شناسایی گونه‌های تریکودرمای مرتبط با ریشه و فراریشه گردو در استان همدان

دوستمراد ظفری*[۱]، صدیقه کریمی[۱] و روشن محمدی[۲]

۱ – همدان، دانشگاه بوعلی سینا، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

۲- زابل، دانشگاه زابل، دانشکده کشاورزی، گروه گیاهپزشکی

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۵ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۲۲

چکیده

گردو از درختان بسیار با ارزشی است که در ایران به طور وسیعی کشت می‌گردد و میکروارگانیسم‌های متنوع و زیادی شامل عوامل مفید و مضر با آن در ارتباط هستند. تحقیقات صورت گرفته در ارتباط با شناسایی میکروارگانسیم‌های مرتبط با درختان گردو در ایران بیشتر به عوامل بیماری‌زای گیاهی معطوف شده است. بنابراین، در این بررسی با هدف شناسایی گونه‌های تریکودرمای مرتبط با ریشه و فراریشه درختان گردو، طی نمونه‌برداری از ۶۸ منطقه گردوکاری استان همدان، ۲۳۵ جدایه قارچ تریکودرما جداسازی شد و با استفاده از مشخصات ریخت‌شناسی مورد شناسایی قرار گرفتند. در این بررسی میزان رشد، مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی آنها مانند شکل، اندازه و سایر ویژگیهای کنیدیوم، کنیدیوفور، فیالید، کلامیدسپور، ریسه‌های هوایی و ریسه‌های رشد کرده در داخل محیط کشت به همراه آزمون دمایی، جهت شناسایی جدایه‌ها در سطح گونه مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت شش گونه‌ی تریکودرما شامل *Trichoderma atroviride*، *T. brevicompactum*، *T. citrinoviride*، *T. ghanense*، *T. harzianum* و *T. longibrachiatum* تشخیص داده شد. با توجه به نتایج به دست آمده و نقش مثبت گونه‌های تریکودرما در ارتقاء سلامتی محصولات زراعی و باغی، لزوم توجه بیشتر در زمینه حفظ، حمایت و استفاده از این میکروارگانیسم‌ها در مدیریت باغبانی درختان گردو پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *Trichoderma*، گردو، فراریشه، قارچ، همدان

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۸۱۱-۴۴۲۴۱۹۰، پست الکترونیکی: zafari_d@yahoo.com

مقدمه

گردو (*Juglans*) از خانواده Juglandaceae و دارای سه گونه *J. regia* L.، *J. cinerea* L و *J. nigra* L. است که در ایران تنها گونه *J. regia* می‌روید که بیشتر در نواحی غربی، شمالی و جنوبی کشور گسترش دارد. گردو از درختان چند منظوره و مورد علاقه کشاورزان و جنگل‌بانان است که از زمانهای قدیم به واسطه استفاده از میوه و چوب آن همواره مورد توجه قرار گرفته است. بیشتر محققان گردو را بومی ایران و قسمتهایی از شرق آسیا تا آسیای میانه و کوههای تبت، نپال، شمال هند، پاکستان و افغانستان می‌دانند. به همین جهت نام گردوی ایرانی (Persian Walnut) مورد استفاده محققان باغبانی در سطح جهان قرار گرفته است، هر چند که تنی چند از محققین به درستی یا نادرستی آن را گردوی انگلیسی (English Walnut) می‌نامند (۸). بر اساس آمار سازمان خواروبار جهانی (FAO)، ایران در سال ۲۰۰۷ میلادی با ۱۷۰ هزار تن تولید گردو، مقام چهارم را در جهان پس از کشورهای چین، آمریکا و ترکیه به خود اختصاص داده است. این در حالی است که در فواصل سالهای ۲۰۰۶-۱۹۹۷ میلادی، ایران همواره حائز مقام سوم و ترکیه در رتبه چهارم جهانی قرار داشته است (۱۵).

هر چند که افزایش سطح زیر کشت، شناسایی ارقام

Archive of SID
www.SID.ir

پرمحصول و با کیفیت مطلوب از جمله راهکارهای پیشنهاد شده برای بازیابی و ارتقای موقعیت این محصول استراتژیک در سطح جهانی عنوان شده است اما شناسایی میکروارگانیسم‌های مفید فراریشه این درخت جهت کنترل تلفیقی آفات و بیماریهای گیاهی، تقویت رشد و طول عمر آن و در نهایت افزایش عملکرد نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

در تحقیقات صورت گرفته در ارتباط با میکروارگانیسم‌های ریشه و فراریشه درختان گردو در ایران، به جز تحقیق مختصری روی میکوریزهای همزیست با ریشه این درختان (۱)، غالب بررسیها به مطالعه عوامل بیمارگر خاک‌زاد ریشه و طوقه این درختان محدود شده است. در همین راستا، قارچهای *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt ، *P. citricola* Sawada و *P. citrophthora* (R.E. Sm. & E.H. Sm.) Leonian به عنوان مهم‌ترین عامل پوسیدگی ریشه و طوقه درختان گردو در استانهای فارس، کرمان و کهگیلویه و بویر احمد گزارش شده است (۶). همچنین جدایه‌هایی از *Fusarium* spp.، *Verticillium dahliae* Kleb.، *Rhizoctonia solani* J. G. Kühn، *Phytophthora* spp.، *Armillaria* spp.، *Phymatotrichum* spp. (۳) و گونه‌های متعدد نماتدهای بیمارگر موجود در فراریشه درختان گردو (۷) جدا گردیده است.

