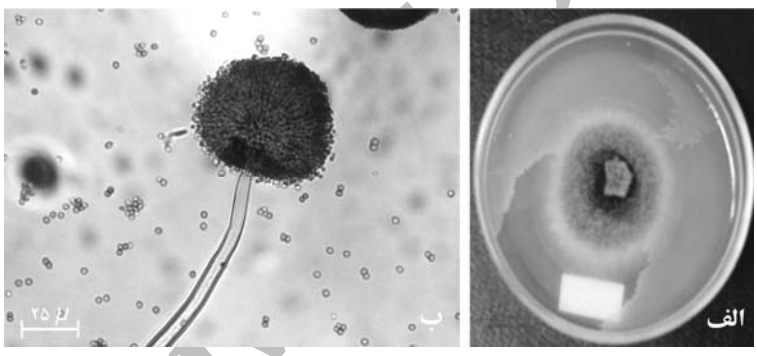
شکل ۲- *Aspergillus flavus* جداسازی شده از بذر بلندمازو

(الف: پرگنه برروی PDA، ب: کنیدیوفور و کنیدی‌ها).

Archive of SID

www.SID.ir

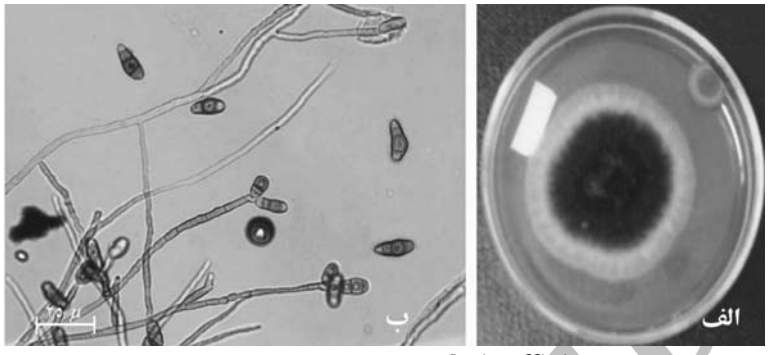
گونه *Aspergillus niger*: پرگنه بر روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در ابتدا سفید که به سرعت به‌دلیل تولید کنیدی سیاه رنگ شده و در پشت ظرف زرد کم رنگ یا رنگ پریده که در طی رشد شکاف‌های شعاعی در محیط کشت تولید کرد. رشد قطری پرگنه بعد از سه روز ٤/٣ سانتی‌متر (شکل ٣- الف). هیف دارای دیواره عرضی و شفاف. کنیدیوم‌ها به‌صورت شعاعی برروی وزیکل قرار داشتند. این گونه تولید متولا نیز کرد. کنیدیوفورها دراز (٤٠٠ تا ٣٠٠٠ میکرومتر)، صاف و شفاف که در راس تیره بوده، به حباب یا سلول وزیکل‌های کروی (به قطر ٧٥-٣٠ میکرومتر) منتهی شدند. متولاها و فیالیدها تمام سطح وزیکل را پوشاندند. کنیدیوم‌ها قهوه‌ای تا سیاه، ناصاف و زگیل‌دار، کروی و اندازه‌ای به قطر ٥-٤ میکرومتر دارا بودند (شکل ٣- ب).



شکل ٣- *Aspergillus niger* جداسازی شده از بذر بلندمازو.
(الف: پرگنه بر روی PDA، ب: کنیدیوفور و کنیدی‌ها).

گونه *Curvularia affinis*: پرگنه برروی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به رنگ سیاه تا سیاه مایل به سبز تیره که در حاشیه‌ها سفید بود. بافت پرگنه پنبه‌ای و رشد قطری آن بعد از سه روز ٤/٤ سانتی‌متر بود (شکل ٤- الف). کنیدیوفورها اغلب ساده و حامل اسپورهای انتهایی که برروی آن به‌صورت دو تایی تشکیل شدند. کنیدیوم‌ها ۲ تا ٤ سلولی، کم و بیش دوکی شکل و خمیده به‌طوری‌که یکی از سلول‌های میانی درشت‌تر از بقیه و به رنگ خرمایی روشن که دو سلول موجود در هر دو انتها روشن‌تر به نظر رسید. تحدب سلول مرکزی به‌نحوی بود که ایجاد یک برآمدگی را نمود. اندازه کنیدیوم‌ها ١٤-٨×٣٣-٢٣ میکرومتر بود (شکل ٤- ب).

