

معرفی روش‌های جداسازی و شناسایی هشت شبه‌گونه *Trichoderma*

گیلدانا مؤیدی^۱ و رضا مستوفی‌زاده قلم‌فرسا^{۲*}

۱- کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه پیام نور، بندرعباس

۲- دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی، بخش گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۰/۱۰/۲۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۰۳/۲۸

مؤیدی، گ. و مستوفی‌زاده قلم‌فرسا، ر. ۱۳۹۱. معرفی روش‌های جداسازی و شناسایی هشت شبه‌گونه *Trichoderma*. دانش بیماری‌شناسی گیاهی (۲): ۳۹-۳۱.

چکیده

شبه‌گونه‌های *Trichoderma* از مهم‌ترین قارچ‌های خاک‌زی متعارض قارچ‌های بیمارگر گیاهان می‌باشند، که در القای مقاومت در گیاهان زراعی نیز نقش دارند، بنابراین جداسازی و شناسایی آن‌ها می‌تواند کمک زیادی به استفاده از آن‌ها در مبارزه زیستی با بیمارگرها نماید. این قارچ‌ها را می‌توان با روش رقیق‌سازی سوسپانسیون خاک و کشت روی محیط‌های داوه، پپتون رزبنگال و یا سیب‌زمینی/دکستروز/آگار تعدیل شده، جداسازی کرد. شناسایی آن‌ها نیز بر اساس ویژگی‌های پرگنه‌ها، خصوصیات ریخت‌شناسی کنیدیوم‌برها، فیالیدها و کنیدیوم‌ها صورت می‌گیرد. هشتاد و پنج جدایه‌ی *Trichoderma* از ۲۵ نمونه‌ی خاک، ۸ منطقه‌ی چغندرکاری استان فارس به این روش جدا و خالص‌سازی شدند. با مطالعه صفات آن‌ها، ۸ شبه‌گونه‌ی *Trichoderma*، به اسامی *T. asperellum*، *T. tomentosum*، *T. spirale*، *T. longibrachiatum*، *T. harzianum*، *T. brevicompactum*، *T. atroviride* و *T. virens*، شناسایی شدند. روش‌های جداسازی، شناسایی و خصوصیات ریخت‌شناسی این قارچ‌ها شرح داده شده است.

واژه‌های کلیدی: چغندر قند، کنیدیوم، کنیدیوم‌بر، فیالید، *Trichoderma*

* مسئول مکاتبه، پست الکترونیک: rmostofi@shirazu.ac.ir

مقدمه

شبه‌گونه‌های *Trichoderma* قارچ‌های خاک‌زادی هستند که در سراسر دنیا یافت می‌شوند. خصوصیات ریخت‌شناسی این شبه‌جنس به خوبی شرح داده شده است (Rifai, 1969). این قارچ‌ها در جنگل‌های گرم و نیمه‌گرم مرطوب، هم‌چنین در جنگل‌های معتدل شمالی و حتی در مناطق خشک، یافت می‌شوند. بعضی از این قارچ‌ها، قادر به تولید بعضی از تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهان و تعدادی آنتی‌بیوتیک می‌باشند و از نظر القای مقاومت به انگل‌های قارچی در گیاهان، تحریک رشد گیاهان، اثر تعارضی و پادزیستی روی قارچ‌های بیمارگر گیاهان اهمیت دارند (Klein & Everleigh, 1998; Chaverri & Samuels, 2003).

۱- روش نمونه برداری از خاک

معمولاً در هر مزرعه، بسته به وسعت آن از پنج نقطه، پس از کنار زدن بقایای گیاهی سطحی خاک، از عمق ۱۰ تا ۳۰ سانتی‌متری، به طور متوسط ۱۰۰ گرم خاک نمونه‌برداری می‌شود. خاک‌های یک مزرعه با هم مخلوط شده، در یک کیسه پلاستیک تمیز ریخته می‌شوند. خاک‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه و درج مشخصات، در یخچال در ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری می‌شوند، یا بلافاصله برای جداسازی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Avila Miranda *et al.* 2006, Jakobikova *et al.* 2006). با این روش از خاک مزارع چغندر قند استان فارس در طول ۲ فصل زراعی ۱۳۸۶ و ۱۳۸۷، نمونه‌برداری شد.