گونه‌های قارچی جنس تریکودرما در عملکرد زیستگاههای خاکی نقش کلیدی ایفاء می‌کنند (۲۰). گونه‌های مختلف متعلق به جنس تریکودرما را می‌توان از تمام خاکها، چوبهای در حال فساد، کمپوست و یا سایر مواد آلی جداسازی نمود. بسیاری از گونه‌های تریکودرما به دلیل توانایی در سرکوب عوامل بیمارگر گیاهی از قبیل *Botrytis cinerea* (De Bary) Whetzel، *Fusarium* spp.، *Phytophthora cactorum* (Lebert & Cohn) J. Schröt، *Verticillium dahliae*، *Rhizoctonia solani*، *Pythium* spp. و همچنین تحریک رشد گیاه، از اهمیت خاصی برخوردار هستند (۲۰ و ۲۱). به طور سنتی، تأثیرات مفید گونه‌های تریکودرما روی گیاهان به توانایی آنتاگونیستی آنها روی بیمارگرهای خاک‌زاد از طریق ترکیبی از مکانیسمهای مایکوپارازیتیسم، ترشح آنتی‌بیوتیک و رقابت برای غذا و مکان نسبت داده شده است (۱۸). هر چند که بررسیهای اخیر نشان می‌دهد که این عوامل بیوکنترل همچنین قادر به برقراری ارتباط تنگاتنگی با ریشه گیاهان هستند و حتی لایه‌های خارجی اپیدرم را پوشانده و به عنوان همزیستهای فرصت‌طلب و غیر بیماری‌زا در گیاهان عمل می‌نمایند. همچنین گونه‌های تریکودرما باعث تغییر متابولیسم گیاه می شوند به طوری که منجر به افزایش توسعه ریشه، باروری محصول و مقاومت به تنشهای زنده و غیرزنده می گردند (۲۲).

بتا گلوکان یکی ازاجزای اصلی ساختار دیواره سلولی قارچهای حقیقی از جمله قارچهای بیماری‌زای گیاهی می باشد. برخی از گونه‌های تریکودرما از جمله *T. virens* با تولید آنزیم بتا گلوکاناز منجر به شکسته شدن پیوندهای گلوکوزیدی بتا ۱ و ۳ پلیمر گلوکان می‌شود و آن را به اجزای سازنده تقسیم می‌کنند که در نهایت منجر به کنترل بیولوژیک عوامل بیماریزای گیاهی می‌شود (۹).

علاوه بر این، اهمیت گونه‌های تریکودرما شامل *T. virens* و *T. atroviride*، در فعال‌سازی هورمون اکسین در گیاه *Arabidopsis*، که منجر به افزایش بیوماس و تحریک رشد ریشه‌های جانبی می‌شود، به اثبات رسیده است (۱۲). همچنین پتانسیل تعدادی از ریزوبیوم‌ها در کاهش تولید اتیلن در شرایط تنش، که منجر به پیری زودرس گیاهان می شود، به اثبات رسیده است (۴). به طور کلی ریشه نقش مهمی در گیاهان و درختان ایفاء می‌کند، زیرا علاوه بر اینکه به عنوان لنگرگاه گیاه عمل می‌نماید، در تأمین نیاز آبی و جذب مواد غذایی از خاک نیز دخالت دارد. بنابراین مطالعه محیط فراریشه در گیاهان و درختان، به منظور

Archive of SID
www.SID.ir

شناسایی میکروارگانیسم‌های مفید، از اهمیت زیادی برخوردار می‌باشد.

با توجه به اینکه استان همدان با وجود ۸،۷۷۷ هکتار باغ گردو به لحاظ عملکرد و سطح زیر کشت، به ترتیب رتبه های اول و دوم کشوری را به خود اختصاص داده است (۳)، این تحقیق با هدف شناسایی گونه‌های تریکودرمای مفید مرتبط با ریشه و فراریشه درختان گردوی این استان به منظور به کارگیری آنها در ارتقاء سلامت محصول گردو و افزایش عملکرد آن برای اولین بار در ایران صورت گرفته است.

جدول ۱- محل جمع‌آوری نمونه‌های ریشه و خاک فراریشه درختان گردو

شماره نمونه	محل نمونه‌برداری	شماره نمونه	محل نمونه‌برداری	شماره نمونه	محل نمونه‌برداری
۱	تویسرکان، روستای قره گوره	۲۴	سامن	۴۷	همدان، روستای ارزانفورد
۲	تویسرکان، روستای سلطان	۲۵	اسدآباد	۴۸	همدان، روستای شمس‌آباد
۳	تویسرکان، روستای باغان	۲۶	اسدآباد، روستای ملهم‌دره	۴۹	همدان، روستای ورکانه
۴	تویسرکان، روستای خرم رود	۲۷	اسدآباد، ترخین‌آباد	۵۰	نهاوند، روستای تکه
۵	تویسرکان، روستای وردآورد علیا	۲۸	اسدآباد، روستای ملهم‌دره	۵۱	نهاوند، فارسبان
۶	تویسرکان، روستای وردآورد	۲۹	اسدآباد	۵۲	نهاوند، روستای قلعه قباد
۷	تویسرکان، روستای کندر	۳۰	نهاوند	۵۳	نهاوند، روستای نسار
۸	تویسرکان، روستای کهنوش	۳۱	نهاوند، گیان	۵۴	نهاوند، روستای گل‌زرد
۹	تویسرکان، روستای کندر	۳۲	نهاوند	۵۵	نهاوند، روستای میلاب
۱۰	تویسرکان، روستای اشتران	۳۳	نهاوند	۵۶	تویسرکان، سرکان
۱۱	ملایر	۳۴	تویسرکان، روستای فریازان	۵۷	تویسرکان، مبارک‌آباد
۱۲	ملایر	۳۵	تویسرکان، روستای کورزان	۵۸	تویسرکان، روستای خرم رود
۱۳	ملایر، روستای کساوند	۳۶	تویسرکان، مبارک‌آباد	۵۹	تویسرکان، شهرستانک
۱۴	ملایر، کیان کردسا	۳۷	تویسرکان، روستای ولاشجرد	۶۰	تویسرکان، روستای کرزان
۱۵	ملایر، روستای زنگنه علیا	۳۸	تویسرکان	۶۱	تویسرکان، سرابی
۱۶	تویسرکان، سرکان	۳۹	تویسرکان	۶۲	تویسرکان، روستای مبارک‌آباد
۱۷	تویسرکان، سرکان	۴۰	تویسرکان	۶۳	قزوین، ضیاءآباد
۱۸	تویسرکان	۴۱	تویسرکان، روستای بادامک	۶۴	زنجان، خرم‌دره
۱۹	سامن، روستای نازول	۴۲	تویسرکان	۶۵	قزوین، ابهر
۲۰	سامن	۴۳	تویسرکان	۶۶	زنجان، حصار
۲۱	سامن	۴۴	تویسرکان	۶۷	جاده کرمانشاه، وهنان
۲۲	سامن	۴۵	ملایر، ازندریان	۶۸	تویسرکان، سرابی
۲۳	سامن	۴۶	همدان، روستای سنگستان		