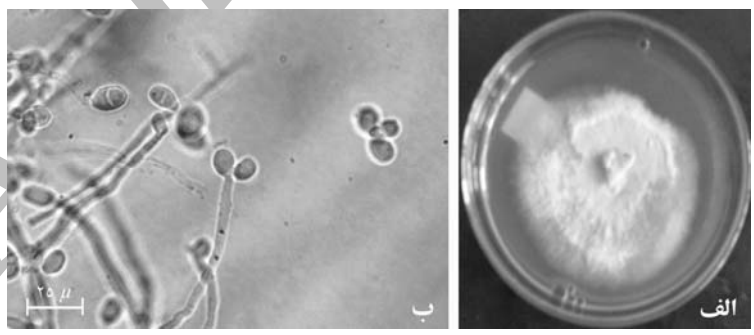
www.SID.ir



شکل ٤- ***Curvularia affinis*** جداسازی شده از بذر بلندمازو.

(الف: پرگنه برروی **PDA**، ب: کنیدیوفور و کنیدی‌ها).

گونه *Trichothecium roseum*: پرگنه تقریباً سریع‌الرشد با رشد قطری ۲/۸ سانتی‌متر بعد از سه روز و برروی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به رنگ صورتی کم‌رنگ مایل به سفید و تا حدودی پودری شکل بود (شکل ۵- الف). کنیدیوفورها تا موقعی که اولین کنیدیوم‌ها تولید نشدند از هیف‌های بخش رویشی قابل تفکیک نبودند. آنها به‌صورت عمودی، بدون انشعاب و اغلب دارای دیواره عرضی در نزدیکی پایه کنیدیوفور بودند دوکنیدیوم به‌طور متناوب و برروی هم در نوک کنیدیوفور تشکیل شدند. کنیدیوم‌ها دو سلولی، بیضوی تا گلابی شکل با محل اتصال به کنیدیوفور مایل، شفاف، صاف تا کمی زبر و با اندازه ۱۰-۷ × ۱٦-۱۱ میکرومتر بودند (شکل ۵- ب).



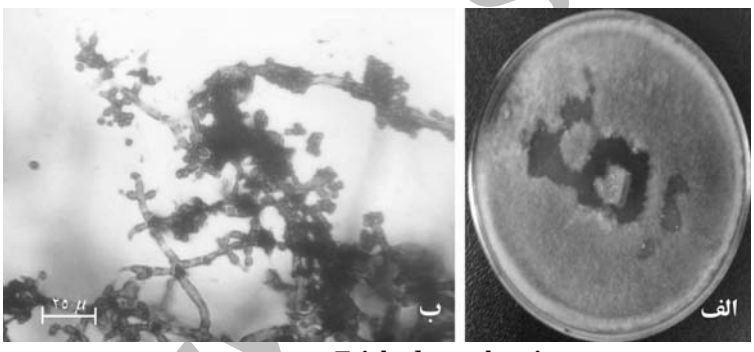
شکل ۵- ***Trichothecium roseum*** جداسازی شده از بذر بلندمازو

(الف: پرگنه برروی **PDA**، ب: کنیدیوفور و کنیدی‌ها).

Archive of SID

www.SID.ir

گونه *Trichoderma harzianum*: پرگنه دارای رشد سریع که در ابتدا سفید پنبه‌ای اما بعد از دو روز به رنگ سبز تقریباً روشن در آمد و تمام تشتک پتری را پر کرد (شکل ٦- الف). هیف‌ها دارای دیواره عرضی، منشعب و به قطر ۵/۵-۵/ ۲ میکرومتر بودند. کلامیدوسپورها در انتها و یا به‌صورت بین هیفی، بیضوی تا دوکی کشیده با دیواره صاف و به قطر ۷/۵-۵ × ۱۰-۸/۵ میکرومتر. کنیدیوفورها منشعب که به طرف انتهای کنیدیوفور طول این انشعابات کوچک‌تر شدند. فیالیدها کوتاه، میله‌ای شکل، در قاعده باریک‌تر از ناحیه میانی و در نوک مخروطی به ابعاد ۳/۵-۲/۵ × ۷/۵-۵ میکرومتر بودند.کنیدیوم‌ها (فیالوسپورها) به‌صورت منفرد در انتهای فیالیدها مجتمع شده، کروی تا تخم‌مرغی با دیواره صاف و به ابعاد ٤/۳-۲/۵ میکرومتر بودند (شکل ٦- ب).