۲- روش‌های جداسازی از خاک و خالص‌سازی

برای جداسازی شبه‌گونه‌های *Trichoderma* از خاک، ۱۰ گرم خاک به ارلن حاوی ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه و سوسپانسیون حاصله به مدت ۱۵ دقیقه روی دستگاه لرزا قرار داده می‌شود. به این ترتیب سوسپانسیون خاک با رقت 10^{-1} به دست می‌آید. با اضافه کردن یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به ۹ میلی‌لیتر آب مقطر سترون، رقت 10^{-2} سوسپانسیون خاک به دست می‌آید، $0/3$ میلی لیتر از هر رقت به طور یک‌نواخت روی سطح محیط‌کشت‌های داوه (Davet)، حاوی: ۱ گرم نیترات کلسیم، ۱ گرم کلرید کلسیم، ۲ گرم سوکروز، $0/25$ گرم نیترات پتاسیم، $0/25$ گرم سولفات منیزیم، $0/125$ گرم فسفات پتاسیم، $0/05$ گرم اسیدسیتریک، ۲۵ گرم آگار، ۱ لیتر آب مقطر و یا محیط پپتون‌رزبنگال (Pepton Rosebanga)، حاوی: ۵ گرم گلوکز، $0/5$ گرم پپتون، $0/5$ گرم سولفات منیزیم، $0/5$ گرم فسفات پتاسیم، $0/05$ گرم رزبنگال، ۲۰ گرم آگار، یک لیتر آب مقطر و یا سیب‌زمینی/دکستروز/آگار (Potato Dextrose Agar = PDA)، حاوی: ۳۰۰ گرم سیب زمینی، ۲۰ گرم گلوکز، ۱۶

گرم آگار، یک لیتر آب مقطر به همراه ۰/۱ گرم پودر لباس شویی یا NPX و ۰/۵ گرم آمپی سیلین، ریخته و تشتک-های پتری در دمای اتاق (25 ± 3 درجه‌ی سانتی‌گراد) نگهداری و رشد روزانه پرگنه قارچ، مورد بررسی قرار می‌گیرد. سپس جدایه‌ها به روش تک‌هاگ خالص‌سازی می‌شوند (Avila Miranda et al., 2006; Jakobikova et al., 2006). با این روش ۸۵ جدایه‌ی *Trichoderma* از ۲۵ نمونه‌ی خاک، ۸ منطقه‌ی چغندرکاری استان فارس جدا و خالص‌سازی شدند.