جدول ۲- گونه‌های شناسایی شده *Trichoderma* بر اساس مشخصات ریخت‌شناسی.

ردیف	گونه	تعداد جدایه	ردیف	گونه	تعداد جدایه
۱	*T. harzianum*	۱۸۹	۴	*T. longibrachiatum*	۴
۲	*T. brevicompactum*	۳۵	۵	*T. citrinoviride*	۱
۳	*T. atroviride*	۵	۶	*T. ghanense*	۱

مواد و روشها

جمع‌آوری نمونه‌ها: در سال ۱۳۸۳ به منظور شناسایی گونه‌های تریکوردمای مرتبط با درختان گردو، از باغات گردوی مناطق مختلف استان همدان و همچنین چندین محل از استانهای قزوین و زنجان نمونه‌برداری به عمل آمد (جدول ۱). نمونه‌برداری از عمق ۵۰-۱۰ سانتیمتری خاک سایه‌انداز درختان گردو انجام گرفت و در کیسه‌های پلاستیکی مجزا به آزمایشگاه منتقل شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های تریکوردما: جداسازی جدایه‌های تریکودرما با استفاده از محیط کشتهای عمومی و انتخابی شامل مالت-آگار (Malt Agar =MA)، آرد ذرت-آگار (Corn Meal Agar=CMA)، آرد یولاف-آگار (Oat Meal Agar=OA)، SNA (Synthetic Nutrient Poor Agar)، داوه (Davet) و الاد و خت (Elad and Chet) انجام پذیرفت (۱۳ و ۱۴).

برای جداسازی جدایه‌های تریکودرما روی این محیطها، از نمونه‌های خاک، سوسپانسیون در رقتهای مختلف (۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰، ۱/۱۰۰۰۰) تهیه شد و دو قطره از سوسپانسیون هر نمونه به هر تشتک حاوی محیط کشت منتقل گردید. همچنین در برخی موارد توده‌های کوچک و متراکم خاک نیز به طور مستقیم روی محیط کشت قرار داده شد. تشتکها بعد از ۴-۳ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با استریومیکروسکوپ (Stereomicroscope) مورد بررسی قرار گرفتند. خالص سازی با استفاده از روش کشت نوک ریسه پرگنه‌های مشکوک به تریکودرما روی محیط سیب‌زمینی-دکستروز آگار (Potato Dextrose Agar=PDA)انجام شد. هر پرگنه به عنوان یک جدایه قارچی در نظر گرفته شد.

بررسیهای ریخت‌شناسی: به منظور شناسایی جدایه‌ها در سطح گونه با استفاده از کلید شناسایی گمس و بیست (۱۶) میزان رشد، مشخصات ماکروسکوپی و ریزساختاری پرگنه‌ها شامل شکل، اندازه و سایر ویژگیهای کنیدیوفورها، فیالیدها، کنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها، ریسه‌های هوایی و ریسه‌های فرورفته در محیط کشت مورد مطالعه قرار گرفت. برای دست‌یابی به حداقل، حداکثر و میانگین اندازه‌ها، از هر یک از اندامهای ذکر شده ۳۰ تکرار اندازه گیری شد. برای مطالعه میزان رشد جدایه‌ها، حلقه هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه فعال پرگنه سه روزه هر جدایه، درون تشتکهای حاوی محیط کشتهای مالت آگار و سیب زمینی-دکستروز آگار قرار داده شد و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند و میزان رشد آنها در روزهای سوم و چهارم اندازه‌گیری شد.

مشخصات پرگنه‌ها شامل رنگ آنها، خوابیده یا کرکی بودن، نحوه کنیدیوم‌زایی و رنگ سطح زیرین پرگنه، با کشت جدایه‌ها روی محیطهای مالت آگار، سیب‌زمینی-دکستروز آگار و آرد ذرت-دکستروز-آگار (Corn Meal Dextrose Agar=CMD)، مطالعه گردید. بررسی و اندازه گیری مشخصات ریزساختاری با استفاده از میکروسکوپ Olympus مدل BH2 مجهز به سیستم نومارسکی و میکروسکوپ Leica مجهز به سیستم فاز صورت گرفت.

نتایج و بحث

از میان ۶۸ نمونه خاک مخلوط با ریشه که از محیط فراریشه درختان گردوی استان همدان و نقاطی از استانهای قزوین و زنجان جمع‌آوری شده بود، جمعاً ۲۳۵ جدایه در قالب شش گونه به شرح زیر جداسازی، خالص سازی و شناسایی شد.