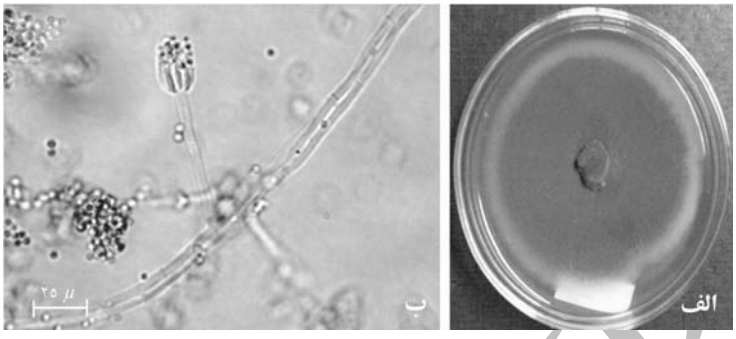


شکل ٦- *Trichoderma harzianum* جداسازی شده از بذر بلندمازو
(الف: پرگنه برروی PDA، ب: کنیدیوفور و کنیدی‌ها).

گونه *Penicillium implicatum*: پرگنه بر روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ابتدا به رنگ سفید پنبه‌ای که در نهایت به رنگ سبز- آبی پودری شکل بود. رشد قطری پرگنه بعد از سه روز به ۲/٦ سانتی‌متر رسید (شکل ۷- الف). کنیدیوفورها به‌صورت انفرادی از میسلیوم رویشی خارج و در نزدیک به انتها به شکل جارویی منشعب و به فیالیدها ختم شدند. ارتفاع کنیدیوفور ۵۰-۲۵ میکرومتر و طول فیالیدها ۱۰-۸ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها کروی، به رنگ سبز تقریباً تیره، ۳/۵-۲ میکرومتر، یک سلولی، به‌صورت زنجیره‌هایی که جوان‌ترین کنیدی در قاعده زنجیره قرار داشت، تشکیل شدند (شکل ۷- ب).

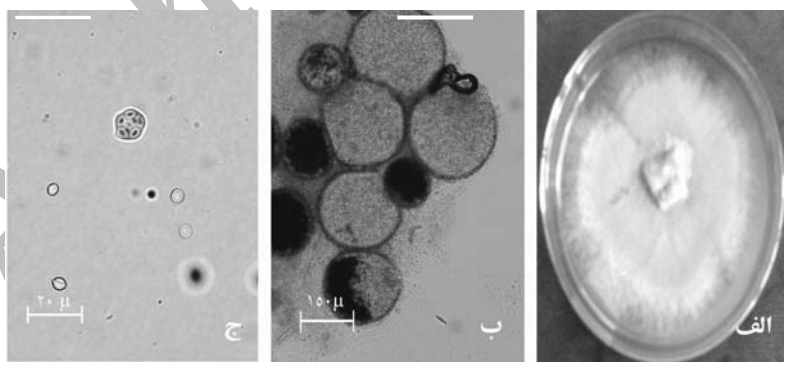
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۷- *Penicillium implicatum* جداسازی شده از بذر بلندمازو
(الف: پرگنه برروی PDA، ب: کنیدیوفور و کنیدی‌ها).

گونه *Eurotium rubrum*: پرگنه برروی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به رنگ نارنجی مایل به قرمز که در حاشیه سفید بود. بافت پرگنه پنبه‌ای و رشد قطری آن پس از سه روز به ۳/۵ سانتی‌متر رسید (شکل ۸- الف). آسکوکارپ از نوع کلیستوتس کروی تا تقریباً بیضوی و به رنگ زرد بود (شکل ۸- ب). آسک‌ها تقریباً کروی تا تخم‌مرغی، با اندازه ۱۳-۱۲ میکرومتر و دارای یک دیواره نازک و ناپایا بودند. آسکوسپورها یک سلولی با یک حلقه استوایی، با اندازه ۶/۸- ۶/۲ × ۵-۴/۵ میکرومتر، بیضوی، زرد رنگ با حاشیه صاف و به‌صورت هشت‌تایی در داخل آسک قرار می‌گرفتند (شکل ۸- ج).

