

معرفی گونه‌های جدیدی از تریکودرما برای ایران*

Introducing some new species of *Trichoderma* for Iran

فاطمه نظمی رودسری، دوستمراد ظفری**، سیداکبر خداپرست و حمید روحانی

دانشگاه بوعلی سینا، دانشگاه گیلان و دانشگاه فردوسی

پذیرش: ۱۳۸۶/۲/۱

دریافت: ۱۳۸۵/۱۱/۲۴

چکیده

در این بررسی، از بیش از ۸۰۰ نمونه خاک و چوب پوسیده جمع‌آوری شده از استان‌های شمالی کشور (گیلان، مازندران و گلستان)، ۶۹ جدایه تریکودرما متعلق به بخش *Longibrachiatum* و ۱۴۸ جدایه از بخش *Pachybasium* به دست آمد. در مجموع از میان این جدایه‌ها، ۱۳ گونه تریکودرما شناسایی گردید که هفت گونه آن‌ها قبلاً از ایران گزارش شده بودند. از شش گونه دیگر، گونه‌های *Trichoderma ceramicum*، *T. crassum* و *Trichoderma* sp. متعلق به بخش *Pachybasium* و گونه‌های *T. reesei*، آنامورف *Hypocrea andinensis* و آنامورف *H. orientalis* متعلق به بخش *Longibrachiatum* گونه‌هایی جدیدی برای فلور قارچی ایران هستند.

واژه‌های کلیدی: ایران، *Pachybasium*، *Longibrachiatum*، *Trichoderma*

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی آقای دکتر دوستمراد ظفری ارائه شده به دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، همدان
* مسئول مکاتبه

مقدمه

گونه‌های جنس *Trichoderma* Pers. غالباً در مناطق مختلف، موجودات غالب میکروفلور خاک هستند که این ممکن است به دلیل تنوع ظرفیت متابولیکی و ماهیت رقابتی آن‌ها باشد (Samuels 1996, Rossman 1996). به دلیل این ویژگی‌ها، جدایه‌های تریکودرما در تولید آنزیم‌ها و سایر متابولیت‌ها و همچنین بیوکنترل استفاده شده‌اند (Bailey & Lumsdon 1998, Kubicek & Penttilä 1998, Sivasithamparam & Ghisalberti 1998). ریفای (Rifai 1969) و بی‌ست (Bissett 1991a) خصوصیات مورفولوژیکی مورد استفاده در توصیف و تشخیص گونه‌های تریکودرما را شرح داده‌اند. هر دو محقق به وجود مشکلاتی در تعیین گونه‌های مورفولوژیک تریکودرما اشاره کرده‌اند. سامونلز (۱۹۹۶) هم مشاهدات و تفاسیر مفصلی راجع به استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی در تعیین گونه‌های تریکودرما ارائه کرد. بی‌ست (Bissett 1984, 1991a) طبقه‌بندی جنس تریکودرما را به طور دقیق مورد بررسی قرار داده و در مجموع بیش از ۳۰ گونه را در این جنس معرفی کرد. گمس و بی‌ست (Gams & Bissett 1998) بخش *Saturnisporum* را در بخش *Longibrachiatum* ادغام و بدین ترتیب تعداد بخش‌ها را به چهار کاهش دادند. مطالعات مولکولی متعددی که در دو دهه اخیر روی تاکسونومی گونه‌های تریکودرما صورت گرفته است (Chaverri et al. 2003, Chaverri et al. 2001, Dodd et al. 2003, Dodd et al. 2000, Druzhinina et al. 2005, Kullnig et al. 2000, Kullnig et al. 2002, Lieckfeldt et al. 2000) غالباً طبقه‌بندی بی‌ست (۱۹۹۱a, ۱۹۹۱b, ۱۹۹۱c, ۱۹۹۲, ۱۹۸۴) را تا حدود زیادی تأیید کرده‌اند و علاوه بر این، گونه‌های *T. asperellum*, *T. aggressivum* و *T. stromaticum* (Samuels et al. 1999, 2000)، گونه‌های *T. erinaceum*, *T. rossicum*, *T. cerinum* و *T. taiwanense* (Bissett et al. 2003) *T. velutinum*, *T. helicum*, *T. effusum* و *T. ovalisporum* (Holmes et al. 2004) و *T. brevicompactum* (Kraus et al. 2004) را نیز معرفی و به گونه‌های قبلی اضافه نموده‌اند. اورتون و همکاران (Overton et al. 2006 a,b)، یکلیچ و همکاران (Jaklisch et al. 2006) و سامویلز و همکاران (Samuels et al. 2006) بیش از ۲۰ گونه جدید برای تریکودرما و *Hypocrea* معرفی نمودند. در ایران در مجموع تا کنون ۱۳ گونه از تریکودرما شامل *T. asperellum*, *T. koningii*, *T. inhamatum*, *T. harzianum*, *T. longibrachiatum*, *T. saturnisporum*, *T. tomentosum*, *T. citrinoviride*, *T. hamatum*, *T. ghanense* و *T. atroviride* معرفی شده است (Zafari et al. 2003, 2004). با توجه به تعداد زیاد گونه‌های تریکودرما گزارش شده در جهان نسبت به ایران، هدف این تحقیق جمع‌آوری و شناسایی گونه‌های بیشتری از این قارچ در ایران بود.

روش بررسی

نمونه‌برداری از خاک، چوب و مواد گیاهی مناطق مختلف سواحل جنوبی دریای خزر صورت گرفت. نمونه‌برداری خاک به طور تصادفی از عمق صفر تا ۳۰ سانتی‌متری انجام شد. نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل و برای جداسازی گونه‌های تریکودرما از خاک، از محیط‌های کشت عمومی و انتخابی مناسب (Elad & Chet 1983, Davet 1979) استفاده شد. برای شناسایی جدایه‌ها در سطح گونه، میزان رشد، مشخصات ماکروسکوپی پرگنه‌ها و مشخصات میکروسکوپی آن‌ها شامل شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های کنیدیوفورها، فیالیدها، کنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها و ریشه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. جدایه‌ها روی محیط‌های OA (آرد یولاف آگار)، MA (مالت آگار) و PDA (سیب زمینی- دکستروز- آگار) در دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی و روشنایی مساوی (۱۲:۱۲) کشت داده شدند. شرح خصوصیات بر اساس کلید بی‌ست با مشاهده روی محیط MA و گاهی PDA صورت گرفت. البته روی محیط کشت OA هاگزایی بیشتر و کنیدیوفورها رشد مناسب‌تری دارند، به همین جهت از محیط کشت OA نیز استفاده شد. برای مشاهدات میکروسکوپی و اندازه‌گیری، نمونه‌ها داخل یک قطره رنگ cotton blue روی لام قرار داده شده و با میکروسکوپ نوری مشاهده شدند. شکل و ساختار کنیدیوفور از روی کنیدیوفورهای گرفته شده از جوش‌های کنیدیوم‌زا، معمولاً ۷-۴ روز بعد از کشت، زمانی که کنیدیوم‌ها بالغ شدند توصیف شد. شکل و اندازه کنیدیوم‌ها ۱۴ روز بعد از کشت ثبت شد. تصاویر میکروسکوپی با میکروسکوپ نوری لایکا مجهز به سیستم فازکنتراست (phase contrast) گرفته شد و اشکال میکروسکوپی به کمک میکروسکوپ نوری لایتز مجهز به لوله ترسیم با بزرگنمایی 100X ترسیم شد. بعضی از جدایه‌ها برای تشخیص دقیق جهت بررسی‌های مولکولی بویژه تعیین توالی نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S به انستیتوی ملی بیوتکنولوژی کشاورزی کره جنوبی فرستاده شدند که نتایج آن در شرح این گونه‌ها آمده است.