ویژگیهای گونه‌های تریکودرمای جداشده *T. atroviride*: پرگنه‌های این گونه دارای رشد نسبتاً سریع بودند و در ابتدا به رنگ زرد مایل به سبز و در نهایت سبز تیره شدند. بوی خاصی از پرگنه این گونه متصاعد می‌شد که شبیه بوی نارگیل بود. کنیدیوفورها دارای انشعابات کم و قابل انعطاف و ظریف بودند. انشعابات غالباً به صورت ۳-۲ شاخه‌ای و فراهم و به ندرت بیش از سه شاخه داشتند. فیالیدها تکی یا ۴-۲ عدد به صورت فراهم و کم و بیش تنگی‌شکل و اغلب خمیده و کشیده بودند. اندازه فیالیدها ۳-۲/۴×۱۲-۶ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها کروی تا تخم‌مرغی شکل، سبز تیره، دارای سطح صاف با اندازه ۳/۴-۲/۲×۴/۲-۲/۶ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌زایی معمولاً به صورت یکنواخت و پراکنده صورت می‌گرفت. بعضی

Archive of SID
www.SID.ir

جدایه‌ها جوشهایی به صورت شعاعی تولید کردند. ریسه‌ها بی‌رنگ و دارای دیواره صاف بودند. کنیدیوم‌ها نیم‌کروی تا تخم‌مرغی، دارای دیواره صاف و فاقد اثر محل افتادن بودند. این گونه به وسیله شکل و اندازه فیالیدها و کنیدیوفورها و نیز میزان شعاع رشد پرگنه از سایر گونه های شبیه قابل تفکیک است. با توجه به مشخصات ذکر شده و توصیف نامه مرتبط با گونه‌های جنس تریکودرما، جدایه‌های واجد این مشخصات متعلق به گونه *T. atroviride* می‌باشند (۱۶). این گونه توسط ظفری و همکاران (۵) از ایران گزارش شده است و یکی از عوامل بیوکنترلی مهم می‌باشد (شکل ۱، الف و ب).

T. brevicompactum : رشد پرگنه در این گونه سریع بود، کنیدیوم‌زایی به فراوانی و به صورت نواحی فشرده صورت گرفت. بهترین حرارت برای رشد دمای ۳۲-۳۰ درجه سانتی‌گراد بود و در دمای بیش از ۳۶ درجه، رشد متوقف شد. اجتماع کنیدیوفورهای متراکم باعث رنگ سبز زیتونی تا سبز مایل به آبی یا خاکستری مایل به زیتونی در پرگنه شد. کنیدیوفورها هرمی شکل، بی‌رنگ با دیواره صاف و انشعابات پیرامونی بودند و زواید نازا در اطراف جوشهای کنیدیومی جوان وجود داشت که با بالا رفتن سن قارچ از بین رفتند. محور اصلی کنیدیوفور و انشعابات اولیه کوتاه و معمولاً ۵/۵-۴ میکرومتر قطر داشتند. فیالیدها اغلب آمپولی شکل با گردن کوتاه و باریک و به اندازه ۴-۳×۶/۵-۵ میکرومتر بودند ولی فیالیدهای انتهایی کنیدیوفور بلندتر بوده و به بیش از ۵×۱۲-۸ میکرومتر نیز می‌رسیدند. فیالیدهای کوتاه به هم فشرده شده و ظاهر فشرده‌ای به ساختارهای کنیدیوم‌زایی می‌دادند. کنیدیوم‌ها نیم‌کروی یا بیضوی کوتاه، اغلب به قطر ۳-۲ میکرومتر با دیواره صاف و از نظر میکروسکوپی به رنگ سبز خاکستری بودند (۱۹). در این بررسی جدایه‌های مربوط به این گروه پس از *T. harzianum* بیشترین فراوانی را داشته است (شکل ۲، الف و ب).

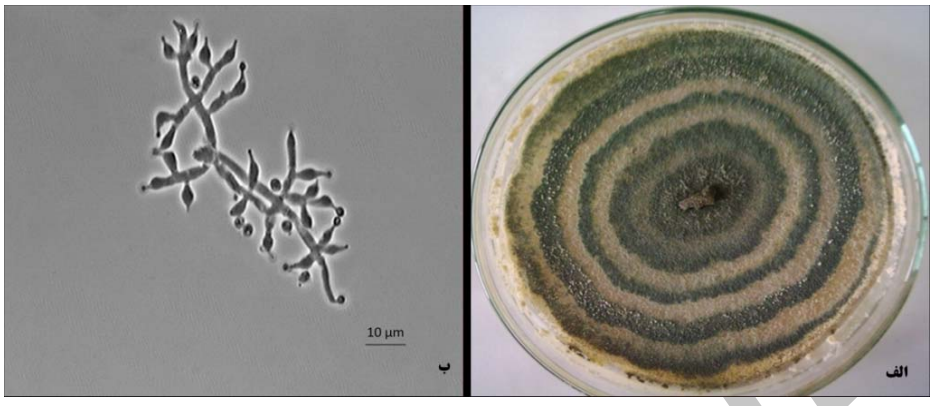
T. citrinoviride : پرگنه در این گونه دارای رشد سریع، بدون بو و کنیدیوم‌زایی کم و بیش متراکم و رنگ آن سبز تیره بود. کنیدیوفورها دارای محور اصلی بلند و انشعابات کم و نامنظم (به صورت غیرمتقارن) و انشعابات اولیه اکثراً کوتاه و به ندرت انشعاب ثانویه در آنها دیده می‌شد. فیالیدها به صورت انفرادی و نامنظم در روی کنیدیوفور قرار می‌گرفتند و به ندرت تشکیل خوشه و دسته را می‌دادند. کنیدیوزایی در محیط کشت CMD به صورت نوارهای عریض و حاشیه‌ای بر روی دوایر متحدالمرکز صورت گرفت. فیالیدها در انشعابات اولیه به صورت منفرد و نامنظم تشکیل شدند و استوانه‌ای شکل، تنگی یا آمپولی شکل بودند که در قسمت میانی بزرگ شده و مستقیم و غیرخمیده بودند. اندازه فیالیدها ۳/۱-۲×۶/۵-۳/۵ میکرومتر بود که طول فیالیدهای انتهایی تا ۱۲ میکرومتر هم می‌رسید. فیالیدها به صورت سه شاخه‌ای و فراهم و یا جفتی و گاهی تکی و به صورت یک در میان و حتی نامنظم هم دیده می‌شدند. کنیدیوم‌ها بیضی شکل با دیواره صاف، به رنگ سبز روشن یا سبز تیره به اندزه‌ی ۲/۴-۱/۵-۳/۷-۲/۲ میکرومتر بودند (۱۶) (شکل ۳، الف و ب).