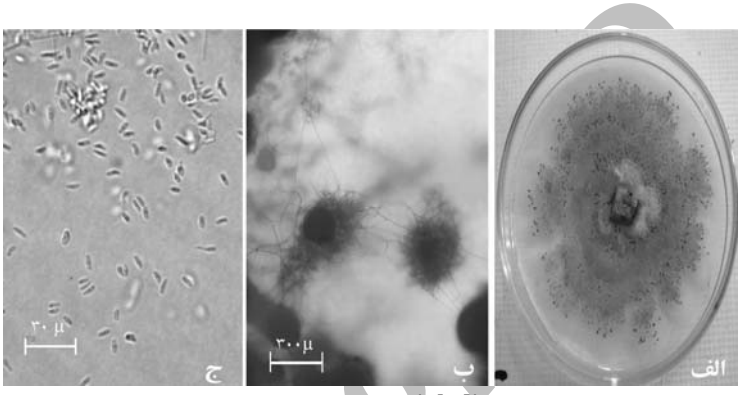


شکل ۸- *Eurotium rubrum* جداسازی شده از بذر بلندمازو
(الف: پرگنه روی PDA، ب: کلیستوتس‌ها، ج: آسک و آسکوسپورها).

Archive of SID

www.SID.ir

گونه *Diplodia* sp.: پرگنه بر روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به رنگ زرد مایل به سفید که در زمینه آن دانه‌های سیاه رنگ مشخص بود (شکل ۹- الف). پیکنیدها سیاه، منفرد، کروی و روزنه‌دار بودند (شکل ۹- ب). کنیدیوفورها ظریف و ساده، کنیدیوم‌ها تیره، دو سلولی، ۷-۵ میکرومتری، بیضوی یا تخم‌مرغی شکل و در بعضی دارای انحنا بودند (شکل ۹- ج).



شکل ۹- *Diplodia* sp. جداسازی شده از بذر بلندمازو
(الف: پرگنه روی PDA، ب: پیکنید، ج: کنیدی‌ها).

قارچ *Penicillium implicatum* بیشترین فراوانی را در بین قارچ‌های نام‌برده داشت و در هر دو بخش بیرونی و درونی بذر مشاهده گردید که عامل عمده تخریب و از بین رفتن بذر بود. از علایم آن برروی بذر، رنگ قهوه‌ای روشن یا قرمز و نامنظم هندسی است که به‌تدریج شکل لکه‌ها روی سطح بذر ادغام خواهند شد. میسلیوم‌های سبز یا آبی روی این لکه‌ها قرار می‌گیرند و سبب پودری شدن و قهوه‌ای شدن بافت بذر می‌شوند. این قارچ باعث کاهش جوانه‌زنی در بذر شده و در نهایت بذرها را از بین می‌برد. علاوه‌بر بلوط برروی بذرهای توس، راش و شاه‌بلوط هم مشاهده شده است (ساکولووا، ۲۰۰۱).

قارچ‌های *A. flavus* و *A. niger* جدایه‌هایی بودند که به‌ترتیب در هر دو بخش بیرونی (٤٦ و ١٦ درصد) و درونی بذر (۲۷ و ۱۱ درصد) مشاهده شدند (جدول ۱). *A. flavus* در بخش درونی سبب به وجود آمدن لکه‌های زرد رنگ می‌شد که در نهایت باعث پودری شدن آن می‌گشت. *A. niger* در کنترل بعضی قارچ‌ها و در فرآیندهای صنعتی تولید اسید سیتریک و اسید گلوکانیک

Archive of SID

www.SID.ir

کاربرد زیادی دارد (الکسوپولوس و همکاران، ۱۹۹۶). همچنین اکثر گونه‌های آسپرجیلوس به‌دلیل تولید میکوتوکسین و کاهش قدرت جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه، مضر هستند. گلزار (۱۹۸۹) در تحقیقات خود نشان داد که عصاره قارچ *A. niger* نسبت به *A. flavus* باعث کاهش مؤثری در قدرت جوانه‌زنی بذور مورد بررسی گردید، در حالی‌که *A. flavus* در مراحل بعدی رشد گیاهچه، اثر منفی بیشتری دارد (گوش و ناندی، ۱۹۸۶). قارچ *A. flavus* به لحاظ تولید افلاتوکسین‌ها که متابولیت‌های بسیار سمی، جهش‌زا و سرطان‌زا هستند، اهمیت زیادی دارند.