نتیجه و بحث

در این بررسی در مجموع ۶۹ جدایه تریکودرما متعلق به بخش *Longibrachiatum* و ۱۴۸ جدایه از بخش *Pachybasium* به دست آمد که ۱۳ گونه در بین آن‌ها تشخیص داده شد. در بین گونه‌های شناسایی شده هفت گونه قبلاً از ایران گزارش شده بودند (Zafari et al. 2003, 2004) و شش گونه که برای میکوفلور ایران جدید می‌باشند در این مقاله گزارش می‌شوند. لازم به ذکر است، گونه‌ای که تحت عنوان *Trichoderma sp.* نام برده می‌شود احتمالاً هنوز توصیف نشده است.

بخش *Pachybasium*

رشد پرگنه در این بخش بر اساس نوع گونه از آرام تا سریع متغیر است. سطح زیرین پرگنه بی‌رنگ یا زرد تا قهوه‌ای رنگ می‌باشد. کنیدیوم‌زایی به صورت پراکنده، دسته‌ای یا جوش‌های متراکم می‌باشد. گونه‌های این بخش دارای کنیدیوفورهای ستبر و غیر قابل انعطاف با انشعابات فراهم فراوان می‌باشند. کنیدیوفورها غالباً در سطح پرگنه‌ها در کنار هم تولید شده و به صورت متراکم و در هم رفته بوده و دسته‌ها یا جوش‌های کنیدیومی را به وجود می‌آورند. نوک محور اصلی کنیدیوفور در تعدادی از گونه‌های این بخش نازا می‌باشد و گاهی با یکدیگر آناستوموز تشکیل می‌دهند. فیالیدها در این بخش آمپولی شکل و غالباً در دسته‌های ۷-۲ تایی و به صورت فشرده و فراهم روی کنیدیوفورها تولید می‌شوند. کنیدیوم‌ها به اشکال نیم‌کروی، بیضوی تا واژتخم‌مرغی و به رنگ سبز، قهوه‌ای یا بی‌رنگ هستند.

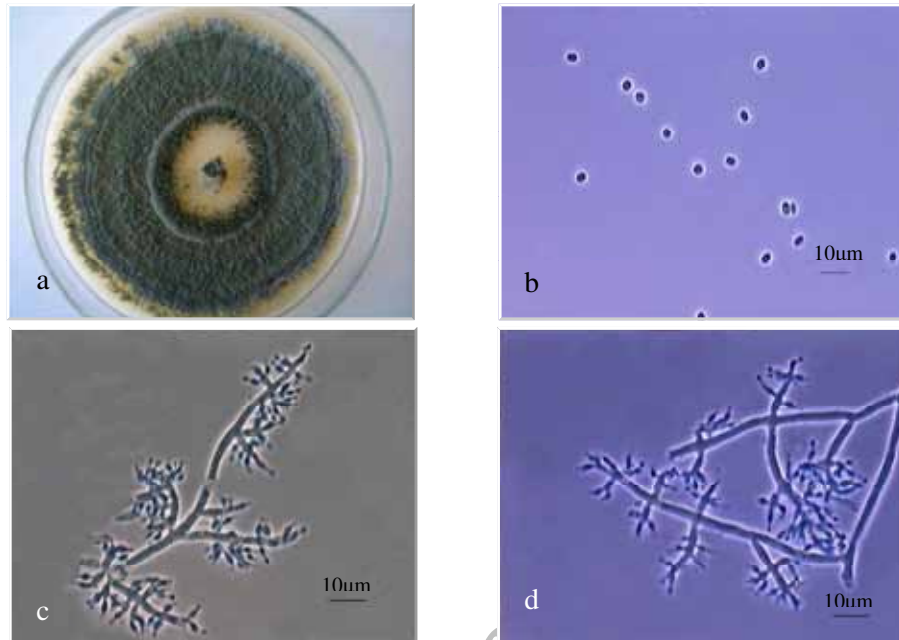
***Trichoderma ceramicum* Chaverri & Samuels, Stud. Mycol. 48: 47-49, 2003**

(شکل‌های ۱ و ۲)

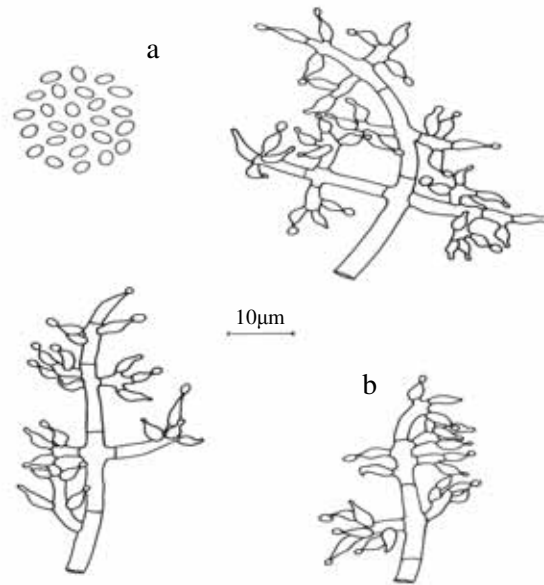
شعاع رشد پرگنه روی محیط کشت PDA بعد از ۷۲ ساعت در دمای ۱۵ درجه سانتی‌گراد ۵-۱۹ میلی‌متر، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد ۱۶-۲۷ میلی‌متر، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ۳۵-۵۰ میلی‌متر و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد ۴۱-۵۷ میلی‌متر بوده و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد هیچ رشدی ندارد. اندازه فیالیدها $2/2-2/5 \times 5/6-7/6$ میکرومتر می‌باشد. کنیدیوم‌ها به رنگ سبز، دارای سطح صاف و بیضوی بوده، اندازه آن‌ها $1/7-2 \times 2/6-3/3$ میکرومتر می‌باشد یک جدایه از این گونه از خاک جنگل ممرز در چالوس (طرح سرچشمه). در این بررسی به دست آمد که اندازه کنیدیوم‌ها و فیالیدهای آن با اندازه‌های توصیف شده توسط چاوری و ساموئلز (۲۰۰۳) مطابقت ندارد، ولی بررسی‌های مولکولی بویژه تعیین توالی نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S و مقایسه آن از طریق جستجوی بلاست نشان داد که جدایه این گونه بیشترین شباهت را به *Trichoderma ceramicum* دارد، لذا به نظر می‌رسد که دامنه تغییرات مورفولوژیکی این گونه بیشتر از دامنه اشاره شده توسط چاوری و ساموئلز (۲۰۰۳) است. این گونه برای میکوفلور ایران جدید می‌باشد.

***Trichoderma crassum* Bissett, Can. J. Bot. 69: 2376-2379, 1991** (شکل‌های ۳ و ۴)

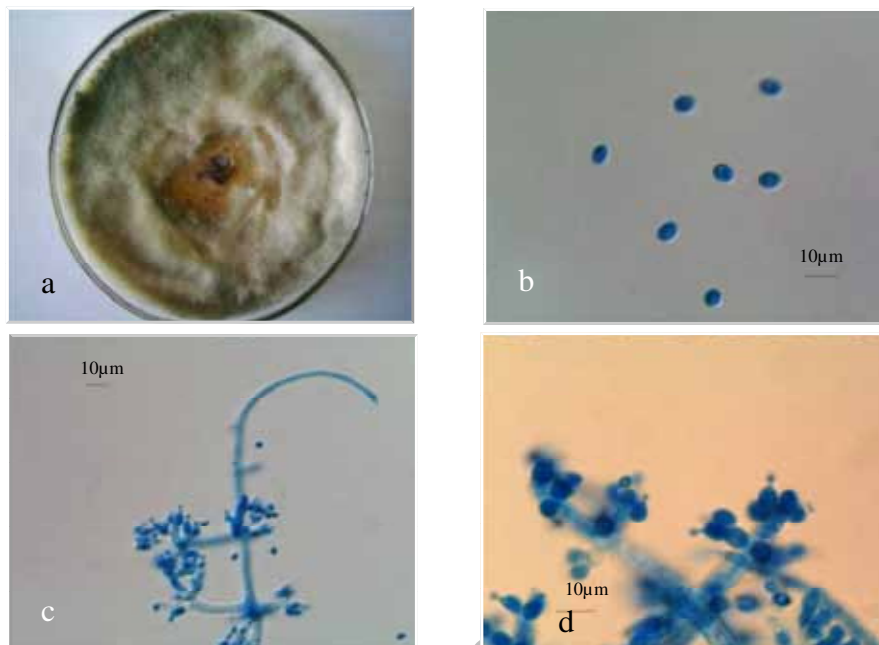
پرگنه‌ها رشد بسیار سریعی دارند. پس از سه روز قطرشان به ۶۵-۵۰ میلی‌متر می‌رسد. ریشه‌های هوایی به صورت کرکی تا پشمی و مایل به خاکستری‌اند. کنیدیوم‌زایی روی محیط کشت MA به میزان زیاد به صورت چسبیده به محیط است که در این حالت مایل