T. ghanense : در محیط کشت PDA کنیدیوم‌زایی به صورت یکنواخت و پراکنده بود و تولید رنگ سبز تیره نمود. در ۳۵ درجه سانتیگراد کنیدیوم‌زایی زیاد و با کاهش دما به ۳۰ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد میسیلیوم‌های هوایی پنبه ای شکل به وجود آمد. سطح زیرین پرگنه در تمام دماهای اشاره شده بی‌رنگ بود. در محیط کشت CMD ایجاد میسیلیوم هوایی نموده و کنیدیوم‌زایی به صورت نوارهای پهن در حاشیه پرگنه و به رنگ سبز تیره بود. فیالیدها در انشعابات اولیه به صورت منفرد و شکل آنها استوانه‌ای و به صورت خمیده و قلاب مانند بوده و در قسمت میانی اندکی تورم داشتند. فیالیدها به صورت مرتب آرایش یافته و اندازه آنها ۴/۱-۲/۱×۱۳-۵ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها بیضوی شکل، سبزرنگ و با دیواره صاف و

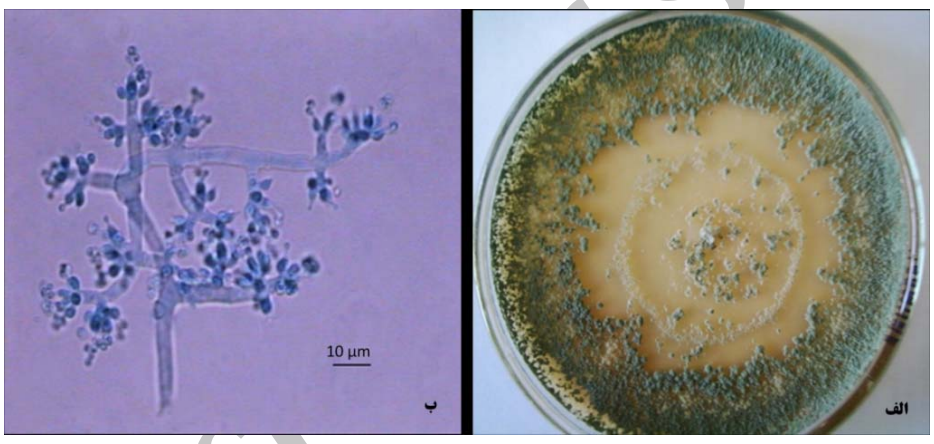
Archive of SID

www.SID.ir

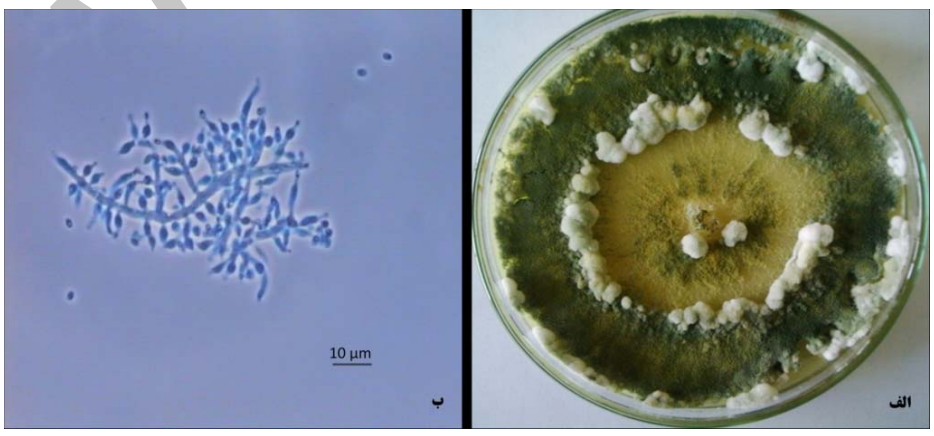
اندازه آنها ۵-۳×۷/۵-۴/۵ میکرومتر بودند (۱۶) (شکل ۴، الف و ب).



شکل ۱- الف) پرگنه *T. atroviride* روی محیط PDA، ب) تصویر میکروسکوپی کنیدیوفور و کنیدیوم‌های *T. atroviride*.

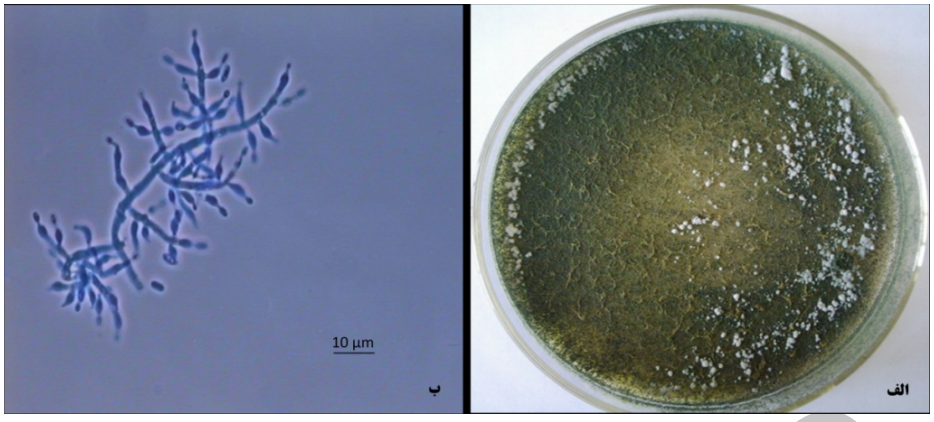


شکل۲. الف) پرگنه *T. brevicompactum* روی محیط MA، ب) تصویر میکروسکوپی کنیدیوفور و کنیدیوم‌های *T. brevicompactum*.



شکل ۳. الف) پرگنه *T. citrinoviride* روی محیط CMD، ب) تصویر میکروسکوپی کنیدیوفور و کنیدیوم‌های *T. citrinoviride*.

www.SID.ir



شکل ۴. الف) پرگنه *T. ghanense* روی محیط PDA، ب) تصویر میکروسکوپی کنیدیوفور و کنیدیوم‌های *T. ghanense*.

شکل ۵. الف) پرگنه *T. harzianum* روی محیط MA، ب) تصویر میکروسکوپی کنیدیوفور و کنیدیوم‌های *T. harzianum*.

شکل ۶. الف) پرگنه *T. longibrachiatum* روی محیط CMD، ب) تصویر میکروسکوپی کنیدیوفور و کنیدیوم‌های *T. longibrachiatum*.

T. harzianum : رشد پرگنه سریع و کنیدیوم‌زایی غالباً به صورت پراکنده و تمام سطح پرگنه را پوشاند یا تولید جوشهای فشرده‌ای به قطر حدود هشت میلی‌متر نمود که حاشیه آنها اغلب توسط ریسه‌های عقیم احاطه شده بود. رنگ جوشها در ابتدا سبز مایل به زرد بود ولی به سرعت به سبز تیره متمایل شد. گاهی کنیدیوم‌زایی به صورت

www.SID.ir

دوایر متحدالمرکز یا متراکم نزدیک حاشیه پرگنه به صورت توده‌های بزرگ نامنظم به هم پیوسته صورت می‌گرفت. پرگنه بدون بو و دارای ریسه‌های هوایی کرکی بی‌رنگ با دیواره صاف بود. سطح زیرین پرگنه (پشت تشتک پتری) از بدون رنگ تا زرد تیره متغییر بود. کنیدیوفورها هرمی شکل، بی‌رنگ، دارای انشعابات کم و انشعابات غالباً به صورت ۳-۲ شاخه‌ای و فراهم (verticillate) و به ندرت بیش از سه شاخه داشتند. تولید فیالیدها از قسمت پایه کنیدیوفورها شروع می‌شد به همین دلیل در مراحل اولیه رشد، نوک کنیدیوفورها نازا به نظر می‌رسید ولی در مرحله بلوغ کنیدیوفورها به صورت منظم منشعب شده و تا نوک زایا بودند. فیالیدها آمپولی (ampuliform) یا تنگی شکل با گردن باریک و اکثراً ۴-۳ شاخه‌ای به صورت فراهم و گاهی به صورت دوتایی و به اندازه ۳/۸-۳/۵×۲/۵-۷/۵-۳/۵ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها نیم‌کروی (subglobus) تا تخم-مرغی واژگون (Obvoid) و اندازه آنها ۲/۵-۳/۲×۱/۳-۱/۷ میکرمتر بود و دیواره‌های صاف و نیمه‌شفاف تا سبز روشن داشتند (۱۶). از آنجا که بیش از ۸۰ درصد جدایه‌های جمع آوری شده به *T. harzianum* تعلق داشتند، این گونه فروان‌ترین گونه‌ی تریکودرما در منطقه فراریشه گردو می باشد. (شکل ۵، الف و ب).

T. longibrachiatum : کنیدیوم‌زایی در این گونه سریع و روی محیط PDA بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد شروع شد ولی با کاهش دما کنیدیوم‌زایی مدت زمان بیشتری طول کشید. بیشترین مقدار کنیدیوم-زایی در دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد و کمتر با تأخیر شروع شد. رنگ کنیدیوم‌ها به صورت یکنواخت سبز یشمی و گاهی در میان توده آنها لکه‌های سفید نیز دیده می‌شد. این گونه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد در داخل محیط کشت تولید رنگ دانه زرد روشن یا زرد مایل به سبز می‌نمود ولی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد هیچ رنگی در محیط کشت تولید نمی‌شد. ریسه‌ها بی‌رنگ و دارای دیواره صاف بودند. کنیدیوفورها نسبتاً بلند و ایستاده با انشعابات کم‌تراکم و نامنظم که با محور اصلی تشکیل زاویه قائمه می‌دادند و یا نوک آنها به طرف محور اصلی کنیدیوفور خم می‌شد. ترشحات قطره‌ای روی ریسه تشکیل نشد و بوی مشخصی از پرگنه‌ها متصاعد نگردید.

در محیط کشت CMD تولید کنیدیوفورها به صورت غیرپیوسته و نامنظم بودند و در انشعابات اولیه و نیز در قسمت انتهایی کنیدیوفور، فیالیدها به صورت منفرد دیده می‌شدند. فیالیدها غالباً به صورت منفرد و یا دسته‌های ۳-۲ تایی و به صورت پیرامونی روی کنیدیوفور تشکیل شدند. نوک شاخه‌های فرعی به یک فیالید استوانه‌ای ختم می‌شد. فیالیدها استوانه‌ای و در قسمت میانی اندکی بزرگ شده و اکثراً مستقیم و بدون خمیدگی بودند. اندازه فیالید ۳/۳-۵-۱۱/۵×۲/۳ میکرومتر بود ولی فیالیدهای انتهایی طویل‌تر و گاهی طول آنها به ۱۵ میکرومتر می‌رسید. کنیدیوم‌ها بیضی گرد تا کشیده، با دیواره صاف، به رنگ سبز روشن بودند و محل اتصال آنها به فیالید تا حدودی مشخص بود. اندازه آنها ۳/۵-۲/۲-۶/۵×۳/۲ میکرومتر بود (شکل ۶، الف و ب). این گونه با اندازه‌گیری میزان رشد روی محیط کشت PDA در دمای ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد، اندازه کنیدیوم‌ها و بی‌رنگ ماندن سطح زیرین پرگنه‌ها در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد از سایر گونه‌های بخش خود متمایز می‌شد (۱۶).

فراوانی گونه‌های شناسایی شده: فراوانی گونه‌های شناسایی شده در جدول دو نشان داده شده است. بیش از ۸۰ درصد جدایه‌های جمع آوری شده متعلق به گونه *T. harzianum* بودند. با توجه به بررسیهای صورت گرفته در ارتباط با گونه‌های تریکودرما، گونه *T. harzianum* بیشترین فراوانی را در خاکهای ایران و جهان دارا می‌باشد. نعیمی و همکاران (۱۰) نیز در بررسی گونه‌های تریکودرما در شالیزارهای برنج استان مازندران نشان دادند که از ۲۰۲

Archive of SID

www.SID.ir

جدایه جمع آوری شده، ۱۱۶ جدایه به گونه *T. harzianum* تعلق داشتند.

در سالهای اخیر آلودگیهای زیست محیطی ناشی از کاربرد گسترده سموم شیمیایی، تمایل به استفاده از آفت کشهای زیستی را افزایش داده است و در این میان، عوامل بیوکنترلی مبتنی بر تریکودرما، در تحریک رشد گیاه و بهبود فعالیتهای خاک، نسبت به موجودات دیگر (ویروسها، باکتریها، نماتدها و پروتوزواها) تواناتر هستند (۱۱).

گونه‌های تریکودرما باعث افزایش جذب و غلظت ترکیبات غذایی شامل مس، فسفر، آهن، منگنز و سدیم در ریشه گیاهان در کشت هیدروپونیک می‌شوند که منجر به پیشرفت فعالیت ساز و کارهای جذب فعال گیاه می‌شود. گونه های تریکودرما به صورت همزیست با گیاه زندگی می‌کنند و قادر به رشد، رقابت و بقا در خاک و سایر بوم نظامها بوده و توانایی تشکیل کلنی روی ریشه‌های گیاهان را دارند و هنگامی که در معرض ریشه‌های سالم قرار می گیرند، تعداد آنها افزایش می‌یابد. تشکیل کلنی بر روی ریشه‌ها موجب رشد فزاینده ریشه و در نتیجه رشد کل گیاه و به موزات آن افزایش تولیدات گیاهی و افزایش باردهی اندامهای تولید مثلی گیاه می‌شود. آنها همچنین با غلبه بر تنشهای غیرزنده و بالا بردن میزان جذب عناصر غذایی و استفاده از نیتروژون قابل جذب توسط ریشه گیاه کمک می کنند و این از طریق حل کردن عناصر غذایی در خاک انجام می شود. اگر چه ساز و کار ژنتیکی و مولکولی این فرآیندها شناخته نشده است (۲)

تحقیقات صورت گرفته توسط جیگاتامبیگا و همکاران (۱۷) در زمینه تأثیر گونه‌های تریکودرما روی نماتدهای عامل ریشه گرهی نخل زینتی در مقایسه با آفت‌کش کاربوفوران (Carbofuran) نشان داد که ترکیب گونه‌های *T. harzianum* و *T. viride* می‌تواند نسبت به آفت‌کش مذکور جمعیت نماتدهای عامل ریشه گرهی و همچنین تعداد گالهای ایجاد شده در اثر آنها را روی ریشه درختان نخل زینتی به طور معنی‌داری کاهش دهند.

در استراتژی بیوکنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی و مدیریت تلفیقی آفات و بیماریهای گیاهی لزوم توجه به عوامل بیوکنترل و آنتاگونیست بومی از اهمیت زیادی برخوردار است زیرا در صورت استفاده از یک عامل بیوکنترلی غیربومی ممکن است آن عامل با شرایط جدید سازگار نشود و قادر به ایفای نقش اصلی خود در مدیریت آفات و بیماریهای گیاهی نگردد. بنابراین شناسایی گونه‌های تریکودرمای ذکر شده از محیط ریشه و فراریشه درختان گردو در استان همدان می‌تواند نویدی برای مطالعات بعدی در زمینه استفاده از آنها در مدیریت تلفیقی بیماریهای درختان گردوی این منطقه باشد.

منابع

۱- انصاری، خلیل.، فهیمی، ح.، خلیقی، ا. و لطیفیان، ح. ۱۳۷۹. بررسی و شناسایی قارچ‌های همزیست ریشه‌ای (میکوریز) در گردوی ایرانی در برخی از مناطق. پژوهش و سازندگی، ۱۳: ۷۹-۸۱،

۲- ایران نژاد، آ.، وطن پور ازغندی، ع.، رهنما، ح.، جلیانی، ن. و بزرگی پور، ر. ۱۳۸۹. بهبود ریشه زایی و سازگاری گیاهچه‌های کشت بافتی زیتون زرد با استفاده از باکتری *Agrobacterium rhizogenes* و قارچ *Trichoderma harzianum*. مجله به زراعی نهال و بذر، ۲-۲۶ (۱): ۸۵-۹۳

۳- بختیاری، م. ح. ۱۳۸۲. بررسی و شناسایی مقدماتی عوامل قارچی خاکزاد مولد زوال درختان گردو در استان همدان. خلاصه مقالات اولین همایش تخصصی گردوی کشور، همدان. صفحه ۸۱،

۴- خسروی، ه.، یخچالی، ب. و علیخانی، ح. ۱۳۸۸. تعیین پتانسیل تعدادی از ریزوبیومهای بومی به عنوان باکتریهای محرک رشد گیاه و نقش آنها در کاهش اتیلن تنشی. مجله زیست شناسی ایران، ۲۲ (۴): ۶۶۱-۶۷۰

۵- ظفری، د.، ارشاد، ج.، زارع، ر. و علیزاده، ع. ۱۳۸۲. تحقیقی در زمینه‌ی شناسایی گونه‌های *Trichoderma* در ایران. فصلنامه بیماری‌های گیاهی ایران، ۳۸: ۱۲-۲۲،

Archive of SID
www.SID.ir

۶- قادری، ف. و بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۸۶. پراکنش و اهمیت نسبی گونه‌های *Phytophthora* جدا شده از درختان گردو در حال زوال در استانهای فارس، کرمان و کهگیلویه و بویراحمد و واکنش برخی ژنوتیپ‌های گردو به آنها. بیماریهای گیاهی، ۴۳: ۱۶۳-۱۸۳.