قارچ *T. roseum* باعث کاهش قدرت جوانه‌زنی بذر بلوط می‌شود و به رنگ قهوه‌ای تیره تا تقریباً سیاه رنگ و به‌صورت لکه‌های نامنظم برروی سطح بذرهای بیمار قرار می‌گیرد و از دسته قارچ‌های عامل کپک می‌باشد. این قارچ علاوه‌بر بلوط برروی بذرهای افرا، توس، زبان گنجشک، پیسه‌آ و لاریکس نیز مشاهده شده است (ساکولووا، ۲۰۰۱).

قارچ *T. harzianum* از قارچ‌هایی بود که از روی سطح بذر جداسازی شد. این قارچ از قارچ‌های مایکوپارازیت خاک‌زی بوده و روی چوب و بذرها هم رایج است (رهنما، ۲۰۰۱؛ الکسوپولوس و همکاران، ۱۹۹۶). قارچ *T. harzianum* به‌دلیل نامساعد کردن شرایط رویشی روی سایر بیمارگرها، از نظر مبارزه بیولوژیک اهمیت خاصی دارد. هارمن و کوبیسک (۱۹۹۸) طی تحقیقی که به عمل آوردند، از چند جدایه گونه‌های تریکودرما از جمله گونه ذکر شده جهت مبارزه بیولوژیک با بیمارگر عامل بوته‌میری به نام *Pythium* spp. استفاده نمودند و به نتایج قابل‌قبولی دست پیدا کردند. در ایران برروی عوامل بیماری‌زا درختان جنگلی مانند نارون و بر علیه قارچ‌های خاک‌زی بیماری‌زای گیاهان زراعی با قارچ *T. harzianum* مطالعات زیادی انجام شده است (عراقی و همکاران، ۲۰۰۷؛ رهنما و همکاران، ۲۰۰۵).

تمامی قارچ‌های جداسازی شده در این تحقیق به‌جز قارچ *C. affinis* از روی پوسته بذر جدا گردیدند و این به‌دلیل تماس مستقیم بذر بعد از افتادن از درخت، با خاک است. یکی از مشکلات عمده عدم موفقیت نهال‌کاری‌های صورت گرفته در منطقه و همچنین قدرت جوانه‌زنی کم بذور، می‌تواند به‌دلیل جمع‌آوری آنها بعد از افتادن برروی سطح خاک باشد. استیون (۱۹۹۲) طی تحقیقی نشان داد که اگر از تورهای معلق برروی کف جنگل جهت جمع‌آوری بذرهای بلوط استفاده شود، میزان آلودگی تا حد قابل‌توجه‌ای کاهش می‌یابد.

Archive of SID

www.SID.ir

در ایـن پـژوهش قـارچ *Penicillium* فراوانـی بیـشتری در بخـش درونـی داشـت و قـارچ *Trichoderma* فقط از روی پوسته بذر جداسازی شد که بـا مطالعـات وینـستون (۱۹۵٦) و داون (۲۰۰۳) مطابقت دارد. دورسی و همکاران (۱۹٦۲) قارچ *Penicillium* را از روی بـذر گونـه‌هـای بلوط سیاه و بلوط قرمز و نواک آگبابـا و گرادخـی (۲۰۰۵) قـارچ *Trichothecium roseum* از روی بذر *Q. pubescens* جداسازی نمودند که این قـارچ‌هـا در مطالعـه مـا نیـز مـشاهده شـدند. همچنین تمامی گونه‌های به‌دست آمده در این تحقیق بـه‌جـز قـارچ‌هـای *Curvularia affinis* و *Eurotium rubrum*، در تحقیقـات سـانتوز و همکـاران (۲۰۰۵) از بـذرهای *Quercus suber* جداسازی شد.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که همه بذرهای بلندمازو جمع‌آوری شده کم و بیش به یـک یـا چند گونه از قارچ‌های جداسازی شده، آلوده بودند که اغلب آنها جزو شاخه قارچ‌های نـاقص و یـا آسکومیکوتا می‌باشند. از آن‌جایی که طول مدت خواب بذور بلوط و فرآیند فیزیولوژیک آنها بـسیار زمان‌بر می‌باشد لذا این قبیل قارچ‌های فرصت طلب می‌توانند با توجه به تماس بذر با سطح زمین به آسانی به پوسته و یا داخل بذر راه یابند و بدین شکل مانع از قدرت جوانه‌زنی شوند. از سوی دیگـر بذور بلندمازو از لحاظ مواد غذایی بسیار غنی‌تر از سایر بذور گیاهی هستند، به‌طوری‌که اندازه بزرگ بذر و سطح تماس زیاد آن نیز موضوع دیگری است که فرصت مناسبی را برای قارچ‌های پوده‌رست و پارازیت‌های اختیاری بیشتر فراهم نماید. همچنین تمامی قارچ‌های ذکر شده از روی بذر بلنـدمازو برای اولین بار در ایران گزارش می‌شود.

