معرفی گونههای جدیدی از تریکودرما برای ایران\*

Introducing some new species of Trichoderma for Iran

فاطمه نظمی رودسری، دوستمراد ظفری<sup>\*\*</sup>، سیداکبر خداپرست و حمید روحانی دانشگاه بوعلیسینا، دانشگاه گیلان و دانشگاه فردوسی

دریافت: ۱۳۸۵/۱۱/۲۴

یذیرش: ۱۳۸۶/۲/۱

چکىدە

در ایسن بررسی، از بسیش از ۸۰۰ نمونیه خاک و چوب پوسیده جمع آوری 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 قبلا از ایران گزارش شده richoderma sp. و ۲۰ محمول مناسایی گردید که هفت گونه آنها قبلا از ایران گزارش شده بودند. از شش گونه دیگر، گونههای Trichoderma ceramicum و آنامورف متعلق به بخش Pachybasium و گونههای T. reesei آنامورف و آنامورف متعلق به بخش Hypocrea andinensis گونههای 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 ارایه شده بـه دانشـکده 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). *ريفای* (Rifai 1969) و *بیست* (Bissett 1991a) خصوصيات مورفولوژيکی مورد استفاده در توصيف و تشخيص گونههاي تريكودرما را شرح دادهاند. هر دو محقق به وجود مشكلاتي در تعیین گونههای مورفولوژیک تریکودرما اشاره کردهاند. *ساموئلز* (۱۹۹۶) هم مشاهدات و تفاسیر مفصلی راجع به استفاده از ویژگیهای ریختشناختی در تعیین گونههای تریکودرما ارایه 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 *بی ست* (۱۹۹۱ه، ۱۹۹۱، ۱۹۹۲، ۱۹۹۲، ۱۹۹۲) را تا حدود زیادی تأیید کردهاند و علاوه بر این، گونههای T. aggressivum T. asperellum و T. aggressivum T. erinaceum J. rossicum J. cerinum کونههای (Samuels et al. 1999, 2000)، گونههای (Bissett et al. 2003) T. taiwanense , T. velutinum .T. helicum .T. effusum (Holmes et al. 2004) T. brevicompactum و (Holmes et al. 2004) T. ovalisporum معرفی و به گونههای قبلی اضافه نمودهاند. *اورتون* و همکاران (Overton et al. 2006 a,b)، *يكليچ* و همكاران (Jaklisch *et al.* 2006) و *سامويلز* و همكاران (Samuels *et al.* 2006) بيش از ۲۰ گونه جدید برای تریکودرما و Hypocrea معرفی نمودند. در ایران در مجموع تا کنون T. harzianum T. inhamatum T. koningii T. asperellum گونه از تریکودرما شامل ۲. T. longibrachiatum T. saturnisporum T. tomentosum T. citrinoviride T. hamatum T. atroviride ،T. ghanense و T. spirale معرفي 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 یرگنهها و مشخصات میکروسکویی آنها شامل شکل، اندازه و سایر ویژگیهای کنیدیوفورها، فياليدها، كنيديومها، كلاميدوسپورها و ريسهها مورد مطالعه قرار گرفت. جدايهها روى محیطهای OA (آرد یولاف آگار)، MA (مالت آگار) و PDA (سیب زمینی- دکستروز- آگار) در دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی گراد 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 میکروسکویی و اندازه گیری، 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 ۷۴ روز بعد از کشت ثبت شد. تصاویر میکروسکویی 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، ITS1 و ژن 5.85 به انستیتوی ملی بیوتکنولوژی کشاورزی کره جنوبی فرستاده شدند که نتایج آن در شرح این گونهها آمده است.

#### نتيجه و بحث

در این بررسی در مجموع ۶۹ جدایه تریکودرما متعلق به بخش Longibrachiatum و در این بررسی در مجموع ۶۹ جدایه تریکودرما متعلق به بخش Icongibrachiatum داده شد. ۲۴۸ جدایه از بخش Pachybasium به دست آمد که ۲۱ گونه در بین آنها تشخیص داده شد. در بین گونههای شناسایی شده هفت گونه و ایران گزارش شده بودند (Zafari et al. 2003, 2004) و شش گونه که برای میکوفلور ایران جدید می باشند در این مقاله گزارش می شوند. لازم به ذکر است، گونه ای که تحت عنوان spichoderma sp. نام برده می شود 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 بی نگ یا زرد تا قهوهای رنگ می باشد. کنیدیومزایی به صورت پراکنده، دستهای یا جوشهای متراکم می باشد. گونههای این بخش دارای کنیدیوفورهای ستبر و غیر قابل انعطاف با انشعابات فراهم فراوان می باشند. 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 می آورند. نوک محور اصلی کنیدیوفور در تعدادی از گونههای این بخش نازا می باشد و گاهی با یکدیگر آناستوموز تشکیل می دهند. فیالیدها در این بخش آمپولی شکل و غالباً در دستههای ۲-۲ تایی و به صورت فشرده و فراهم روی کنیدیوفورها تولید می شوند. کنیدیومها به اشکال نیم کروی، بیضوی تا واژ تخم مرغی و به رنگ سبز، قهوهای یا بی رنگ 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 سانتی گراد ۹۱–۵ میلی متر، در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد ۲۷–۱۶ میلی متر، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد ۵۰–۳۵ میلی متر و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد ۵۷–۴۱ میلی متر بوده و در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد هیچ رشدی ندارد. اندازه فیالیدها ۲/۵–۲/۲ × ۶/۲–۶/۶ میکرومتر می باشد. کنیدیومها به رنگ سبز، دارای سطح صاف و بیضوی بوده، اندازه آن ها - ۲/۲ × ۳/۳–۲/۶ میکرومتر می باشد 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 بررسی های مولکولی بویژه که جدایه این گونه بیشترین شباهت را به Trichoderma ceramic دارد، لذا به نظر می رسد که دامنه تغییرات مورفولوژیکی این گونه بیشتر از دامنه اشاره شده توسط چاوری و ساموئلز که دامنه تغییرات مورفولوژیکی این گونه بیشتر از دامنه اشاره شده توسط چاوری و ساموئلز

(شکلهای ۳ و ۴) Trichoderma crassum Bissett, Can. J. Bot. 69: 2376-2379, 1991 (۴ و ۴) پرگنهها رشد بسیار سریعی دارند. پس از سه روز قطرشان به ۶۵-۵۰ میلیمتر میرسد. ریسههای هوایی به صورت کرکی تا پشمی و مایل به خاکستریاند. کنیـدیومزایـی روی محیط کشت MA بـه میـزان زیـاد بـه صـورت چسبیده بـه محیط اسـت کـه در ایـن حالـت مایـل



شكل c. الم و b. OA برگنه روی d. كنيديومها، c. و b. كنيديوفورها و فياليدها. Fig. 1. *T. ceramicum*: a. colony on OA medium, b. conidia, c & d. conidiophores and phialides.



شكل a :*T. ceramicum* –۲. كنيديومها، b. كنيديوفورها و فياليدها. Fig. 2. *T. ceramicum*: a. conidia, b. conidiophores and phialides.