۷- کاشی، ل. ۱۳۸۳. مطالعه فون نماتدهای ریشه گردو در استان همدان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی‌سینا همدان، ۱۷۹ صفحه.

۸- مردانی، ف.، سردابی، ح.، یوسفی، ب. و معروفی ح. ۱۳۸۸. استفاده از مالچ در موفقیت جنگل‌کاری با ژنوتیپ‌های برتر گردو (*Juglans regia* L.) در اراضی جنگلی استان کردستان. فصلنامه تحقیقات جنگل و صنوبر ایران، ۱۷: ۲۵-۳۲

۹- محمد زاده، ر.، مطلبی، م.، زمانی، م.ر. و بیدمشکی پور، ع. ۱۳۸۷. شناسایی، کلون کردن و مطالعه ساختار ژن ۱ و ۳ گلوکاناز (bgnI) جدایه قارچ (*Trichoderma virens* 10). مجله زیست شناسی ایران، ۲۱ (۳): ۴۸۳-۴۹۲

۱۰- نعیمی، ش.، اخوت، س.م.، جوان نیکخواه، م.، کردریچ، ل. و خسروی و. ۱۳۸۸. مطالعه فراوانی و پراکنش شبه گونه‌های *Trichoderma* در مزارع برنج استان مازندران. مجله دانش گیاهپزشکی ایران، ۴۰ (۲): ۷۹-۹۱

11- Al-Taweil, H. I., Osman, M. B., Aidil, A. H. and Yussof, W. M. W. 2009. Optimizing of *Trichoderma viride* cultivation in submerged state fermentation. American Journal of Applied Science, 6(7): 1277-1281.

12- Contreras-Cornejo, H, A., Macías-Rodríguez, L., Cortés-Penagos, C. and López-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an Auxin-dependent mechanism in Arabidopsis. Plant Physiology, 149: 1579–1592.

13- Davet, P. 1979. A technique for analyzing soil populations of *Trichoderma* spp. And *Gliocladium virens*. Annual Review of Phytopathology, 11: 529-534.

14- Elad, Y. and Chet, I. 1983. Improved selective medium for isolation of *Trichoderma* spp. from soil. Phytoparasitica, 11: 55-558.

15- FAO: http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx

16- Games, W. and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma* In: Kubicek, C. P. and Harman, G. E. (eds) *Trichoderma* and *Glicladium*. Vol. 1. pp. 3-34. Taylor & Francis, London, UK.

17- Jegathambigai, V., Karunaratne, M. D., Svinningen, A. and Mikunthan, G. 2008. Biocontrol of root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* damaging queen palm, *Livistona rotundifolia* using Trichoderma species. Commun Agriculture Applied Biology Science, 73(4): 681-687.

18- Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease, 87: 4-10.

19- Kraus, G., Druzhinina, I., Gams, W., Bissett, J., Zafari, D., Szakacs, G., Kopchinski, A., Prillinger, H.J., Zare, R. and Kubicek, C.P. 2004. *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. Mycologia, 96(5): 1059 - 1073.

20- Meincke, R., Weinert, N., Radi, V., Schloter, M., Smallas, K. and Berg, G. 2010. Development of a molecular approach to describe the composition of *Trichoderma* communities. Journal of Microbiological Methods, 80: 63–69

21- Samolski, I., Luis, A. D., Vizcaino, J. A., Monte, E., and Suarez, M. B. 2009. Gene expression analysis of the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* in the presence of tomato plants, chitin, or glucose using a high-density oligonucleotide microarray. BMC Microbiology, 9: 217.

22- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., and Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant pathogen interactions. Soil Biology & Biochemistry, 40: 1-10.

Archive of SID

www.SID.ir

Identification of *Trichoderma* spp. Related to Root and Rhizosphere of Walnut in Hamedan Province

Zafari D.[1], Karimi S.[1] and Mohammadi R.[2]

[1] Plant Patology Dept., Faculty of Agriculture, Buali Sina University, Hamedan, I.R. of Iran

[2] Plant Patology Dept., Faculty of Agriculture, University of Zabol, Zabol, I.R. of Iran

Abstract

Walnut is one of the most important trees that are cultivated in the large area in Iran. Various microorganisms comprising useful and harmful agents are associated with walnut root and rhizosphere. Almost all of the studies carried out for identification of microorganisms related to walnut until now, have been achieved on plant pathogen agents. Therefore in this research isolation and identification of *Trichoderma* spp. associated to walnut root and rhizosphere was studied. Sampling has performed of 68 places from Hamedan province and 235 isolates of *Trichoderma* were obtained. Macroscopic and microscopic features such as shape and size of conidium, conidiophore, phialide, chlamydospore, presence of aerial and submerged mycelia on culture media and growth rate as well as temperature examination data were used for identification of *Trichoderma* species. Consequently six species comprising *T. atroviride*, *T. brevicompactum*, *T. citrinoviride*, *T. harzianum*, *T. ghanense* and *T. longibrachiatum* were identified. Regarding to positive role of *Trichoderma* related to root and rhizosphere that cause increasing health and improving growth of plants, this study recommend a kind of horticultural management that could be able to protect and support these fungi in walnut root and rhizosphere.

Keywords: *Trichoderma*, Walnut, Rhizosphere, Fungus, Hamedan

Archive of SID

www.SID.ir