منابع

1.Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology 4 th Ed. John Willy and Sons, Inc. 869p.
2.Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4thEd. ASP Press, St. Paul, Minnesota, USA, 218p.
3.Dawn, M.W. 2003. Fungi Associated with Northern red oak (*Quercus rubra*) acorns. The Davis College of Agriculture, Forestry, and Consumer Sciences at West Virginia University, 118p.
4.Dingra, O.D., and Sinclair, J.B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, 434p.

Archive of SID

www.SID.ir

5.Dorsey, C.K., Tryon, E.H., and Carvell, K.L. 1962. Insect damage to acorns in West Virginia and control studies using granular systematic insectidies. Journal of Economic Entomology, 55: 885-888.
6.Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. C.A.B International Mycological Institute, Kew, 608p.
7.Ellis, M.B. 1976. More dematiaceous Hyphomycetes. C.A.B International Mycological Institute, Kew, 507p.
8.Eriksson, D., Baral, H., Curral, R., Hansen, K., Kurtzman, G., and Laessoe, T. 2006. Outline of Ascomycota. Myconet, 109p.
9.Ershad, J. 1995. Fungi of Iran. Agricultural Research, Education and Extension Organization, 874p. (In Persian).
10.Games, W., and Bisstt, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma* In: Kubicek, C.P., and Harman, G.E. *Trichoderma* and *Gliocladium*, *Vol. 1*. *Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, Taylor & Francis, London, 278p.
11.Ghosh, J., and Nandi, B. 1986. Deteriorative abilities of some common storage fungi of wheat, Seed Science and Technology, 14: 141-149.
12.Gibson, I.A.S. 1957. Saprophytic fungi as destroyers of germinating pine seeds. The East African Agricultural Journal, 22: 203-206.
13.Golzar, H. 1989. Investigation the effect of several species of storage fungus on talent ability and seed wheat growth. Plant Pathology, 25: 1-9
14.Harman, G.E., and Kubicek, C.P. 1998. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum, T. viride, T. koningii, T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system), Biological Control and Commercial Applications, 278p.
15.Hejazi, A. 1994. Seed technology. Tehran University Press, 442p. (Translated In Persian).
16.Huss, E. 1956. Research into damage to tree seeds by dewinging, Stockholm: Skogsforskinings-Institute, 39p.
17.Iraqi, M.M., Rahnama, K., Zafari, D., and Taghinasab, M. 2007. Investigating biological control of *Ophiostoma novo-ulmi*, causal agent of Dutch Elm Disease by *Trichoderma harzianum* and *T. virens* in vitro. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 14: 5. 178-191. (In Persian).
18.Litvinov, A.M. 1967. Identify microscopic soil-born fungus. Leningrad Science Press, 303p.
19.Mittal, R.K., and Mathur, S.B. 1998. Seed Pathology, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, India, and Danish Government Institute of Seed Pathology, Denmark, Pp: 177-190.
20.Novak Agbaba, S., and Gradecki, M. 2005. Health condition of common oak acorn (*Quercus pubescens*) and protection measures in Croatia. Seed Health Symposium, 58p.