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



شكل b. كنيديومها، b. كنيديومها، a :T. crassum -۴ شكل 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 می شود. روی محیط کشت PDA تر شحات متمایل به زرد کمرنگ به صورت قطرات کوچکی روی ریسههای هوایی ایجاد می شود. سطح زیرین پرگنه بیرنگ یا به تدریج به زرد خاکستری تا تقریباً قهـوهای تبـدیل مـیشـود. هـیچ بـویی از یر گنه متصاعد نمی شود. ریسه ها بی رنگ بوده و دیواره آن ها صاف می باشد ولی گاهی ضخامت دیواره غیر یکنواخت است. کلامیدوسـپورها بسـیار فـراوان بـوده و در کشـتهـای جـوان غالبـاً به صورت انتهایی روی انشعابات کوتاه ریسههای هوایی تشکیل می شوند و در نهایت ممکن است هم به صورت انتهایی و هم به صورت میانی دیده شوند. کلامیدوسیورها به صورت منفرد به اشکال نیم کروی تا بیضوی یا گلابی شکل، به قطر ۱۷-۶ میکرومتر، تقریباً بیرنگ تا مایل به خاکستری روشن، دارای دیواره صاف به ضخامت یک میکرومتـر وجـود دارنـد و در بعضـی از جدایهها محتویات داخل کلامیدوسیور به صورت گرانولهای زبر به نظر می سد. کنیدیوفورها بیرنگ با دیواره صاف، در مناطقی که کنیدیومزایی به صورت چسبیده به محیط است فیالیدها به صورت منفرد یا در دستههای ۴-۲ تایی روی انشعابات جانبی کوتاه ریسههای هوایی تشکیل می شوند. کنیدیوفورهادر داخل جوشها به صورت مستقیم، ایستاده و خشن بوده و نزدیک به پایه تا ۲ میکرومتر قطر دارند که به تدریج باریکتر شده و در اکثر نقاط عرض آن ها به ۵/۵–۵/۵ میکرومتر میرسد. شاخهزایی به صورت نامنظم بوده و انشعابات اولیه با زاویه راست منشعب می شوند و کم و بیش به سمت نوک کنیدیوفور انحنا می یابند و طول انشعابات به سمت پایه کنیدیوفور افزایش می یابد. انشعابات به صورت منفرد یا در دسته های دو یا سه تایی می باشند. انشعابات اولیه مجدداً یک یا دو بار منشعب می شوند. 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 می گیرد که به تدريج قطر آنها باريک شده و از ۵–۳/۵ ميکرومتر به حدود ۱/۵ ميکرومتر در نوک ميرسـد. نوک آنها گرد بوده و به طور مشخصی دارای دیواره عرضی هستند و فواصل بین دیوارهها معمولاً ۴۵-۱۵ میکرومتر بوده ولی به سمت نوک، دیوارهها به هم نزدیک ترند. نوک آن ها اغلب نازا بودہ ولی در کشتھای مسنتر نوک آنھا ممکن است ہے یک فیالید منفرد کے و بیش درفشی (نوکدار) به طول ۲۰ میکرومتر و به ندرت به دستههای ۳–۲ تایی از فیالیدها منتهبی شود. فیالیدهای تشکیل شده از کنیدیوفورها آمیولی شکل، اغلب با اندازه ۴/۲-۳/۰ × ۹/۴-۴/۴ میکرومتر، در پایه دارای فرورفتگی بوده و عرض آنها در نوک به طور ناگهانی به ۱/۲ میکرومتر میرسد. فیالیدها اغلب در دستههای ۵-۲ تایی روی انشعابات انتهایی تشکیل میشوند، گاهی نیز به صورت دستهای و به ندرت به صورت تکی در طول کنیدیوفور و انشعابات ظاهر می شوند

و اغلب حالت همگرایی دارند. فیالیدهای تشکیل شده از ریسههای تمایز نیافته در منطقه کنیدیومزایی چسبیدہ به محیط، آمیولی شکل تا تنگی شکل یا درفشے (نوکدار) مے باشند. اندازه فیالیدهای جانبی ۴/۰–۲/۵ × ۲۰ میکرومتر می باشد ولی طول فیالیدهای انتهایی به ۳۰ میکرومتر نیز می سد. کنیدیومها بیضوی یهـن و اغلـب انـدازه آنهـا ۴–۳ × ۶/۵–۴ میکرومتـر 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 باریک ترند، دیوارهآنها صاف و به رنگ سبز تیرهاند. این گونه شباهت زیادی به T. virens دارد. شکل فیالیدها و کنیدیومهای ایجاد شده از ریسههای 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 ییچیدهتری دارند و در جوشهای مسطح مشخصی تشکیل می شوند و اغلب دارای یک طویل شدگی انتهایی نازا (sterile elongation) بوده که در T. virens وجود ندارد و کنیدیومهای توليد شده از كنيديوفورها باريكتر بوده و بيشتر به شكل بيضوى تا واژتخـمرغـي مـيباشـند. کنیدیوفور در *T. flavofuscum* نیز به *T. crassum* شباهت دارد اما به آسانی با دارا بودن کنیدیومهای قهوهای از T. crassum متمایز می شود. همچنین کنیدیوفور در T. flavofuscum همیشه منشعب و در نوک زایا میباشد. از این گونه که برای میکوفلور ایران جدید می باشد، دو جدایه از خاک منطقه کردکوی و آزادشهر (گرگان) به دست آمد.

## (شکلهای ۵ و ۶). (۲richoderma sp.



e و f. كنيديوفورها و فياليدها.

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



شكل b. كنيديومها، b. كنيديومها، e. كنيديوفورها و فياليدها. Fig. 6. *Trichoderma* sp.: a. conidia, b. conidiophores and phialides.

نمی تواند T. harzianum/H. lixii با هیچیک از گونه هایی 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 می گردند 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 واژتخم مرغی بوده و دارای دیواره صاف هستند، ولی در بعضی از گونهها در سطح کنیدیوم زواید بال مانندی 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 می شود. 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 ۲ و ۸)

در محیط کشت PDA ریسهها در دمای پایین تر از ۳۵ درجـه سـانتی گـراد بـه صـورت خطوط شعاعی در پرگنه ظاهر می شوند. ریسه های هوایی پنبه ای تشکیل نمی شوند. در دماهای مختلف رنگدانه زرد تولید می شود. کنیدیومزایی بعد از ۴۰ ساعت در دمای ۳۰-۲۰ درجه سانتی گراد کم بوده یا اصلاً صورت نمی گیرد و در دمای ۳۵ یا ۴۰ درجه سانتی گراد عموماً به صورت یک صفحه مرکزی سبز تا سبز تیره و یک حلقه باریک به رنگ سبز تیـره مـیاشـد. در محیط کشت CMD کنیدیوفورها در طول ریسههای هوایی تشکیل می شوند و کنیدیومزایی اغلب به صورت دوایر متحدالمرکز عریض می باشد 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 می شود. شاخههای فرعی اولیه به نـدرت منشعب می شوند. فیالیدها اغلب به صورت منفرد بوده و به صورت دستهای بـه نـدرت یـا اصـلاً تشکیل نمی شوند. فیالیدها استوانهای یا اغلب کمی در وسط عریض ترند و عموماً به صورت مستقیم بوده و به صورت قلابدار یا موجی شکل دیده نمی شوند. اندازه فیالیدها ۲/۵–۳/۵ × ۲/۹–۵/۵ میکرومتر می باشد. دارای فیالیدهای میانی بوده و نزدیک نوک محور ایای کنیدیوفور فیالیدها به تعداد نسبتاً کم وجود دارند. کنیدیومها کشیده تا بیضوی بوده و اندازه آنها ۲/۲-۳/۲ × ۲/۲-۴ میکرومتر می باشد. کلامیدوس پورها به شکلهای کروی تا نیم کروی، کم و بیش روی محیط CMD تشکیل می شوند. در محیط کشت SNA کنیدیومزایی بعد از ۴۰-۲۴ ساعت در دمای ۳۰-۲۰ درجه سانتی گراد به کندی صورت می گیرد و در دمای ۳۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد کم می باشد. کنیدیومزایی به طور یکنواختی روی ریسه های هوایی صورت می گیرد و یا به صورت تودههای کنیدیومی پنبهای، براکنده و کوچک ظاهر می شود. 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، ۱۹۹۷). *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 یوسیده و بقایای گیاهی از جویبار ساری جدا و شناسایی گردیدند.