۳- روش شناسایی شبه‌گونه‌های *Trichoderma*

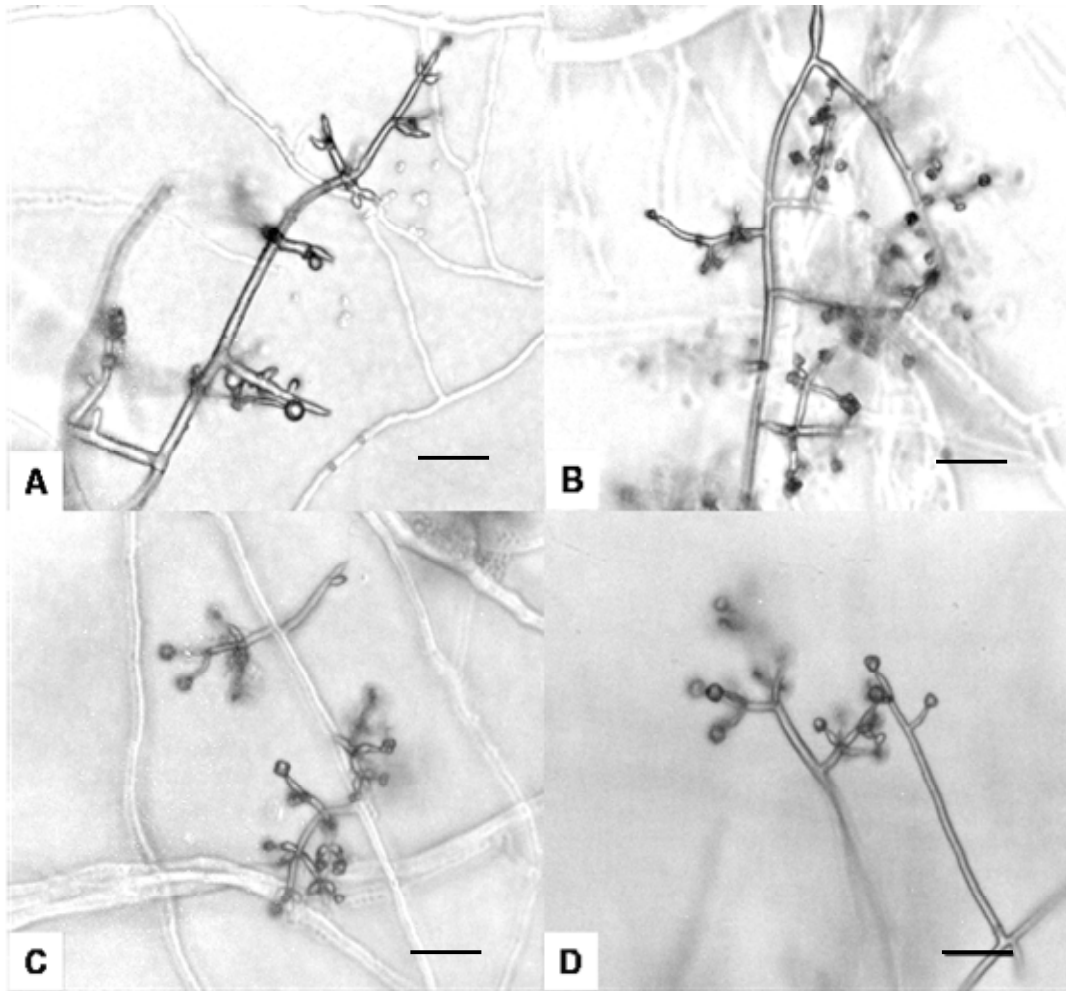
شبه‌جنس *Trichoderma* به ۵ بخش (section): ۱- *Trichoderma*، ۲- *Pachybasium*، ۳- *Longibrachiatum*، ۴- *Saturnisporum* و ۵- *Hypocreanum* تقسیم شده است. تشخیص شبه‌گونه‌ها بر اساس ویژگی‌های پرگنه، رشدی و خصوصیات ریخت‌شناختی شامل نحوه‌ی انشعاب کنیدیوم‌برها، شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های فیالیدها، کنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها و ریشه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی صورت می‌گیرد (Bisset, 1991; Gams & Bisset, 1998; Samuels et al., 2008).

۴- خصوصیات ریخت‌شناسی هشت شبه‌گونه‌ی *Trichoderma*

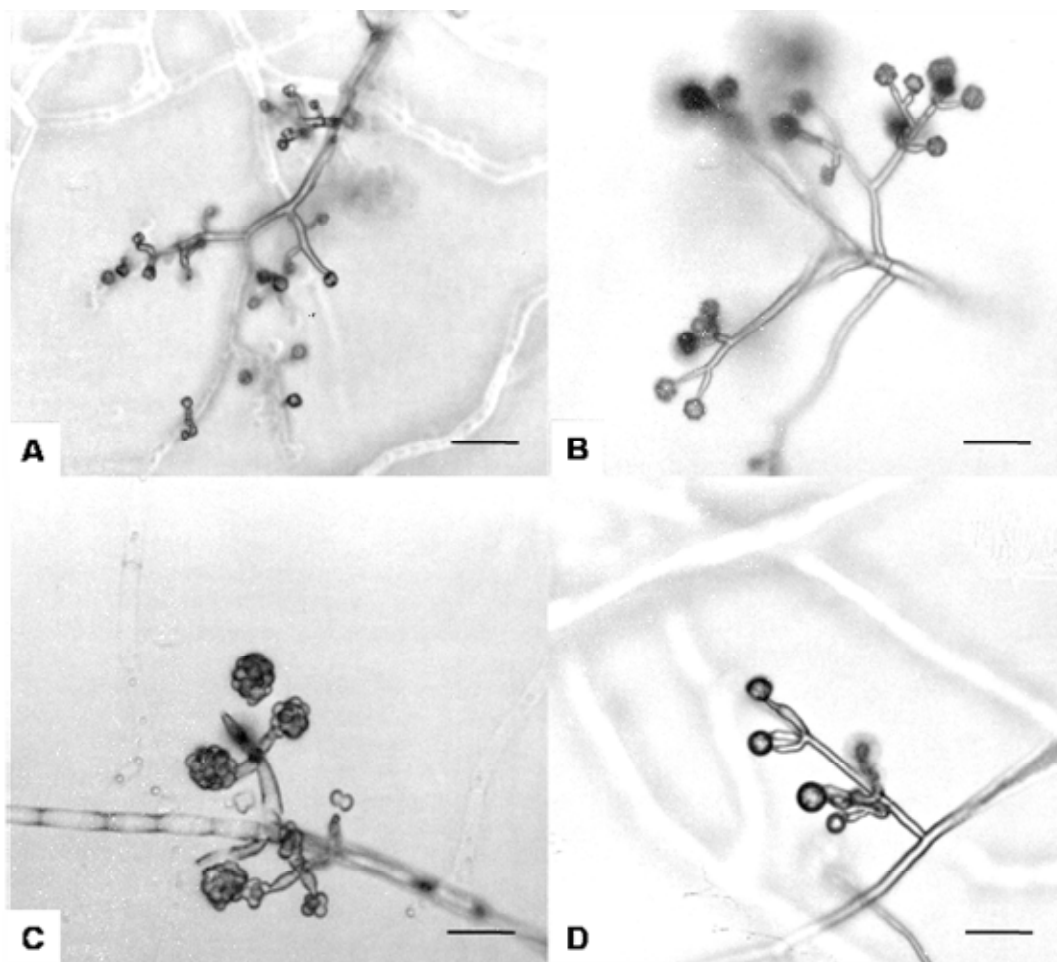
بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی پرگنه‌ها و خصوصیات ریخت‌شناختی شامل نحوه‌ی انشعاب کنیدیوم‌برها، شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های فیالیدها، کنیدیوم‌ها و ریشه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی، ۸۵ جدایه‌ی خاک مزارع چغندر قند استان فارس متعلق به ۸ شبه‌گونه از ۳ بخش *Pachybasium*، *Longibrachiatum* و *Trichoderma* از شبه‌جنس *Trichoderma* شناسایی شدند. خصوصیات مهم ریخت‌شناسی این قارچ‌ها در جدول ۱ آورده شده است. شکل کنیدیوم‌برها و فیالیدهای این ۸ شبه‌گونه نیز در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. شبه‌گونه‌ی *T. asperellum* از بخش *Trichoderma* دارای کنیدیوم‌برهای ظریف و قابل انعطاف با انشعاب‌های کم تراکم در فواصل منظم، به صورت پیرامونی، با بیش از ۳ شاخه هستند. فیالیدهای آن‌ها نیز کم تراکم و در دسته‌های دو تا سه‌تایی، حداکثر پنج‌تایی، به صورت پیرامونی و کوزه‌ای تا آمپولی شکل به نظر می‌رسند. کنیدیوم‌ها یک سلولی، گرد تا بیضی، سبز رنگ و دارای سطحی صاف هستند.

جدول ۱. خصوصیات مهم ریخت‌شناسی ۸ شبه‌گونه‌ی *Trichoderma* جدا شده از خاک مزارع چغندر قند استان فارس.

شبه‌گونه	پرگنه	کنید یوفور		فیالید		کنید یوم		
		رنگ	انشعاب‌ها	انتها عقیم	تجمع	شکل	اندازه (میکرومتر)	شکل
<i>T. asperellum</i>	جوش‌ها (دایره‌های متحدالمرکز)	سبز تیره	مقابل یا متناوب	-	۳-۲ تایی	استوانه‌ای تا آمپولی	گرد تا تخم‌مرغی	۳-۵×۳-۵×۳-۶
<i>T. atroviride</i>	جوش‌ها (دایره‌های متحدالمرکز)	سبزما یل به زرد	مقابل یا متناوب	-	۴-۲ تایی	قلابی تا آمپولی	گرد تا تخم‌مرغی	۵-۲/۵×۳/۵-۳×۴
<i>T. brevicompactum</i>	جوش‌های پراکنده	سبز روشن	دوتایی، مقابل	-	۳-۲ تایی	استوانه‌ای تا آمپولی	گرد تا تخم‌مرغی	۲-۳×۳/۵-۲/۵×۳
<i>T. harzianum</i>	جوش‌ها (دایره‌های متحدالمرکز)	سبز	۴-۳ تایی	-	۶-۳ تایی	آمپولی تا کوزه‌ای	گرد تا تخم‌مرغی	۲-۲/۵×۲/۵-۳×۲
<i>T. longibrachiatum</i>	جوش‌های پراکنده	سبزما یل به زرد	چندتایی و نامنظم	-	۳-۲ تایی	استوانه‌ای تا کوزه‌ای	تخم‌مرغی تا بیضی	۲-۳×۳/۵-۲×۳
<i>T. spirale</i>	جوش‌ها (دایره‌های متحدالمرکز)	سفید مایل به سبز	ساده یا متناوب	+	۴-۳ تایی	آمپولی	تخم‌مرغی تا بیضی	۲-۳×۳-۴/۵×۳
<i>T. tomentosum</i>	جوش‌های پراکنده	سفید مایل به سبز	۴-۲ تایی	+	۵-۳ تایی	تخم‌مرغی تا آمپولی	تخم‌مرغی تا بیضی	۲-۲/۵×۳-۲/۵×۵
<i>T. virens</i>	جوش‌های پراکنده	سبز تیره	خوشه‌ای شکل	-	۵-۲ تایی	کوزه‌ای تا آمپولی	تخم‌مرغی تا بیضی	۳-۳/۵×۴-۳×۳



شکل ۱. کنیدیوم‌بر و فیالید در ۴ شبه‌گونه‌ی *Trichoderma* جدا شده از خاک مزارع چغندر قند استان فارس،
T. asperellum :A ، *T. atroviride* :B ، *T. brevicompactum* :C ، *T. harzianum* :D
 (بار = ۲۵/۵ میکرومتر).



شکل ۲. کنیدیوم‌بر و فیالید در ۴ شبه‌گونه *Trichoderma* جدا شده از خاک مزارع چغندر قند استان فارس،

T. longibrachiatum :A ، *T. spirale* :B ، *T. tomentosum* :C ، *T. virens* :D

(بار = ۲۵/۵ میکرومتر).

شبه‌گونه‌های *T. brevicompactum*، *T. spirale*، *T. tomentosum*، *T. virens*، *T. harzianum*، از بخش *Pachybasium* دارای کنیدیوم‌برهایی بسیار قوی و غیرقابل انعطاف با انشعاب‌های پیرامونی فراوان، در فواصل منظم هستند که معمولاً در سطح پرگنه‌ها در کنار هم تولید می‌شوند و جوش‌های کنیدیومی را به وجود می‌آورند. نوک محور اصلی کنیدیوم‌بر در شبه‌گونه‌های *T. spirale* و *T. tomentosum* نازا می‌باشد. فیالیدهای این جدایه‌ها آمپولی شکل بوده، معمولاً در دسته‌های دو تا هفت‌تایی و به صورت پیرامونی روی کنیدیوم‌برها قرار دارند. کنیدیوم‌ها یک سلولی، گرد تا بیضی یا مستطیلی شکل، به رنگ سبز یا قهوه‌ای و دارای سطح صاف هستند.

شبه‌گونه‌های *T. longibrachiatum* و *T. atroviride* از بخش *Longibrachiatum*، دارای کنیدیوم‌برهایی با محور اصلی بلند و انشعاب‌ها نامنظم و کم تراکم، با انشعاب‌های ثانویه معمولاً کوتاه هستند. فیالیدها آمپولی تا کوزه‌ای شکل، معمولاً به صورت منفرد و نامنظم یا به ندرت به شکل دسته‌های چندتایی روی کنیدیوم‌برها قرار دارند. کنیدیوم‌ها یک سلولی، غالباً مستطیلی تا بیضی و دارای سطح صاف هستند. شبه‌گونه‌های این بخش رنگ زرد متمایل به سبز مشخصی در سطح زیرین پرگنه‌ها تولید می‌کنند (Gams & Bisset, 1998).

۵- نتیجه

روحانی و صفری (۱۳۷۷) نیز فهرستی از ۱۱ شبه‌گونه‌ی *Trichoderma* حاضر در خاک مناطق مختلف ایران را گزارش نموده‌اند. میرحسینی مقدم و همکاران در سال ۱۳۷۷ نیز ۴ شبه‌گونه از این جنس را از مزارع بادام‌زمینی استان گیلان گزارش کرده‌اند. پنج شبه‌گونه نیز از قارچ خوراکی دکمه‌ای گزارش شده است (Danesh et al., 2000). ظفری و همکاران (۱۳۸۱) نیز ۱۰ شبه‌گونه از این جنس، از نقاط مختلف کشور گزارش کرده‌اند. نظمی رودسری و همکاران (۱۳۸۵)، ۶ شبه‌گونه‌ی *Trichoderma* از استان‌های گیلان و مازندران گزارش کرده‌اند. نعیمی و همکاران (۱۳۸۷)، نیز ۶ شبه‌گونه از شالیزارهای استان مازندران گزارش کرده‌اند. بر اساس این گزارش‌ها در مجموع تاکنون ۱۶ شبه‌گونه‌ی *Trichoderma* از سایر مناطق ایران گزارش شده است که عبارتند از:

T. virens، *T. harzianum*، *T. aureoviride*، *T. koningi*، *T. hamatum*، *T. parceramosum*، *T. viride*، *T. longibrachiatum*، *T. polysporum*، *T. pseudokoningi*، *T. saturnisporum*، *T. brevicompactum* و *T. asperellum*، *T. tomentosum*، *T. inhamatum*، *T. citrinoviride*، کارایی این قارچ‌های بومی را می‌توان برای مبارزه زیستی با قارچ‌های بیماری‌زای خاک‌زاد محصولات زراعی، سبزی، صیفی و زینتی کشور آموذ.

منابع

- روحانی، ح.، و صفری، م. ۱۳۷۷. معرفی گونه‌های تریکودرمای ایران. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران، کرج، ص ۳۰۰.
- ظفری، د.، ارشاد، ج.، زارع، ر.، و علیزاده، ع. ۱۳۸۱. تحقیقی در زمینه‌ی شناسایی گونه‌های *Trichoderma* در ایران. بیماری‌های گیاهی ۳۸: ۲۱-۴۵.
- میرحسینی مقدم، س. ع.، ایزدی‌ار، م.، و روحانی، ح. ۱۳۷۷. بررسی اثر آنتاگونیستی گونه‌هایی از تریکودرما روی قارچ *Sclerotium rolfsii* عامل پوسیدگی ساقه‌ی بادام زمینی. خلاصه مقالات سیزدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. کرج: ۱۰۹.
- نظمی رودسری، ف.، ظفری، د.، هونگ، س. ب.، خداپرست، س. ا.، و روحانی، ح. ۱۳۸۵. تاکسونومی گونه‌های تریکودرما متعلق به بخش *Trichoderma* به کمک ویژگی‌های مورفولوژیکی، توالی rDNA ITS و ژن tef در استان‌های گیلان و مازندران. خلاصه مقالات هفدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. کرج: ۴۲۲.
- نعیمی، ش.، اخوت، م.، نیکخواه، م. ج.، کردیچ، ل.، و خسروی، و. ۱۳۸۷. معرفی گونه‌های شبه‌جنس *Trichoderma* جدا شده از شالیزارهای استان مازندران. خلاصه مقالات هیجدهمین کنگره گیاه‌پزشکی ایران. همدان: ۶۲۶.
- Avila Miranda, M.E., Herrera Estrella, A., Pena Cabriales, J.J. 2006. Colonization of the rhizosphere, rhizoplane and endorhiza of garlic by strains of *Trichoderma harzianum* and their capacity to control allium white-rot under field conditions. Soil. Bio. Biotech. 38: 1823-1830.
- Chaverri, P. and Samuels, G.J. 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota. Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. Stud. Mycol. 48: 1-116.
- Danesh, Y.R., Goltapesh, E.M. and Rouhani, H. 2000. Identification of *Trichoderma* species causing green mould in button mushroom farms, distribution and their relative abundance. Proc. 15th. Internat. Cong. Sci. Cult. of Fungi. Maastricht, Natherlands: 653-656.
- Gams, W. & Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. Pp: 3-34. In: C.P. Kubicek & Harman, G. E. (eds). *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. I. Taylor & Francis, London, UK.

- Jakubikova, L., Subikova, V., Nemcovic, M. & Farkas, V. 2006. Selection of natural isolates of *Trichoderma* spp. for biocontrol of *Polymixa betae* as a vector of virus causing Rhizomoniasis in sugar beet. *Biolo. Bratislava*. 61: 347-351.
- Klein, D. & Everleigh, D. E. 1998. Ecology of *Trichoderma*. Pp: 57-74. In: C.P. Kubicek & Harman, G. E. (eds). *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. I. Taylor & Francis, London, UK.
- Rifai, M. A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1-56.
- Samuels, G. J., Petrini, O., Kuhls, K., Lieckfeldt, E. & Kubicek, C. P. 1998. The *Hypocreaschweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Studies in Mycology* 41: 1-54.