Archive of SID

www.SID.ir

21.Pitt, J.L. 1988. A laboratory guide to common *Penicillium* species (3nd ed.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Division of Food Processing, 188p.
22.Pitt, J.L., and Hoching, A.D. 1997. Fungi and Food Spoilage, Blackie Academic & Professional, 593p.
23.Potlaichuk, V.I. 1953. Harmful microflora of acorns and its development in relation to the conditions of growth and storage, Bot. Z. 38: 135-142.
24.Rahnama, K. 2001. Importance of mycoparasite in order to control soilborn plant disease and introduction new composition of biologic. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 2: 111-121. (In Persian).
25.Rahnama, K., Mohammadzadeh, A., and Razavi, S.A. 2005. Investigation effect of PH and temperature on *Trichoderma koningii* growth and comparation with causal agent wheat spike fusariuz and antagonist activity aginst this pathogens. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 12: 127-136.
26.Santos, M.N., Bragança, M.H., and Casimiro, P.P. 2005. Cork oak associated microorganisms throughout cork manufacture process. EFN, Lisboa, Portugal. 13: 1. 75-93.
27.Shea, K.R. 1957. Problem analysis: Molds of forest tree seed. [Place of publication unknown]: Weyerhaeuser Timber Company, Forestry Research Centre, 14p.
28.Singh, P., and Mathur, S.B. 1993. Disease problems of forest tree seeds: diagnosis and management, International Union of Forest Research Organizations Symposium of Project Group, Pp: 309-324.
29.Sokolova, E.P. 2001. Common fungal disease of Russian forest, USDA (United State Department of Agriculture Forest Service Northeastern Research Station), Pp: 6-11.
30.Steven, W. 1992. Insect and disease affecting oak regeneration success, USDA Forest Service, Pp: 105-110.
31.Urosevic, B. 1961. The influence of saprophytic and semi parasitic fungi on the germination of Norway spruce and scots pine seeds, International Seed Testing Association, 26: 3. 537-556.
32.Winston, P.W. 1956. The acorn microsphere, with special reference to arthropods. Ecology, 37: 120-132.

Archive of SID

www.SID.ir

Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

J. of Wood & Forest Science and Technology,Vol. 16(2), 2009
www.gau.ac.ir/journals

Isolation and Identification of Fungi Associated with Chestnut-Leaved Oak (*Quercus castaneifolia*) Seed in Shast-Kalate Forest of Gorgan

***F. Faridi[1], M.R. Kavosi[2], K. Rahnama[3] and S. Nasrolahnejad[4]**

[1]M.Sc. Student of Forestry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [2]Assistant Prof., Dept. of Forestry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [3]Associate Prof., Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, [4]Assistant Prof., Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

Chestnut-leaved Oak (*Quercus castaneifolia*) is one of the most important industrial species of the northern forests of Iran. Regeneration of this valuable species is limited due to several problems such us pests and the fungal diseases. In order to isolate and identify the fungi associated with Oak seed, sampling was carried out during 2007 in Shast-kalate forest at Gorgan. Collected seeds were separated into two section: outer section of seed (crust) and inside seed section (endosperm) and then their surface was sterilized with 0.5% sodium hypochlorite. Each section of seed was separately tissue cultured on potato dextrose agar media in 4 replicates. After sub-culture and providing fungi pure cultures, various species isolated and identified by spores characteristics, their size and colour, including: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Curvularia affinis*, *Trichoderma harzianum*, *Trichothecium roseum*, *Eurotium rubrum*, *Penicillium implicatum,* and *Diplodia* sp. The fungi, *E. rubrum*, *T. roseum, T. harzianum,* and *Diplodia* sp. were observed only in the outer seed section by 35%, 41%, 7% and 23% frequency, respectively. The fungus *C. affinis* observed only inside seed section by 39 percent frequency. The fungi, *A. flavus, A. niger,* and *P. implicatum* were observed in the both sections of the seeds. The highest frequency of fungus related to *P. implicatum* by 74 percent frequency within seed section. The result indicate higher frequency and diversity of the fungi in the outer section of the seeds than within the seeds. More over, there is always a saprophyte fungus on the acorn seeds, during several isolation. This is the first report on fungi associated with Oak seed in Iran.

Keywords: Chestnut-leaved Oak, Fungi associated, Acorn, Shast-kalate forest

* Corresponding Author; Email: feridonfaridi@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir