

## مقاله کوتاه

### گزارشی از گونه‌های تریکودرمای اندوفیت از استان کردستان

مژگان روغنیان<sup>۱</sup>، جهانشیر امینی<sup>۱\*</sup>، دوستمراد ظفری<sup>۲</sup>، جعفر عبدالله‌زاده<sup>۱</sup>

۱- گروه گیاه پزشکی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

۲- گروه گیاه پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

#### چکیده

گونه‌های *Trichoderma* دارای پراکنش جهانی، خاک‌زی و قادر به رشد روی بقایای گیاهی و حتی به صورت اندوفیت روی گیاهان مختلف هستند. در این بررسی ۲۰ جدایه تریکودرما از روی میزبان‌های مختلف بدست آمد که متعلق به سه گونه *Trichoderma asperellum*، *T. atroviride* و *T. arundinaceum* بودند. این گونه‌ها با استفاده از روش‌های ضدعفونی از ریشه و از ساقه میزبان‌های مختلف جداسازی و شناسایی شدند و به عنوان گونه‌های تریکودرمای اندوفیت از استان کردستان معرفی و برای اولین بار از ایران گزارش می‌شوند.

**واژه‌های کلیدی:** اندوفیت، ایران، تاکسونومی، تریکودرما

#### مقدمه

گونه‌های جنس تریکودرما از جمله هیفومیست‌های خاک‌زی هستند که در سراسر دنیا یافت می‌شوند (Muthumeenakshi, 1996) و از دامنه وسیعی از ترکیبات به عنوان منابع کربن و نیتروژن استفاده می‌کنند (Papavizas, 1985). گونه‌های این جنس دارای پراکنش جهانی بوده و قارچ‌های خاک‌زی و در مواردی باعث پوسیدگی چوب می‌شوند (Klein & Eveleigh, 1998). گونه‌های تریکودرما غالباً در مناطق مختلف، موجودات غالب میکروفلور خاک هستند

\* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: aminijahan51@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۲/۰۸، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۱۲/۲۶

که این ممکن است به دلیل تنوع ظرفیت متابولیکی و ماهیت رقابتی آن‌ها باشد (Rossman, 1996; Samuels, 1996). در ایران، دو گونه *T. asperellum* و *Vitis sylvestris* از روی خاک (Zafari, 2003; Nazmi 2006) شناسایی و گزارش شده است. قارچ *T. atroviride* از نظر کنترل بیولوژیک دارای اهمیت زیادی می‌باشد. این گونه در ایران روی *Agaricus bisporus* (Vahabi 2005)، *Armillaria* sp. (Zafari et al., 2004)، *Daldinia concentrica*، *Stereum* sp.، *Pleurotus* sp.، *Hypoxylon* sp. (Zafari et al., 2004) *Ganoderma* sp.، *Trametes versicolor*، *Trametes* sp.، *Xylari longipes* (Ershad, 2010)، گردو (Karimi 2005) و خاک (Zafari et al., 2004; Nazmi 2006) جدا و گزارش شده است. با توجه به اینکه تا کنون در استان کردستان مطالعه ای در این مورد انجام نشده، لذا هدف از اجرای این تحقیق شناسایی تریکودرماهای اندوفیت مراتع، باغات و زمین‌های زراعی مناطق مختلف در استان کردستان است.

## مواد و روش‌ها

نمونه برداری در ماه‌های خرداد و آبان ۱۳۸۹ از ریشه پیازچه، بادمجان، پنجه مرغی و توتون و ساقه توتون از مناطق مریوان، سروآباد، مرز بشماق و بانه استان کردستان صورت گرفت. نمونه‌ها در کیسه‌های پلاستیکی تمیز به آزمایشگاه منتقل گردیدند. برای جداسازی گونه‌های تریکودرماهای اندوفیت، نمونه‌ها بعد از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت PDA کشت داده و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت یک هفته نگهداری گردید. خالص‌سازی جدایه‌های تریکودرما روی محیط کشت WA به روش نوک ریشه انجام شد. شناسایی گونه‌های تریکودرما روی محیط کشت CMD و با استفاده از کلیدهای شناسایی (Gams & Bissett 1998) و (Samuels et al. 2002) و با استفاده از سایت کمیته بین‌المللی تاکسونومی تریکودرما و هیپوکرا (ISTH) انجام شد. به منظور شناسایی جدایه‌ها در سطح گونه، مشخصات میکرومورفولوژیک آنها شامل شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های کنیدیوفورها، فیالیدها، کنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها در محیط کشت مورد مطالعه قرار گرفت. برای به دست آوردن میانگین، حداقل و حداکثر اندازه‌ها از هر یک از اندام‌های ذکر شده ۳۰ تا ۱۰۰ عدد مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. بررسی مشخصات میکرومورفولوژیک با قرار دادن نمونه‌ها در داخل یک قطره اسید لاکتیک ۲۵٪، به اضافه یک قطره رنگ آبی روی لام و مشاهده آنها با میکروسکوپ نوری صورت گرفت. اندازه‌گیری با میکروسکوپ نوری مدل لایتز مجهز به عدسی مدرج با بزرگ‌نمایی 100X انجام و تصاویر میکروسکوپی با میکروسکوپ نوری لایکا مجهز به سیستم فاز گرفته شد. با استفاده از اسلایدهای تهیه شده شکل کنیدیوفورها، فیالیدها و کنیدیوم‌ها در هر جدایه به کمک میکروسکوپ نوری لایتز مجهز به لوله ترسیم با بزرگ‌نمایی 100X رسم گردید.

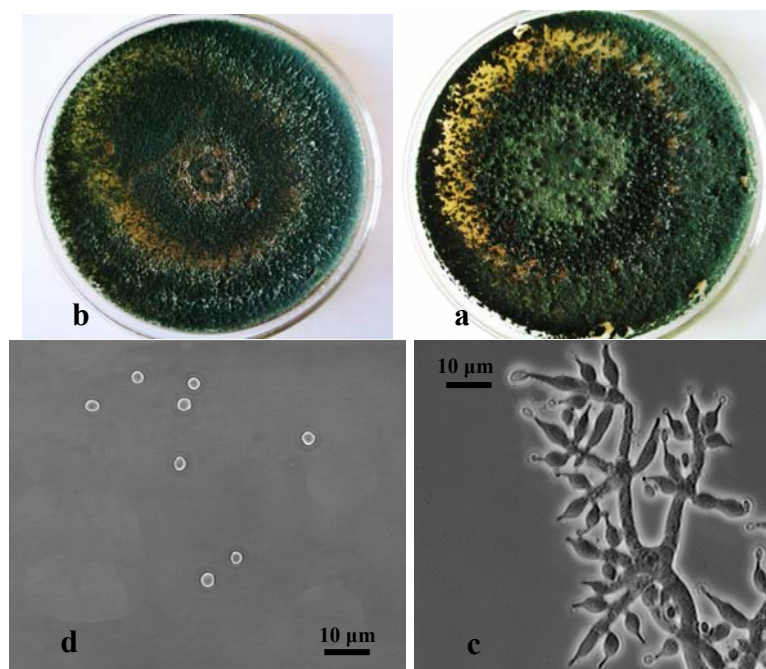
## نتایج و بحث

در این بررسی در مجموع ۲۰ جدایه مربوط به سه گونه تریکودرما از بخش‌های سالم میزبان‌های مختلف جداسازی شد. این اولین گزارش از ویژگی اندوفیتی این گونه‌ها در ایران می‌باشد.

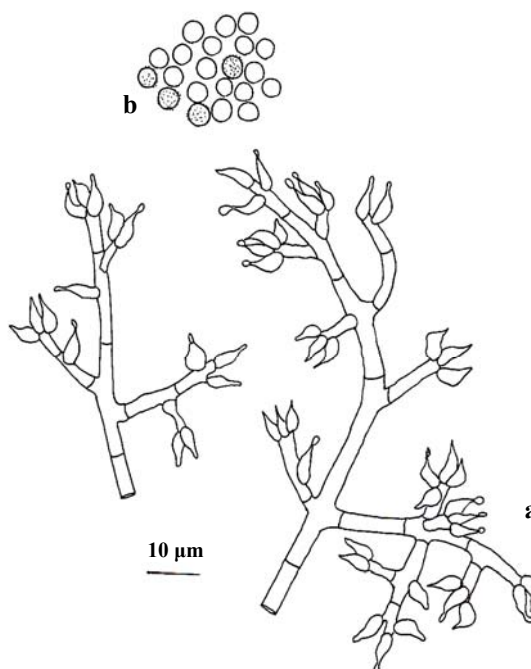
***Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg, Sydowia 51(1):71. 1999. (Fig. 1, 2)**

نمونه‌های بررسی شده: از ریشه پیازچه (*Allium schoenoprasum*)، بادمجان (*Solanum melongena*) و پنجه‌مرغی (*Cynodon dactylon*)، استان کردستان، مریوان، سروآباد، ۱۳۸۹/۷/۱۲، روغنیان و امینی، MRPM1، MRPM2، MRBM3، MRBM4، MRBS5، MRPNS6، MRPNS7، MRPNS8، محل نگهداری: گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه کردستان، سنندج.

پرگنه، دارای رشد متوسط و پس از ۴ روز روی محیط کشت MA دو درصد در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قطر آنها به ۷-۹ سانتی‌متر رسید. کنیدیوم‌زایی، به صورت جوش‌های بالشتک مانند به قطر ۲-۵/۰ میلی‌متر که به طور پراکنده در تمام سطح محیط کشت یا در ۲-۳ حلقه متحدالمرکز تشکیل و رنگ آنها سبز تیره است. کنیدیوفورها دارای شاخه‌های متقابل و هم اندازه بوده و شاخه‌ها از نوک کنیدیوفور به طرف پایه به تدریج بلندتر به طوری که در مجموع کنیدیوفور و انشعابات آن هرمی شکل می‌شود. فیالیدها آمپولی شکل و کمی در قسمت میانی متورم، اندازه آنها (۴/۵-۳/۱(-۲/۵-۲/۰)×(۲/۰-۱۲/۰)×(۱۱/۵-۶/۵(-۴/۷- میکرومتر. کنیدیوم‌ها، کروی تا نیم‌کروی و تخم مرغی شکل، در حالی که سطح بعضی از کنیدیوم‌ها به طور خیلی ظریفی خاردار، بعضی نیز دارای سطح صاف، اندازه کنیدیوم‌ها (۴/۵-۴/۰(-۳/۰-۲/۵)×(۵/۰-۴/۸(-۳/۴-۳/۰) میکرومتر.



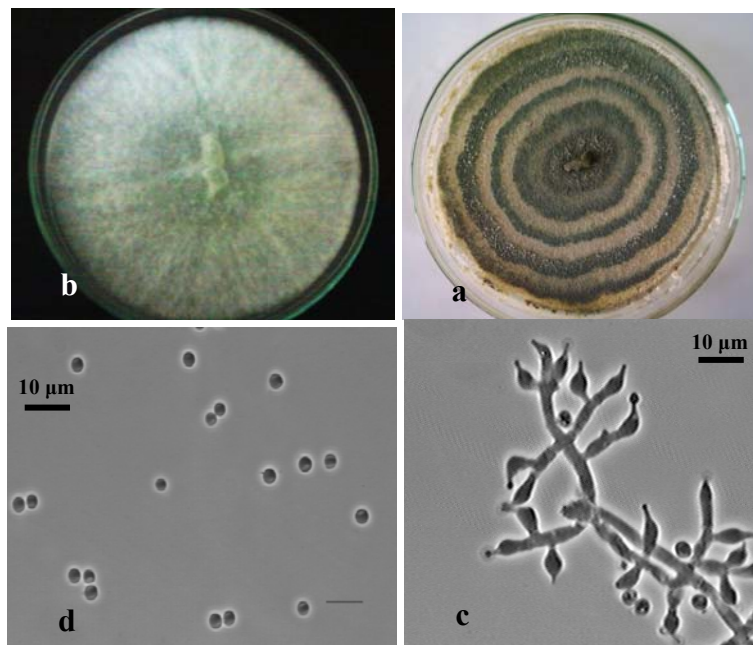
شکل ۱- *Trichoderma asperellum*: a. پرگنه جدایه پیازچه روی محیط PDA؛ b. پرگنه جدایه بادمجان روی محیط PDA؛ c. کنیدیوفورها و فیالیدها؛ d. کنیدیوم ها



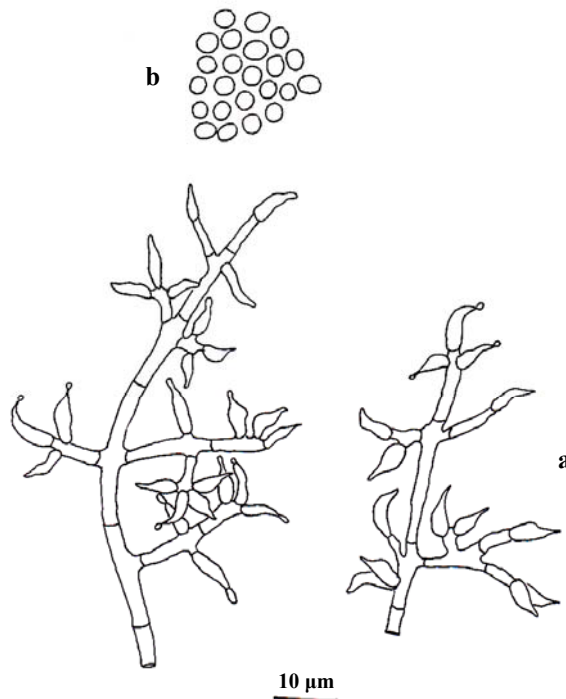
شکل ۲- *Trichoderma asperellum*: a. کنیدیوفورها و فیالیدها؛ b. کنیدیوم ها

***Trichoderma atroviride* Karsten, Finl. Mögelsvamp. P. 21. 1892. (Fig. 3, 4)  
= *Hypocrea atroviride* Dodd, Lieckfeldt & Samuels, Mycologia 95: 36. 2003.**

نمونه‌های بررسی شده: از ریشه و ساقه توتون (*Nicotiana tabacum*)، استان کردستان، مریوان، مرز باشماق، ۱۳۸۹/۷/۱۲، روغنیان و امینی، MRRM1، MRRM2، MRRM3، MRSM4، MRSM5، محل نگهداری: گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه کردستان، سنندج. پرگنه، دارای رشد نسبتاً سریع و قطر رشد آنها روی محیط کشت MA بعد از سه روز در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به ۵۵-۸۰ میلی‌متر رسید. دمای بهینه رشد روی محیط کشت PDA، ۲۵-۳۰ درجه سلسیوس و روی محیط کشت SNA، ۳۰ درجه سلسیوس می‌باشد. کنیدیوم‌زایی، معمولاً به صورت یکنواخت و پیوسته در سطح محیط پراکنده می‌شود. جدایه‌های این گونه روی محیط کشت‌های PDA و CMD به شدت بویی شبیه بوی نارگیل تولید می‌نمایند. کنیدیوفورها، درختچه‌ای و قابل انعطاف، و به تدریج به طرف نوک باریک می‌شوند. شاخه‌های فرعی غالباً به صورت منفرد روی کنیدیوفور قرار می‌گیرند ولی تعدادی از آنها نیز ممکن است به صورت جفتی و حتی دسته‌های سه تایی فراهم منشعب گردند. فیالیدها، مستقیم یا خمیده‌اند و غالباً در قسمت نوک قلاب مانند می‌شوند. اندازه فیالیدها  $(4/8) - 3 - (2/4) \times (1/8) - (12/5) - 12 - 6 - (4/2)$  میکرومتر می‌باشد. کنیدیوم‌ها، به شکل نیم‌کروی تا تخم مرغی، دارای دیواره صاف و فاقد اثر محل افتادن هستند. اندازه کنیدیوم‌ها  $(3/3) - 3 - (4/0) \times (2/3) - 2/6$  میکرومتر.



شکل ۳- *Trichoderma atroviride*: a, b پرگنه روی محیط PDA. c. کنیدیوفورها و فیالیدها. d. کنیدیوم‌ها  
Figure 3. *Trichoderma atroviride* a, b, colony on PDA c. conidiophores and phialides; d. conidia



شکل ۴- *Trichoderma atroviride*: a. کنیدیوفورها و فیالیدها b. کنیدیومها

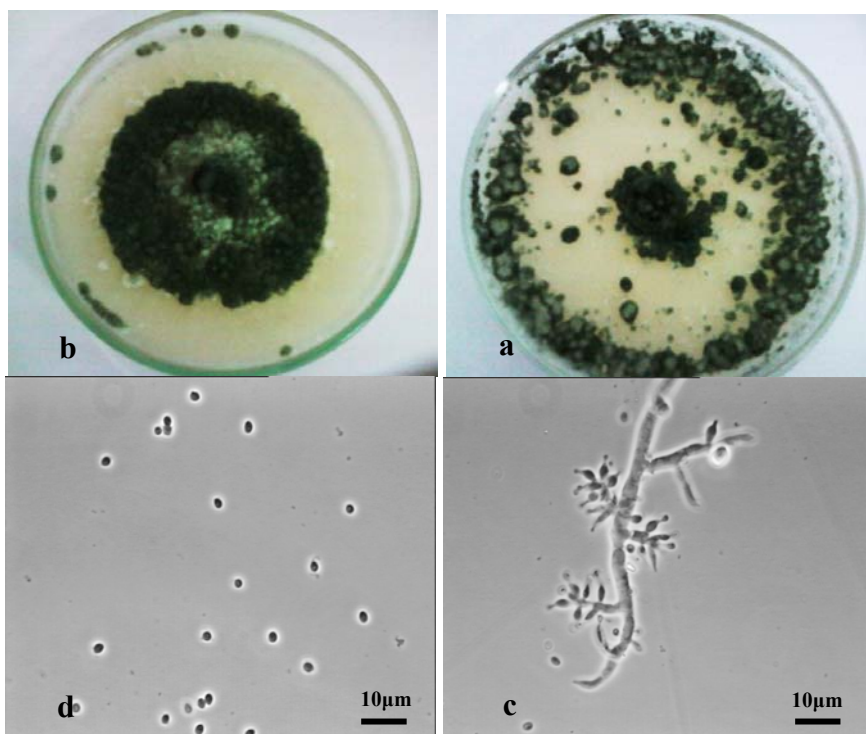
Figure 4. *Trichoderma atroviride* a. conidiophores and phialides b. conidia

*Trichoderma arundinaceum* Zafari, Graef. & Samuels, Mycol. Prog. 7: 208. 2008. (Fig. 5, 6)

نمونه‌های بررسی شده: از ریشه چغندرقد (*Beta vulgaris*)، انگور (*Vitis vinifera*) و نعناع (*Mentha arvensis*)، استان کردستان، بانه، میوان، سروآباد، ۱۳۸۹/۷/۱۲، روغنیان و امینی، MRNB7، MRNB6، MRAS5، MRAS4، MRAM3، MRCHM2، MRCHM1، محل نگهداری: گروه گیاه پزشکی دانشگاه کردستان، سنندج.

شعاع پرگنه، روی محیط کشت PDA بعد از ۷۲ ساعت در شرایط تاریکی در دماهای ۲۰، ۳۰ و ۳۵ درجه سلسیوس به ترتیب به ۲۹-۳۵، ۵۷-۵۱ و ۶-۱۲ میلی‌متر رسید. کنیدیوم‌زایی، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس روی محیط کشت PDA بعد از ۵ روز در شرایط متناوب روشنایی تولید ۳ یا ۴ حلقه متحد‌المركز برجسته می‌کند، حاشیه کلنی دالبری شکل و محور انتهایی کنیدیوفور دارای سرهای استریل، فیالیدها، در دسته‌های ۳-۵ تایی اغلب آمپولی‌شکل با اندازه (۴/۵) (-۴/۰) ۳/۰-۴/۰ × (۲/۰-۱۲/۷) (-۷/۰) ۴/۵-۳/۷ میکرومتر، کنیدیوم‌ها، نیم‌کروی تا تخم مرغی شکل و اندازه آنها (۳/۰) (-۲/۷) ۲/۲-۲/۷ × (۲/۰-۴/۰) ۲/۷-۳/۵ میکرومتر.

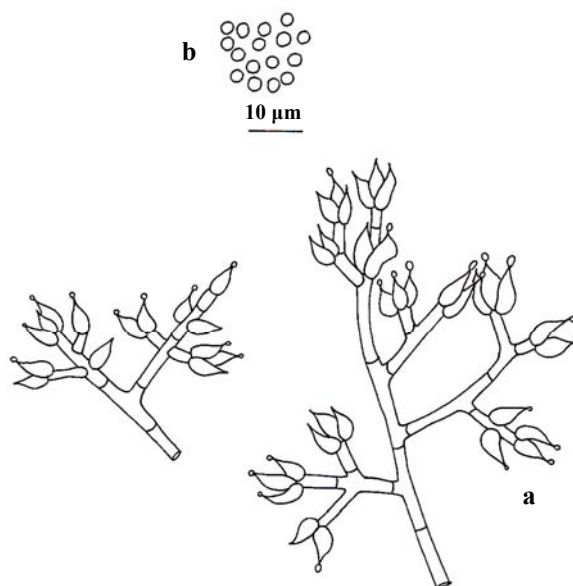




شکل ۵- *Trichoderma arundinaceum*: a. پرگنه جدایه نعناع از مرز باشماق روی محیط CMD؛ b. پرگنه

جدایه نعناع از سرو آباد روی محیط CMD؛ c. کنیدیوفورها و فیالیدها؛ d. کنیدیومها

**Figure 5.** *Trichoderma arundinaceum* a, b. colony on CMD c. conidiophores and phialides d. conidia



شکل ۶- *Trichoderma arundinaceum*: a. کنیدیوفورها و فیالیدها (مقیاس: ۱۰ میکرومتر)؛ b. کنیدیومها

(مقیاس: ۱۰ میکرومتر)

**Fig.6-** *Trichoderma arundinaceum* a. conidiophores and phialides (Bar: 10 μm) b. conidia (Bar: 10 μm)

در نتیجه این تحقیق ۲۰ جدایه تریکودرما از هفت میزبان مختلف نقاط مختلف استان کردستان مطابق با ویژگی‌های مورفولوژیکی شناسایی شدند. در این تحقیق *T. asperellum* بیشترین فراوانی را در بین دو گونه دیگر داشت. نتایج نشان می‌دهد که ۲۰ جدایه تریکودرمای به‌دست آمده متعلق به سه گونه شامل: *T. asperellum* (هشت جدایه)، *T. atroviride* (پنج جدایه) و *T. arundinaceum* (هفت جدایه) می‌باشند. جدایه‌های تریکودرمای معرفی شده به عنوان اندوفیت از دنیا شامل: *T. hamatum*, *T. amazonicum*, *Hypocrea koningiopsis*, *Trichoderma ovalisporum*, *Trichoderma martiale*, *Trichoderma koningiopsis*, *Hypocrea stilbohypoxyli*, *Trichoderma stilbohypoxyli*, *Trichoderma paucisporum*, *Trichoderma theobromicola*, *Trichoderma taxi* (Druzhinina et al., 2011) می‌باشند. یقیناً این جدایه‌ها نقش مهمی در کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زا و بیماری‌های گیاهی خواهند داشت. به نظر می‌رسد که با توجه به تنوع آب و هوایی در استان کردستان تنوع گونه‌های تریکودرمای اندوفیت زیاد و ضرورت دارد که مطالعات جامع و بیشتری در آینده در این خصوص انجام گیرد.

#### منابع

- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zeilinger, S., Grigoriev, I. V. & Kubicek, C. P. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature reviews, Microbiology*, 9: 749-759
- Ershad, J. 2010. *Iran Fungi*. Research of Agricultural Extension and Education.
- Gams, W. & Bissett, J. 1998. Morphological and identification of *Trichoderma*. In Kubicek, C. P. & Harman, G. E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor and Francis, London, UK.
- Karimi, S. 2005. *Identification of Trichoderma and Endomycorrhizae spp. as Walnut root Beneficial fungi in Hamedan province*. M.Sc. Thesis, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
- Klein, D. & Eveleigh, D. E. 1998. "Ecology of *Trichoderma*". In: Kubicek, C. P. & Harman, G. E. (Eds.). *Trichoderma and Gliocladium Basic biology, taxonomy and genetics*. London, UK.
- Muthumeenakshi, S., Mills, P. R., Brown, A. F. & Seaby, D. A. 1996. Intraspecific Molecular variation among *Trichoderma harzianum* isolates colonizing mushroom compost in the British Isles. *Microbiology*, 140: 769-777
- Nazmi, R. 2006. *A Taxonomic Study of Trichoderma Species in Caspian Sea*. Ph.D. Thesis, Agriculture of Bu-Ali Sina University, Hamadan, Iran.
- Papavizas, G. C. 1985. *Trichoderma and Gliocladium biology, ecology and potential for biocontrol*. *Phytopathology*, 23: 23-54
- Rossmann, A.Y. 1996. Morphological and Molecular perspectives on systematics of Hypocreales. *Mycologia*, 88: 1-19



- Samuels, G. J., Dodd, S., Gams, W., Castlebury, L. & Petrini, O. 2002. *Trichoderma* species associated with the green mould epidemic of commercially grown *Agaricus bisporus*. *Mycologia*, 94: 146-170
- Samuels, G. J. 1999. *Trichoderma* a review of biology and systematic of the genus. *Mycological Research*, 100: 923-935.
- Vahabi, K. 2005. *Diversity of Trichoderma spp. Related to Button Mushroom (Agaricus bisporus) Using Microscopical, Molecular and Morphological Approaches*. M.Sc. Thesis, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
- Zafari, D. 2003. *A Taxonomic Study of Trichoderma Species in Iran*. Ph.D. Thesis, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
- Zafari, D., Zare, R., Ershad, J. & Alizadeh, A. 2004. Three new species of *Trichoderma* for the mycoflora of Iran. *Rostaniha*, 5: 159-169.



## Short Communication

### A record of endophytic *Trichoderma* species in Kurdistan

Mozhgan ROUGHANIAN<sup>1</sup>, Jahanshir AMINI<sup>1\*</sup>, Jafar ABDOLLAZADEH<sup>2</sup>,  
Doustmorad ZAFARI<sup>1</sup>

1- Department of Plant Protection, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran  
(Corresponding author, E-mail: aminijahan51@yahoo.com)

2- Department of Plant Protection, University of Bu-Ali Sina, Hamadan, Iran

#### Abstract

*Trichoderma* species are cosmopolitan, typically soil-born, able to growth on plant debris and frequently dominant member of soil microflora. In this study, 20 fungal isolates include *Trichoderma asperellum*, *T. atroviride* and *T. arundinaceum* were isolated base on antiseptic methods from root and stem of different hosts. These species could be endophytic *Trichoderma* of Kurdistan Province that are reported for first time from Iran.

**Key Words:** Endophytic, Iran, Taxonomy, *Trichoderma*.