شكل a :*T. reesei* – ۷. كنيديومها، c و b. كنيديوفورها و فياليدها. Fig. 7. *T. reesei*: a. colony on OA medium, b. conidia, c & d. conidiophores and phialides.





Anamorph of *Hypocrea andinensis* Samuels & O. Petrini, Stud. Mycol. 41: 13-14, 1998 (شکلهای ۹ و ۱۰)

یرگنه روی محیط کشت PDA در دمای ۳۰–۲۰ درجه سانتی گراد ریسه های هوایی ینبهای به رنے سفید تولید مے کند. در دمای ۲۰ و ۲۵ درجیه سانتی گراد تقریباً فاقد کنیدیومزایی بودہ اما با افزایش دما به ۳۵ درجه سانتی گراد کنیـدیومزایـی صـورت مـی گیـرد به طوری که بعد از ۶۵ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد کنیدیومها در دسته های متصل به هم به صورت دوایر متحدالمرکز و به رنگ سبز تیره تشکیل می شوند. پرگنهها روی محیط کشت SNA تقریباً غیر قابل رؤیت می باشند. کنیدیومها بعد از ۶۵ ساعت در دمای ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی گراد تولید می شوند و بیشترین میزان کنیدیومزایی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد است. روی محیط کشت CMD کنیدیوفورها به صورت دوایر متحدالمرکز در دستههای متراکم تشکیل می شوند. محور اصلی کنیدیوفور در نوک زایا بوده و به صورت دستهای فیالید تولید می کند و فواصل بین انشعابات کوتاه می باشد. فیالیدها به ندرت به صورت منفرد دیده می شوند و در وسط عریض می باشند ولی وقتی که در دسته های دور از هم تشکیل می شوند گاهی به صورت متورم دیده می شوند. فیالیدها گاهی به صورت استوانهای دیده می شوند، به خصوص وقتی که منفرد یا انتهایی هستند. طول آنها ۷/۷–۷/۲ میکرومتر و در عریض ترین قسمت ۲/۵-۳/۵ میکرومتر عرض دارند. فیالیدها هیچ وقت قلاب دار یا موجی شکل نیستند. فیالیدهای میانی رایج نیستند. کنیدیومها به شکل کشیده با دیواره صاف یا دارای زگیلهای بسیار ظریف و اندازه ۲/۲-۱/۸ × ۹/۵-۴ میکرومتر تولید می شوند. کلامیدوسیورها به تعداد زیاد به شکل کروی تا نیم کروی با اندازه ۸/۰-۴/۰ 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 H. ۳۰ درجه سانتی گراد و همچنین رشد ضعیف آن در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد از سایر گونهها متمایز می شود. محورهای زایای کنیدیوفور در آنامورف H. andinensis به میزان زیادی منشعب می شود و فیالیدهای تکی نسبت به سایر اعضای کمیلکس 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 سانتی گراد با هـم تفـاوت دارنـد. همچنـین در آنـامورف H. andinensis كنيديومها باريكتر مىباشند. كنيديومهاى أنامورف H. andinensis اغلب صاف بودہ ولی گاھی ممکن است زگیل ھای ظریفے نیز تشکیل دھند. بنیابراین، مثل کنیدیومهای T. ghanense به نظر می رساند (ساموئلز و همکاران ۱۹۹۸). آنامورف H. andinensis همچنین به T. koningii نیز شباهت دارد (*لیکفلد* و همکاران ۱۹۹۸). در هـر دو كميلكس H. schweinitzii و T. koningii كنيديومها كشيده تا بيضوى مى باشند، ولى وجود فیالیدهای میانی هرچند به تعداد کم در آنامورف H. andinensis باعث شده کـه ایـن گونـه در



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



شكل ١٠ – آنامورف a :*H. andinensis*. كنيديومها، b. كنيديوفورها و فياليدها. 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 (شکل های ۱۱ و ۱۲)

روی محیط کشت PDA در دمای ۳۰–۲۵ درجه سانتی گراد ریسههای هوایی به صورت ینبهای یکدست تشکیل می شوند. در دمای ۲۰ و ۳۵ درجه سانتی گراد کنیدیومزایی صورت نمی گیرد ولی در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد اغلب کنیدیومزایی زیاد بوده و به صورت دوایس متحدالمرکز و به رنگ سبز تیرهاند. روی محیط کشت CMD کنیدیوفورها، تشکیل دسته های 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 می شوند. به طور کلی فیالیدها به صورت منفرد تشکیل می شوند ولی گاهی نیز به صورت دستهای دیده می شوند. فیالیدها اغلب مستقیم و به ندرت قلابدار یا موجی شکل میباشند و در وسط نیز عریض نمی شوند و اندازه آن ها ۳/۵-۲/۵ × ۱۲/۰-۷/۰ میکرومتر می باشد. فیالیدهای میانی نیز در آن ها تشکیل می شود. کنیدیومها به شکل کشیده تا بیضوی و اندازه آن ها ۲/۵-۲/۷ × ۲/۱۱-۹/۹ میکرومتر می باشد. کلامیدوسیورها وقتی که انتهایی هستند به شکل کروی تا نیم کروی و وقتی که میانی هستند با شکل سلول تشکیل دهنده مطابقت دارند و قطر آن ها ۸/۷-۶/۰ میکرومتر می باشد. روی محیط کشت SNA کنیدیومزایی در دمای ۳۵–۳۰ درجه سانتی گراد روی ریسههای هوایی و ب هطور پراکنده در سراسر پرگنه صورت می گیرد. کنیـدیومزایـی اغلـب در دمـای ۳۵ درجـه سـانتی گـراد صـورت می گیرد. آنامورف H. orientalis جزیری از یک گونیه کمیلکس است که شامل T. longibrachiatum می شود. اگرچه آنامورف H. orientalis از لحاظ فنوتیهی با داشتن کنیدیومهای بزرگتر، از T. longibrachiatum متمایز می شود ولی این دو گونه از لحاظ ژنتیکی بسیار به هم نزدیک می باشند 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 یـه T. longibrachiatum دارای کنیدیومهای بزرگتر و رشد کمتر به خصوص در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد است. در حالی که تولید رنگدانه زرد مشخصـه T. longibrachiatum اسـت، از بـین استرینهای H. orientalis فقط یک استرین شدیداً رنگدانه زرد تولید می کند (ساموئلز و همکارن ۱۹۹۸)، ولی توانایی تولید رنگدانه توسط سایر جدایههای آن رد نمی شود. در جدایـه



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



شکل ۱۲ – آنامورف a :*H. orientalis : م*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 دیـده میشود، ولـی مثـل Iongibrachiatum و آنـامورف H. jecorina فـراوان نیسـتند. بـا وجـود شـباهتهـای ژنتیکـی و فنـوتیپی بـارز بـین Iongibrachiatum و آنـامورف *H. orientalis ش*باهتهای ژنتیکی و فنـوتیپی بارز بـین به اندازه کافی تفاوت بین آنها وجود دارد که به عنوان دو گونـه مجـزا در نظـر گرفتـه شـوند، اگرچه H. orientalis تا کنون نزدیکترین تلئومورف برای I. longibrachiatum است. در ایـن 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 بوعلی سینا؛ دکتر سیداکبر خداپرست، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان و دکتر حمید روحانی، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

#### 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 *Thrichoderma*. II. Infrageneric classification. Can. J. Bot. 69: 2357-2372.
- BISSETT, J. 1991b. A revision of the genus *Thrichoderma*. III. Section *Pachyasium*. Can. J. Bot. 69: 2418-2420.
- BISSETT, J. 1991c. A revision of the genus *Thrichoderma*. 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 Revesion 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. Tailor & 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., KUHLS, 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). *Thrichoderma* 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 *Trichderma* 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.