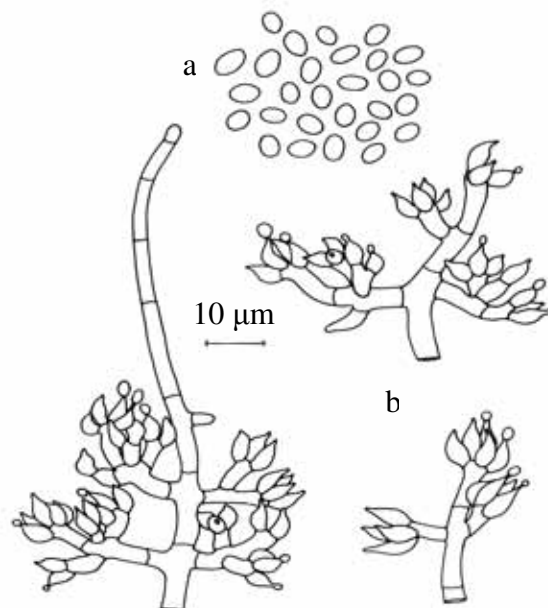
شکل ۱- *T. ceramicum*: a. پرگنه روی OA، b. کنیدیوم‌ها، c و d. کنیدیوفورها و فیالیدها.
 Fig. 1. *T. ceramicum*: a. colony on OA medium, b. conidia, c & d. conidiophores and phialides.



شکل ۲- *T. ceramicum*: a. کنیدیوم‌ها، b. کنیدیوفورها و فیالیدها.
 Fig. 2. *T. ceramicum*: a. conidia, b. conidiophores and phialides.



شکل ۳- *T. crassum*: a. پرگنه روی OA، b. کنیدیومها، c و d. کنیدیوفورها و فیالیدها.
 Fig. 3. *T. crassum*: a. colony on OA medium, b. conidia, c & d. conidiophores and phialides.



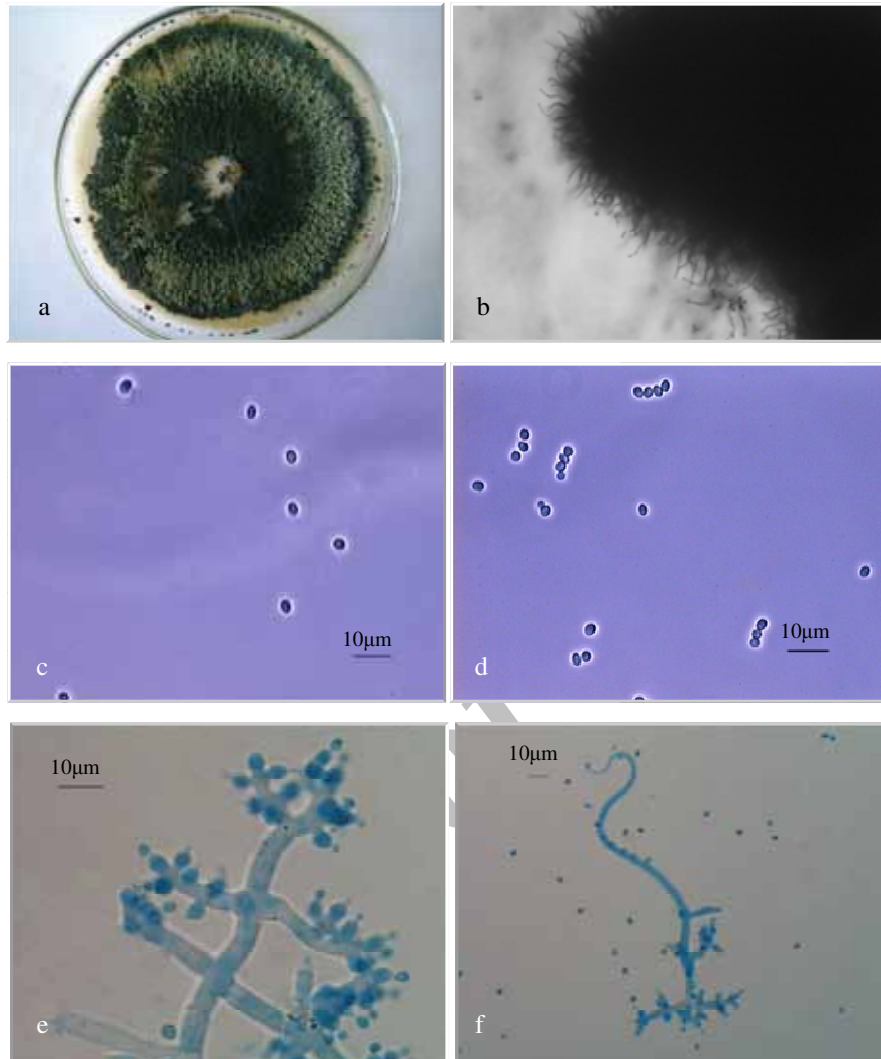
شکل ۴- *T. crassum*: a. کنیدیومها، b. کنیدیوفورها و فیالیدها.
 Fig. 4. *T. crassum*: a. conidia, b. conidiophores and phialides.

به خاکستری تیره‌اند یا به صورت جوش‌های مسطح به هم فشرده به قطر ۱۰ میلی‌متر هستند که رنگ آن‌ها به سرعت به سبز تیره تبدیل می‌شود. روی محیط کشت PDA ترشحات متمایل به زرد کم‌رنگ به صورت قطرات کوچکی روی ریشه‌های هوایی ایجاد می‌شود. سطح زیرین پرگنه بی‌رنگ یا به تدریج به زرد خاکستری تا تقریباً قهوه‌ای تبدیل می‌شود. هیچ بویی از پرگنه متصاعد نمی‌شود. ریشه‌ها بی‌رنگ بوده و دیواره آن‌ها صاف می‌باشد ولی گاهی ضخامت دیواره غیر یکنواخت است. کلامیدوسپورها بسیار فراوان بوده و در کشت‌های جوان غالباً به صورت انتهایی روی انشعابات کوتاه ریشه‌های هوایی تشکیل می‌شوند و در نهایت ممکن است هم به صورت انتهایی و هم به صورت میانی دیده شوند. کلامیدوسپورها به صورت منفرد به اشکال نیم‌کروی تا بیضوی یا گلابی شکل، به قطر ۱۷-۶ میکرومتر، تقریباً بی‌رنگ تا مایل به خاکستری روشن، دارای دیواره صاف به ضخامت یک میکرومتر وجود دارند و در بعضی از جدایه‌ها محتویات داخل کلامیدوسپور به صورت گرانول‌های زبر به نظر می‌رسد. کنیدیوفورها بی‌رنگ با دیواره صاف، در مناطقی که کنیدیوم‌زایی به صورت چسبیده به محیط است فیالیدها به صورت منفرد یا در دسته‌های ۲-۴ تایی روی انشعابات جانبی کوتاه ریشه‌های هوایی تشکیل می‌شوند. کنیدیوفورها در داخل جوش‌ها به صورت مستقیم، ایستاده و خشن بوده و نزدیک به پایه تا ۷ میکرومتر قطر دارند که به تدریج باریک‌تر شده و در اکثر نقاط عرض آن‌ها به ۳/۵-۵/۵ میکرومتر می‌رسد. شاخه‌زایی به صورت نامنظم بوده و انشعابات اولیه با زاویه راست منشعب می‌شوند و کم و بیش به سمت نوک کنیدیوفور انحنا می‌یابند و طول انشعابات به سمت پایه کنیدیوفور افزایش می‌یابد. انشعابات به صورت منفرد یا در دسته‌های دو یا سه تایی می‌باشند. انشعابات اولیه مجدداً یک یا دو بار منشعب می‌شوند. انشعابات نهایی اغلب تک‌یاخته‌ای و استوانه‌ای می‌باشند. نوک محور اصلی کنیدیوفور به طول ۱۵۰ میکرومتر، مستقیم یا کمی انعطاف پذیر، نازا و بدون انشعاب است. بین کنیدیوفورهای مجاور ممکن است آناستوموز صورت گیرد. گاهی در بالای قسمت زایا یک یا دو بار شاخه‌زایی صورت می‌گیرد که به تدریج قطر آن‌ها باریک شده و از ۳/۵-۵ میکرومتر به حدود ۱/۵ میکرومتر در نوک می‌رسد. نوک آن‌ها گرد بوده و به طور مشخصی دارای دیواره عرضی هستند و فواصل بین دیواره‌ها معمولاً ۱۵-۴۵ میکرومتر بوده ولی به سمت نوک، دیواره‌ها به هم نزدیک‌ترند. نوک آن‌ها اغلب نازا بوده ولی در کشت‌های مسن‌تر نوک آن‌ها ممکن است به یک فیالید منفرد کم و بیش درفشی (نوک‌دار) به طول ۲۰ میکرومتر و به ندرت به دسته‌های ۲-۳ تایی از فیالیدها منتهی شود. فیالیدهای تشکیل شده از کنیدیوفورها آمپولی شکل، اغلب با اندازه ۳/۰-۴/۲ × ۴/۴-۹/۵ میکرومتر، در پایه دارای فرورفتگی بوده و عرض آن‌ها در نوک به طور ناگهانی به ۱/۲ میکرومتر می‌رسد. فیالیدها اغلب در دسته‌های ۲-۵ تایی روی انشعابات انتهایی تشکیل می‌شوند، گاهی نیز به صورت دسته‌ای و به ندرت به صورت تکی در طول کنیدیوفور و انشعابات ظاهر می‌شوند

و اغلب حالت همگرایی دارند. فیالیدهای تشکیل شده از ریشه‌های تمایز نیافته در منطقه کنیدیوم‌زایی چسبیده به محیط، آمپولی شکل تا تنگی شکل یا درفشی (نوک‌دار) می‌باشند. اندازه فیالیدهای جانبی $20 \times 2/5-4/0$ میکرومتر می‌باشد ولی طول فیالیدهای انتهایی به 30 میکرومتر نیز می‌رسد. کنیدیوم‌ها بیضوی پهن و اغلب اندازه آن‌ها $3-4 \times 4-6/5$ میکرومتر می‌باشد. در مناطق کنیدیوم‌زایی چسبیده به محیط کنیدیوم‌ها کمی بزرگ‌تر و گاهی به شکل واژتخم‌مرغی می‌باشند. کنیدیوم‌ها در دو انتها گرد و پهن بوده و یا در پایه کمی باریک‌ترند، دیواره آن‌ها صاف و به رنگ سبز تیره‌اند. این گونه شباهت زیادی به *T. virens* دارد. شکل فیالیدها و کنیدیوم‌های ایجاد شده از ریشه‌های تمایز نیافته در منطقه کنیدیوم‌زایی چسبیده به محیط در این دو گونه مشابه است. هر دو گونه دارای کنیدیوفورهای عریض، با انشعابات نامنظم هستند و کنیدیوم‌ها نسبتاً بزرگ و سبز تیره‌اند. کنیدیوفورها در *T. crassum* انشعابات پیچیده‌تری دارند و در جوش‌های مسطح مشخصی تشکیل می‌شوند و اغلب دارای یک طویل شدگی انتهایی نازا (sterile elongation) بوده که در *T. virens* وجود ندارد و کنیدیوم‌های تولید شده از کنیدیوفورها باریک‌تر بوده و بیشتر به شکل بیضوی تا واژتخم‌مرغی می‌باشند. کنیدیوفور در *T. flavofuscum* نیز به *T. crassum* شباهت دارد اما به آسانی با دارا بودن کنیدیوم‌های قهوه‌ای از *T. crassum* متمایز می‌شود. همچنین کنیدیوفور در *T. flavofuscum* همیشه منشعب و در نوک زایا می‌باشد. از این گونه که برای میکوفلور ایران جدید می‌باشد، دو جدایه از خاک منطقه کردکوی و آزادشهر (گرگان) به دست آمد.

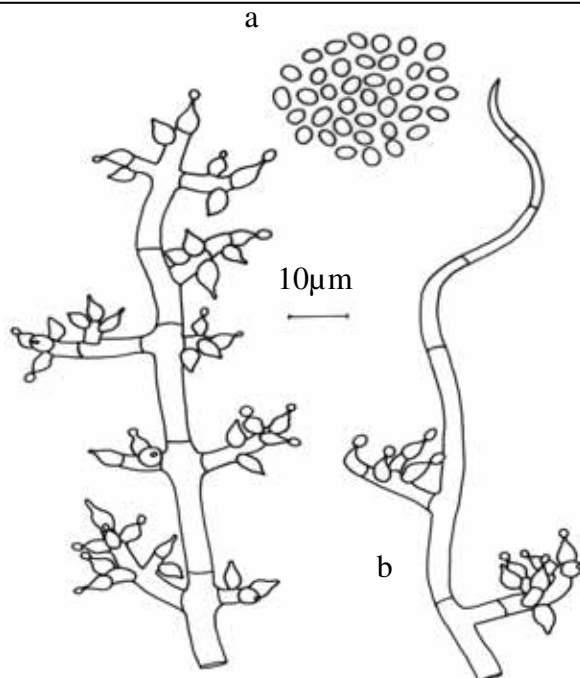
(شکل‌های ۵ و ۶) *Trichoderma* sp.

شعاع پرگنه روی محیط کشت OA پس از چهار روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به 50 میلی‌متر می‌رسد. روی محیط کشت MA شعاع پرگنه پس از چهار روز در دمای 25 درجه سانتی‌گراد به 47 میلی‌متر می‌رسد. سطح زیرین پرگنه بی‌رنگ است و هیچ بویی از آن متصاعد نمی‌شود. کنیدیوفورها از نوع بخش *Pachybasium* و دارای طویل‌شدگی‌های نازای انتهایی یک یا چند شاخه هستند که گاهی به یک فیالید ختم می‌شوند. انشعابات فرعی غالباً به صورت جفتی و متقابل قرار می‌گیرند. فیالیدها متورم و کوتاه و اندازه آن‌ها $2-2/6 \times 3/6-4/7$ میکرومتر است. کنیدیوم‌ها بیضوی دارای سطح صاف و $3-4 \times 2/4-3$ میکرومتر اندازه دارند. مقایسه توالی نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S آن از طریق جستجوی بلاست نشان داد که جدایه‌های این گونه با $98/9$ درصد شباهت، بیشترین شباهت را به آنامورف *Hypocrea lixii* جدایه DAOM 231617 دارد. همچنین با مقایسه توالی نواحی ITS1، ITS2 و ژن 5.8S در برنامه Oligonucleotide Barcode (موجود در سایت ISTH) نیز این گونه با *T. harzianum/H. lixii* شبیه بود، ولی بر اساس تفاوت‌های بارز مورفولوژیکی، این جدایه



شکل ۵- *Trichoderma* sp.: a. پرگنه روی OA، b. جوش کنیدیومی جوان، c و d. کنیدیوم‌ها، e و f. کنیدیوفورها و فیالیدها.

Fig. 5. *Trichoderma* sp.: a. colony on OA medium, b. pustule, c & d. conidia, e & f. conidiophores and phialides.



شکل ۶- *Trichoderma* sp.: a. کنیدیوم‌ها، b. کنیدیوفورها و فیالیدها.
 Fig. 6. *Trichoderma* sp.: a. conidia, b. conidiophores and phialides.

نمی‌تواند *T. harzianum/H. lixii* باشد. همچنین با هیچ‌یک از گونه‌هایی که تا کنون در بخش *Pachybasium* شرح داده شده شباهت ندارد. بنابراین، احتمالاً گونه‌ای هنوز توصیف نشده است. دو جدایه از این گونه از خاک جنگل و مزرعه گندم از گردنه حیران در استان گیلان به دست آمد.

بخش *Longibrachiatum*

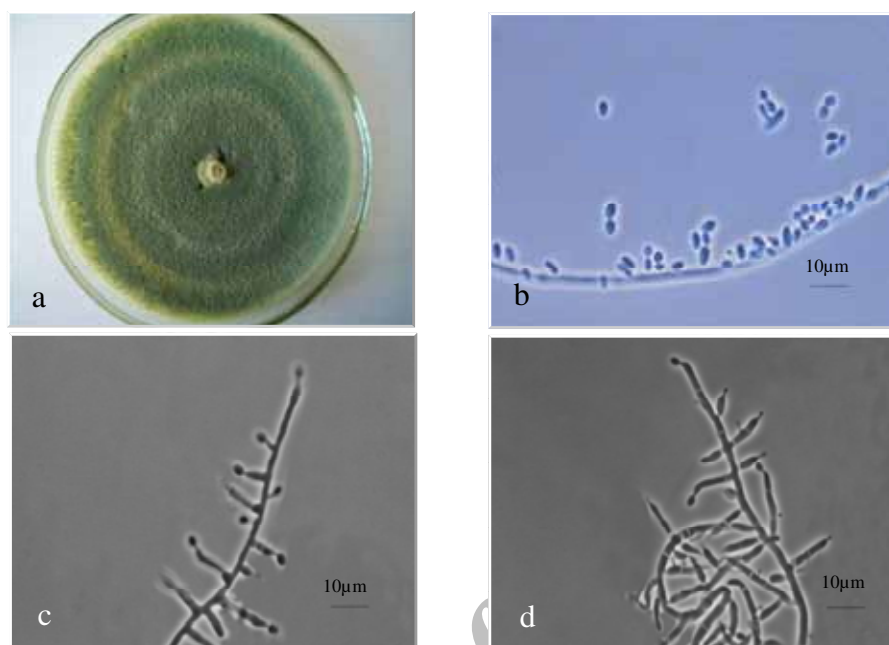
رشد پرگنه در گونه‌های این بخش سریع بوده و سطح زیرین آن معمولاً زرد مایل به سبز می‌باشد. محور اصلی کنیدیوفور بلند و دارای انشعابات کم تراکم و نامنظم می‌باشد. انشعابات اولیه غالباً کوتاه و نامنظم بوده و به ندرت دارای انشعاب ثانویه هستند. فیالیدها بیشتر به صورت منفرد و نامنظم دیده می‌شوند و ندرتاً به صورت دسته‌های چندتایی و فراهم ظاهر می‌گردند که ویژگی اخیر به ویژه در نوک کنیدیوفورها مشهودتر است. فیالیدها آمپولی شکل یا استوانه‌ای و کشیده می‌باشند. کنیدیوم‌ها سبز رنگ و شکل آن‌ها بیضوی یا واژتخم‌مرغی بوده و دارای دیواره صاف هستند، ولی در بعضی از گونه‌ها در سطح کنیدیوم زواید بالمانندی دیده می‌شود. یکی از خصوصیات این بخش تولید فیالید میانی است. فیالید میانی در واقع روزنه

فیالیدی مهمیز مانند است که زیر دیواره جداکننده فیالید انتهایی تشکیل می‌شود. البته فیالیدهای میانی در بخش‌های دیگر هم وجود دارند ولی عمومیت ندارند.

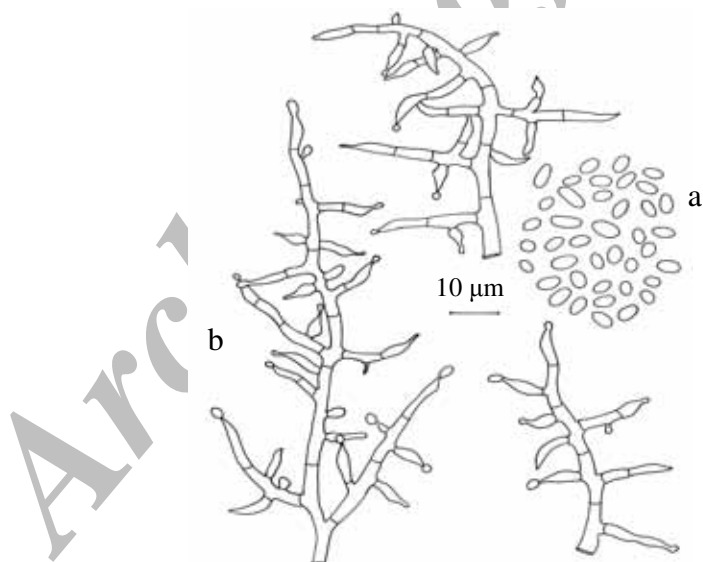
Trichoderma reesei E.G. Simmons, Abstr. Sec. Int. Mycol. Cong. Vol. M-Z .
P. 618, 1977

(شکل‌های ۷ و ۸)

در محیط کشت PDA ریشه‌ها در دمای پایین‌تر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد به صورت خطوط شعاعی در پرگنه ظاهر می‌شوند. ریشه‌های هوایی پنبه‌ای تشکیل نمی‌شوند. در دماهای مختلف رنگ‌دانه زرد تولید می‌شود. کنیدیوم‌زایی بعد از ۴۰ ساعت در دمای ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد کم بوده یا اصلاً صورت نمی‌گیرد و در دمای ۳۵ یا ۴۰ درجه سانتی‌گراد عموماً به صورت یک صفحه مرکزی سبز تا سبز تیره و یک حلقه باریک به رنگ سبز تیره می‌باشد. در محیط کشت CMD کنیدیوفورها در طول ریشه‌های هوایی تشکیل می‌شوند و کنیدیوم‌زایی اغلب به صورت دواير متحدالمرکز عریض می‌باشد و گاهی تولید توده‌های کنیدیومی با قطر کمتر از ۰/۵ میلی‌متر می‌نمایند. نوک محور اصلی کنیدیوفور در حدود ۵۰ میکرومتر بدون انشعاب است و فقط فیالیدهای منفرد روی آن تشکیل می‌شود. شاخه‌های فرعی اولیه به ندرت منشعب می‌شوند. فیالیدها اغلب به صورت منفرد بوده و به صورت دسته‌ای به ندرت یا اصلاً تشکیل نمی‌شوند. فیالیدها استوانه‌ای یا اغلب کمی در وسط عریض‌ترند و عموماً به صورت مستقیم بوده و به صورت قلاب‌دار یا موجی‌شکل دیده نمی‌شوند. اندازه فیالیدها $۲/۵-۳/۵ \times ۵/۵-۹/۲$ میکرومتر می‌باشد. دارای فیالیدهای میانی بوده و نزدیک نوک محور زایای کنیدیوفور فیالیدها به تعداد نسبتاً کم وجود دارند. کنیدیوم‌ها کشیده تا بیضی بوده و اندازه آن‌ها $۲/۴-۳/۲ \times ۴-۵/۲$ میکرومتر می‌باشد. کلامیدوسپورها به شکل‌های کروی تا نیم‌کروی، کم و بیش روی محیط CMD تشکیل می‌شوند. در محیط کشت SNA کنیدیوم‌زایی بعد از ۲۴-۴۰ ساعت در دمای ۲۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد به کندی صورت می‌گیرد و در دمای ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد کم می‌باشد. کنیدیوم‌زایی به طور یکنواختی روی ریشه‌های هوایی صورت می‌گیرد و یا به صورت توده‌های کنیدیومی پنبه‌ای، پراکنده و کوچک ظاهر می‌شود. تکنیک‌های مولکولی مختلف ارتباط نزدیک *H. jecorina* و *T. reesei* را ثابت کرده‌اند (ساموئلز و همکاران ۱۹۹۴، لاکمن و همکاران ۱۹۹۶، کولز و همکاران ۱۹۹۶، کولز و همکاران ۱۹۹۶) با استفاده از آنالیز توالی DNA و آنالیز RAPD ثابت کردند که *T. reesei* آنامورف *H. jecorina* است. در این تحقیق دو جدایه از این گونه از روی چوب پوسیده و بقایای گیاهی از جویبار ساری جدا و شناسایی گردیدند.



شکل ۷- *T. reesei*: a. پرگنه روی محیط OA، b. کنیدیومها، c و d. کنیدیوفورها و فیالیدها.
 Fig. 7. *T. reesei*: a. colony on OA medium, b. conidia, c & d. conidiophores and phialides.

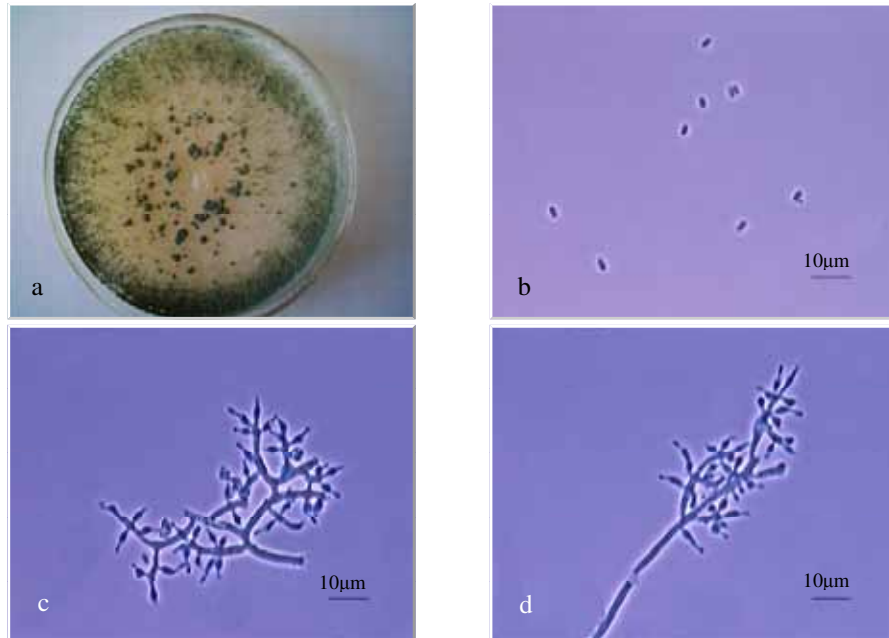


شکل ۸- *T. reesei*: a. کنیدیومها، b. کنیدیوفورها و فیالیدها.
 Fig. 8. *T. reesei*: a. conidia, b. conidiophores and phialides.

Anamorph of *Hypocrea andinensis* Samuels & O. Petrini, Stud. Mycol. 41: 13-14, 1998

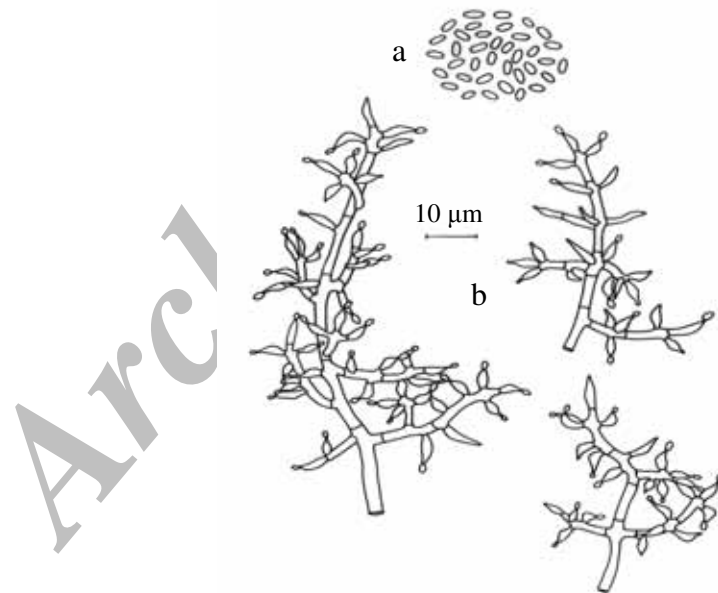
(شکل‌های ۹ و ۱۰)

پرگنه روی محیط کشت PDA در دمای ۳۰-۲۰ درجه سانتی‌گراد ریشه‌های هوایی پنبه‌ای به رنگ سفید تولید می‌کند. در دمای ۲۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد تقریباً فاقد کنیدیوم‌زایی بوده اما با افزایش دما به ۳۵ درجه سانتی‌گراد کنیدیوم‌زایی صورت می‌گیرد به طوری که بعد از ۶۵ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد کنیدیوم‌ها در دسته‌های متصل به هم به صورت دواير متحدالمرکز و به رنگ سبز تیره تشکیل می‌شوند. پرگنه‌ها روی محیط کشت SNA تقریباً غیر قابل رؤیت می‌باشند. کنیدیوم‌ها بعد از ۶۵ ساعت در دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد تولید می‌شوند و بیشترین میزان کنیدیوم‌زایی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد است. روی محیط کشت CMD کنیدیوفورها به صورت دواير متحدالمرکز در دسته‌های متراکم تشکیل می‌شوند. محور اصلی کنیدیوفور در نوک زایا بوده و به صورت دسته‌ای فیالید تولید می‌کند و فواصل بین انشعابات کوتاه می‌باشد. فیالیدها به ندرت به صورت منفرد دیده می‌شوند و در وسط عریض می‌باشند ولی وقتی که در دسته‌های دور از هم تشکیل می‌شوند گاهی به صورت متورم دیده می‌شوند. فیالیدها گاهی به صورت استوانه‌ای دیده می‌شوند، به خصوص وقتی که منفرد یا انتهایی هستند. طول آن‌ها ۵/۲-۷/۷ میکرومتر و در عریض‌ترین قسمت ۲/۷-۳/۵ میکرومتر عرض دارند. فیالیدها هیچ وقت قلاب‌دار یا موجی شکل نیستند. فیالیدهای میانی رایج نیستند. کنیدیوم‌ها به شکل کشیده با دیواره صاف یا دارای زگیل‌های بسیار ظریف و اندازه ۱/۸-۲/۲ × ۴-۵/۹ میکرومتر تولید می‌شوند. کلامیدوسپورها به تعداد زیاد به شکل کروی تا نیم‌کروی با اندازه ۸/۰-۶/۰ میکرومتر به صورت انتهایی یا میانی وجود دارند. آنامورف *H. andinensis* به لحاظ رشد سریع روی محیط‌های کشت PDA و SNA به خصوص در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و همچنین رشد ضعیف آن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد از سایر گونه‌ها متمایز می‌شود. محورهای زایای کنیدیوفور در آنامورف *H. andinensis* به میزان زیادی منشعب می‌شود و فیالیدهای تکی نسبت به سایر اعضای کمپلکس *H. schweinitzii* بسیار کم وجود دارند. در بین اعضای این کمپلکس بیشترین شباهت را به *T. pseudokoningii* دارد ولی از نظر میزان رشد در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد با هم تفاوت دارند. همچنین در آنامورف *H. andinensis* کنیدیوم‌ها باریک‌تر می‌باشند. کنیدیوم‌های آنامورف *H. andinensis* اغلب صاف بوده ولی گاهی ممکن است زگیل‌های ظریفی نیز تشکیل دهند. بنابراین، مثل کنیدیوم‌های *T. ghanense* به نظر می‌رسند (ساموئلز و همکاران ۱۹۹۸). آنامورف *H. andinensis* همچنین به *T. koningii* نیز شباهت دارد (لیک‌فلد و همکاران ۱۹۹۸). در هر دو کمپلکس *H. schweinitzii* و *T. koningii* کنیدیوم‌ها کشیده تا بیضوی می‌باشند، ولی وجود فیالیدهای میانی هر چند به تعداد کم در آنامورف *H. andinensis* باعث شده که این گونه در



شکل ۹- آنامورف *H. andinensis*: a. پرگنه روی محیط OA، b. کنیدیومها، c و d. کنیدیوفورها و فیالیدها.

Fig. 9. Anamorph of *H. andinensis*: a. colony on OA medium, b. conidia, c & d. conidiophores and phialides



شکل ۱۰- آنامورف *H. andinensis*: a. کنیدیومها، b. کنیدیوفورها و فیالیدها.

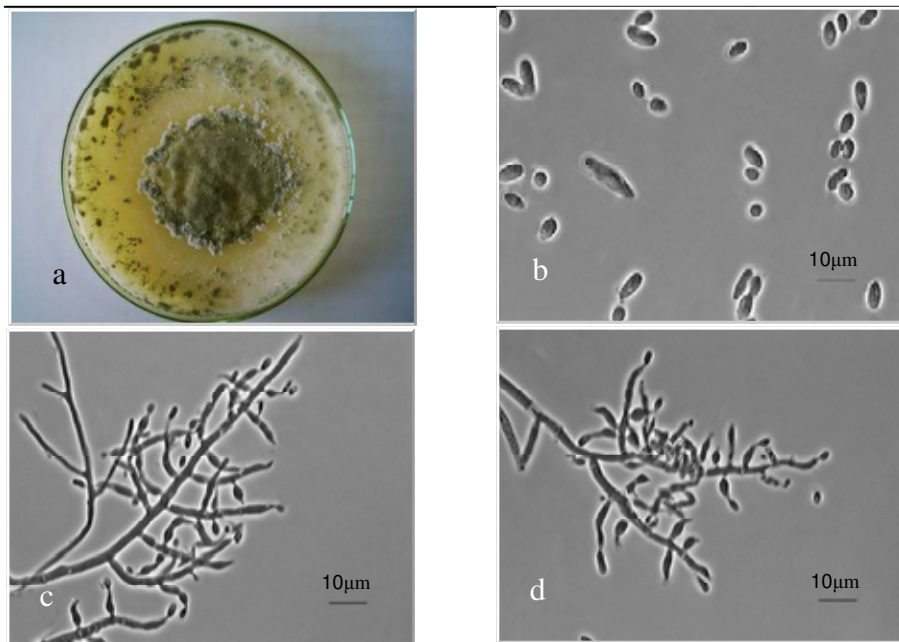
Fig. 10. Anamorph of *H. andinensis*: a. conidia, b. conidiophores and phialides.

کمپلکس *H. schweinitzii* قرار گیرد. اندازه کنیدیوم‌های این جدایه از نظر طول کمی بلندتر از اندازه‌های توصیف شده توسط ساموئلز و همکاران (۱۹۹۸) می‌باشد ولی بر اساس سایر مشخصات مورفولوژیکی و آزمون دمایی به عنوان آنامورف *H. andinensis* تشخیص داده شد. یک جدایه از این گونه از چوب افتاده در منطقه ماسال (رشت) به دست آمد.

Anamorph of *Hypocrea orientalis* Samuels & O. Petrini, Stud. Mycol. 41: 30-36, 1998

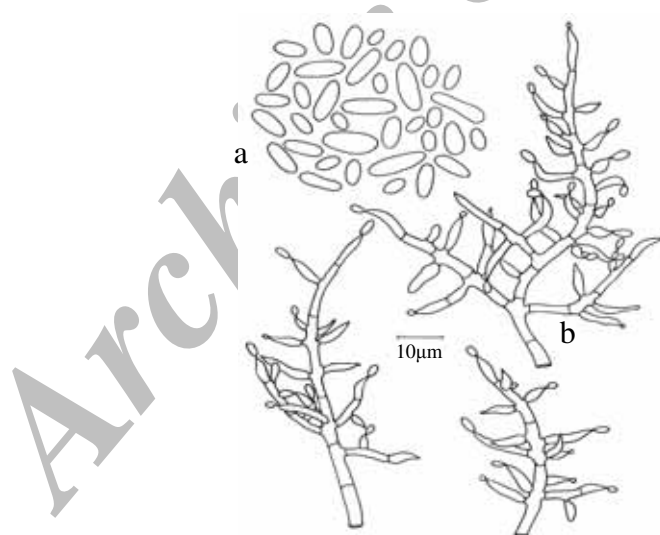
(شکل‌های ۱۱ و ۱۲)

روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد ریشه‌های هوایی به صورت پنبه‌ای یک‌دست تشکیل می‌شوند. در دمای ۲۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد کنیدیوم‌زایی صورت نمی‌گیرد ولی در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اغلب کنیدیوم‌زایی زیاد بوده و به صورت دوایر متحدالمرکز و به رنگ سبز تیره‌اند. روی محیط کشت CMD کنیدیوفورها، تشکیل دسته‌های سست، کوچک و پراکنده را می‌دهند. محور اصلی کنیدیوفور در حدود ۴۵ میکرومتر از نوک بدون انشعاب بوده و فقط فیالیدهای منفرد روی آن تشکیل می‌شود. انشعابات ثانویه بلندتر بوده و خیلی کم منشعب می‌شوند. به طور کلی فیالیدها به صورت منفرد تشکیل می‌شوند ولی گاهی نیز به صورت دسته‌ای دیده می‌شوند. فیالیدها اغلب مستقیم و به ندرت قلاب‌دار یا موجی شکل می‌باشند و در وسط نیز عریض نمی‌شوند و اندازه آن‌ها $2/5-3/5 \times 7/0-12/0$ میکرومتر می‌باشد. فیالیدهای میانی نیز در آن‌ها تشکیل می‌شود. کنیدیوم‌ها به شکل کشیده تا بیضی و اندازه آن‌ها $2/7-3/5 \times 5/9-11/2$ میکرومتر می‌باشد. کلامیدوسپورها وقتی که انتهای هستند به شکل کروی تا نیم‌کروی و وقتی که میانی هستند با شکل سلول تشکیل دهنده مطابقت دارند و قطر آن‌ها $6/0-8/7$ میکرومتر می‌باشد. روی محیط کشت SNA کنیدیوم‌زایی در دمای ۳۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد روی ریشه‌های هوایی و به طور پراکنده در سراسر پرگنه صورت می‌گیرد. کنیدیوم‌زایی اغلب در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد. آنامورف *H. orientalis* جزیی از یک گونه کمپلکس است که شامل *T. longibrachiatum* می‌شود. اگرچه آنامورف *H. orientalis* از لحاظ فنوتیپی با داشتن کنیدیوم‌های بزرگ‌تر، از *T. longibrachiatum* متمایز می‌شود ولی این دو گونه از لحاظ ژنتیکی بسیار به هم نزدیک می‌باشند و حداکثر در دو جفت باز در ناحیه ITS1 و سه جفت باز در ناحیه ITS2 با هم تفاوت دارند (کولز و همکاران ۱۹۹۷). آنامورف *H. orientalis* نسبت به *T. longibrachiatum* دارای کنیدیوم‌های بزرگ‌تر و رشد کمتر به خصوص در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد است. در حالی که تولید رنگ‌دانه زرد مشخصه *T. longibrachiatum* است، از بین استرین‌های *H. orientalis* فقط یک استرین شدیداً رنگ‌دانه زرد تولید می‌کند (ساموئلز و همکاران ۱۹۹۸)، ولی توانایی تولید رنگ‌دانه توسط سایر جدایه‌های آن رد نمی‌شود. در جدایه



شکل ۱۱- آنامورف *H. orientalis*: a. پرگننه روی محیط OA، b. کنیدیومها، c و d. کنیدیوفورها و فیالیدها.

Fig. 11. Anamorph of *H. orientalis*: a. colony on OA medium, b. conidia, c & d. conidiophores and phialides.



شکل ۱۲- آنامورف *H. orientalis*: a. کنیدیومها، b. کنیدیوفورها و فیالیدها.

Fig. 12. Anamorph of *H. orientalis*: a. conidia, b. conidiophores and phialides.

مورد مطالعه در این بررسی نیز تولید رنگ‌دانه مشاهده شد. در این گونه فیالیدهای میانی دیده می‌شود، ولی مثل *T. longibrachiatum* و آنامورف *H. jecorina* فراوان نیستند. با وجود شباهت‌های ژنتیکی و فنوتیپی بارز بین *T. longibrachiatum* و آنامورف *H. orientalis* به اندازه کافی تفاوت بین آن‌ها وجود دارد که به عنوان دو گونه مجزا در نظر گرفته شوند، اگرچه *H. orientalis* تا کنون نزدیک‌ترین تلئومورف برای *T. longibrachiatum* است. در این تحقیق یک جدایه از این گونه بر اساس مطالعات مورفولوژیکی و آزمون دمایی شناسایی گردید. یک جدایه از این گونه از چوب افتاده در منطقه کلاچای (زیاز) به دست آمد.

منابع

جهت ملاحظه منابع به متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: فاطمه نظمی رودسری و دکتر دوستمراد ظفری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا؛ دکتر سیداکبر خداپرست، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان و دکتر حمید روحانی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

Archive of SID

References

- BAILEY, B.A. and LUMSDON, R.D. 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Harman, G.E. and Kubicek, C.P. (eds). Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis Ltd. London, UK. pp. 185-203.
- BISSETT, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. Can. J. Bot. 62: 924-931.
- BISSETT, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69: 2357-2372.
- BISSETT, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachyasium*. Can. J. Bot. 69: 2418-2420.
- BISSETT, J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Addition notes on section *Longibrachiatum*. Can. J. Bot. 66: 2418-2420.
- BISSETT, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Can. J. Bot. 70: 639-641.
- BISSETT, J., SZAKACS, G., NOLAN, G.A., DRUZHININA, I., GRADINER, C. and KUBICEK, CH. P. 2003. New species of *Trichoderma* from Asia. Can. J. Bot. 81: 570-586.
- CHAVERRI, P., SAMUELS, G.J. and STEWART, E.L. 2001. *Hypocera virens* sp. nov. the teleomorph of *Trichoderma virens*. Mycologia 93: 1113-1124.
- CHAVERRI, P., CASTLEBURY, L.A., OVERTON, B.E. and SAMUELS, G.J. 2003. *Hypocrea/Trichoderma*: species with conidiophore elongations and green conidia. Mycologia 95: 1100-1140.
- DAVET, P. 1979. A technique for analyzing soil populations of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. Ann. Rev. Phytopath. 11: 529-534.
- DODD, S., CROWHURST, R.N., RODRIGO, A.G., SAMUELS, G.J., HILL, R.A. and STEWART, A. 2000. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. Mycol. Res. 104: 23-34.
- DODD, S., CROWHURST, R.N., RODRIGO, A.G., SAMUELS, G.J., HILL, R.A. and STEWART, A. 2003. Examination of *Trichoderma* phylogenies derived from ribosomal DNA sequence data. Mycol. Res. 4: 32-39.

- DRUZHININA, I.S., KOPCHINSKY, A.G., KOMON, M., BISSETT, J., SZAKACS, G. and KUBICEK, C.P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. *Fung. Genet. Boil.* 42: 813-828.
- ELAD, Y. and CHET, I. 1983. Improved selective medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica* 11: 55-58.
- GAMS, W. and BISSETT, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: KUBICEK, C.P. and HARMAN, G.E. (eds). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis, London, UK. pp. 3-34.
- HOLMES, K.A., SCHROERS, H. J., THOMAS, S.E., EVANS, H.C. and SAMUELS, G.J. 2004. Taxonomy and biocontrol potential of a new species of *Trichoderma* from the Amazon basin of south America. *Mycol. Prog.* 3: 199-210.
- JAKLITSCH, W.M., SAMUELS G.J., DODD, S., LU, B.S. and DRUZHININA, I.S. 2006. *Hypocrea rufa/Trichoderma viride*: a reassessment and description of five closely related species with and without warted conidia. *Stud. Mycol.* 55: 135-177.
- KRAUS, G.F., DRUZHININA, I., GAMS, W., BISSETT, J., ZAFARI, D., SZAKACS, G., KOPTCHINSKI, A., PRILLINGER, H., ZARE, R. and KUBICEK, C.P. 2004. *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. *Mycologia* 96: 1059-1073.
- KUHLS, K., LIECKFELDT, E., SAMUELS, G.J., KOVACS, W., MEYER, W., PETRINI, O., GAMS, W., BÖRNER, T. and KUBICEK, C.P. 1996. Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 93: 7755-7760.
- KUHLS, K., LIECKFELDT, E., SAMUELS, G.J., BÖRNER, T., MEYER, W. and KUBICEK, C.P. 1997. Revision of *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum* including related teleomorphs based on analysis of ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *Mycologia* 89: 442-460.
- KUBICEK, C.P. and PENTTILÄ, M.E. 1998. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P. and

- Harman, G.E. (eds). *Trichoderma* and *Gliocladium*: Enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis Ltd. London UK. pp. 49-71.
- KULLNIG, C.M., SZAKACS, G. and KUBICEK, C.P. 2000. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. *Mycol. Res.* 104: 1117-1125.
- KULLNIG-GRADINGER, C.M., SZAKACS, G. and KUBICEK, C.P. 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycol. Res.* 106: 757-767.
- LIECKFELDT, E., SAMUELS, G.J. and GAMS, W. 1998. Neotypification of *Trichoderma koningii* and its *Hypocrea koningii* teleomorph. *Can. J. Bot.* 76: 1507-1522.
- LIECKFELDT, E., CAVIGANAC, Y., FEKETE, C. and BÖRNER, T. 2000. Endochitinase gene-based phylogenetic analysis of *Trichoderma*. *Microbiol. Res.* 155: 7-15.
- OVERTON, B.E., STEWART, E.L. and GEISER, D.M. 2006a. Systematics of *Hypocrea citrina* and related taxa. *Stud. Mycol.* 56: 1-38.
- OVERTON, B.E., STEWART, E.L. and GEISER, D.M. 2006b. Taxonomy and phylogenetic relationships of nine species of *Hypocrea* with anamorphs assignable to *Trichoderma* section *Hypocreanum*. *Stud. Mycol.* 56: 39-65.
- RIFAI, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycol. Pap.* 116: 1-56.
- ROSSMAN, A.Y. 1996. Morphological and molecular perspectives on systematics of *Hypocreales*. *Mycologia* 88: 1-19.
- SAMUELS, G. J., PETRINI, O. and MANGUIN, S. 1994. Morphological and macromolecular characterization of *Hypocrea schweinitzii* and its *Trichoderma* anamorph. *Mycologia* 86: 421-435.
- SAMUELS, G.J. 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100: 923-935.
- SAMUELS, G.J., PETRINI, O., KUHL, K., LIECKFELDT, E. and KUBICEK, C.P. 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Stud. Mycol.* 41: 1-54.

-
- SAMUELS, G.J., LIECKFELDT, E. and NIRENBERG, H.I. 1999. *Trichoderma asprellum* a new species with warted conidia and redescription of *T. viride*. *Sydowia* 51: 71-88.
- SAMUELS, G.J., PARDO-SCHULTHEISS, R., HEBBAR, K.P., LUMSDEN, R.D., BASTOS, C.N., COSTA, J.C. and BEZERRA, J.L. 2000. *Trichoderma stromaticum* sp. nov. a parasite of the cacao witches broom pathogen. *Mycol. Res.* 104: 760-764.
- SAMUELS G.J., DODD, S., LU, B.S., PETRINI, O., SCHROERS, H.J. and DRUZHININA, I.S. 2006. The *Trichoderma koningii* aggregate species. *Stud. Mycol.* 56: 67-133.
- SIVASITHAMPARAM, K. and GHISALBERTI, E.L. 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. In: Kubicek, C.P. and Harman, G.E. (eds). *Trichoderma and Gliocladium: Basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor & Francis Ltd. London, UK. pp. 131-191.
- ZAFARI, D., ZARE, R., ERSHAD, D. and ALIZADEH, A. 2003. A contribution to the identification of *Trichoderma* species in Iran. *Iran. J. Pl. Path.* 38: 9-15.
- ZAFARI, D., ZARE, R., ERSHAD, D. and ALIZADEH, A. 2004. Introduction of three new species of *Trichoderma* for mycoflora of Iran. *Rostaniha* 5: 63-65.