



شناسایی گونه‌های غالب تریکودرما در باغات پسته‌ی استان کرمان

فهمیه میرخانی^{۱*} - حسین علایی^۲ - امیرحسین محمدی^۳ - معصومه حقدل^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۲/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۰۴

چکیده

به منظور شناسایی گونه‌های تریکودرما، نمونه برداری طی سال‌های ۱۳۸۹-۱۳۹۱ از خاک باغ‌های پسته، در مناطق مختلف استان کرمان به صورت تصادفی از عمق صفر تا ۴۰ سانتی متری و ناحیه‌ی ریزوسفر انجام شد. تعداد ۱۹۴ نمونه خاک به آزمایشگاه منتقل و اسیدیته و شوری خاک (EC و pH) اندازه‌گیری شد و با استفاده از محیط کشت انتخابی TSM، در مجموع تعداد ۱۱۷ جدایه‌ی تریکودرما جداسازی گردید. محدوده‌ی مقدار pH در خاک‌های مورد آزمایش، ۷ تا ۸/۳ و برای مقدار EC ۱/۵ تا ۱۲/۳ دسی زیمنس بر متر اندازه‌گیری شد. شناسایی شکل شناسی جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ماکرومورفولوژیک از قبیل نحوه‌ی رشد و شکل پرگنه، وجود یا عدم وجود جوش، تولید رنگدانه و نحوه‌ی اسپورزایی و ویژگی‌های میکرومورفولوژیکی مانند شکل و نحوه‌ی انشعاب کنیدیفور، شکل و اندازه‌ی فیالیید، کنیدیوم و کلامیدوسپور روی محیط کشت‌های PDA و CMD با استفاده از کلیدهای معتبر انجام شد. شناسایی بر پایه‌ی مشخصه‌های مولکولی با استفاده از تکثیر و ترادف نوکلئوتیدی ناحیه‌ی ITS از DNA ریبوزومی شامل ITS1، ITS2 و 5.8S با استفاده از جفت آغازگرهای ITS4-ITS1F انجام و جدایه‌ها با استفاده از پایگاه بانک ژن NCBI و برنامه‌ی TrichOKEY 2.0 شناسایی شدند. بر اساس ویژگی‌های شکل‌شناسی و مولکولی جدایه‌های شناسایی شده متعلق به چهار گونه‌ی *Trichoderma harzianum*، *T. longibrachiatum* و *T. brevicompactum* می‌باشند. بیش از ۵۰ درصد جدایه‌های این تحقیق، به گونه‌ی *T. harzianum* تعلق داشتند که به عنوان گونه‌ی غالب خاک باغ‌های پسته‌ی استان کرمان معرفی گردید. اگر چه بر اساس آنالیز رگرسیونی، رابطه‌ی معنی‌داری بین فراوانی جمعیت تریکودرما و مقادیر pH و EC در خاک باغ‌های پسته‌ی این منطقه وجود نداشت ($R^2=0.25$, $Pr=0.74$) اما با توجه به این که تریکودرما در pH اسیدی تنوع و گسترش بیشتری دارد، قلیایی بودن خاک می‌تواند یکی از دلایل کاهش تعداد و تنوع گونه‌های تریکودرما در نمونه‌های خاک مورد آزمایش باشد. بر اساس بررسی‌های انجام شده، این مطالعه اولین گزارش از شناسایی و بررسی تنوع گونه‌ای تریکودرما در میزبان پسته می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، شکل‌شناسی، DNA ریبوزومی، آنالیز رگرسیونی

مقدمه

شکل‌شناسی و مولکولی امکان‌پذیر است. با ظهور روش‌های مولکولی، تحقیقات گسترده‌ای از اواسط دهه‌ی ۹۰ میلادی برای ارزیابی مجدد تاکسونومی گونه‌های تریکودرما شروع شد. دروزینینا و همکاران (۱۴) سیستم بارکد DNA را برای شناسایی دقیق و سریع *Trichoderma/Hypocrea* در سطح جنس و گونه براساس توالی‌های بازی مشخص در ناحیه‌ی rDNA-ITS و براساس توالی چهارمین اینترون *tefl* ابداع کردند. این روش در قالب برنامه‌ی TrichoKEY 2.0 و TrichoBLAST در وبسایت مربوط به زیرکمیت‌های تاکسونومی *Trichoderma* و *Hypocrea* (ISTH) از کمیت‌های بین‌المللی تاکسونومی قارچ‌ها عرضه شده است. دروزینینا و کوبیچک (۱۵) جنس تریکودرما را براساس ترکیب روش‌های شکل‌شناسی، فیزیولوژیکی و ژنتیکی در سه بخش *PachybasiumB*، *Trichoderma/PachybasiumA* و *Longibrachiatum* که شامل ۱۴ کلاد و ۸۸ گونه بود، طبقه‌بندی کردند. بسیاری از محققین برای شناسایی جدایه‌های تریکودرما

جنس تریکودرما اولین بار در آلمان توسط پرسون در سال ۱۷۹۴ معرفی شد. ریفاپی (۴۲)، جنس تریکودرما را با توجه به خصوصیات ریخت‌شناسی پرگنه، کنیدیوفور، کنیدیوم به نه گروه طبقه‌بندی نمود و کلیدی برای شناسایی آن پیشنهاد داده است. بیست (۵، ۶، ۷ و ۸) جنس تریکودرما را به ۵ بخش *Pachybasium*، *Trichoderma*، *Longibrachiatum*، *Saturnisporum* و *Hypocrea* طبقه‌بندی نمود. بیست و همکاران (۹) ادعان داشتند که تفکیک دقیق و درست گونه‌های تریکودرما، تنها از طریق تلفیق بررسی‌های

۱ و ۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی و استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان
(*) نویسنده مسئول: Email: Nasim_mirkhani@yahoo.com
۳ و ۴- استادیار و مربی بخش گیاهپزشکی، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده پسته، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران

استان کرمان شامل (رفسنجان، سیرجان، زرنده، انار، راور و شهرابک) طی سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۸۹ به صورت تصادفی از عمق صفر تا ۴۰ سانتی‌متری خاک و ناحیه‌ی فراریشه (ریزوسفر) جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد و بلافاصله برای جداسازی گونه‌های تریکودرما مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین EC و pH خاک‌های مورد استفاده

جهت تعیین رابطه‌ی بین مقادیر EC و pH با فراوانی جمعیت تریکودرما، میزان EC و pH خاک‌هایی که تریکودرما از آن‌ها جداسازی گردید، تعیین شد. pH نمونه‌ها در گل اشباع با دستگاه pH متر ۷۴۴ (Metrohm، سوئد) با استفاده از روش احیایی و به‌بهانی‌زاده (۱۶) تعیین گردید. قابلیت هدایت الکتریکی نمونه‌ها نیز، با روش عصاره‌گیری از گل اشباع انجام شد (۱۶). در این روش عصاره‌ی گل اشباع هر یک از نمونه‌ها با استفاده از دستگاه عصاره‌گیر گرفته و از کاغذصافی عبور داده شد. سپس EC محلول حاصل با استفاده از دستگاه هدایت‌سنج ۳۳۱۰ (WTW، آلمان) تعیین گردید.

جداسازی قارچ تریکودرما از خاک

نمونه‌های خاک با روش سری رقت تهیه و روی محیط کشت انتخابی (TSMC (Trichoderma Selective Medium+Captan کشت داده شدند (۱۷). برای تهیه‌ی این محیط ۰/۲ گرم $7H_2O$ ، $MgSO_4$ ، ۰/۹ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۱۵ گرم KCL، ۱ گرم NH_4NO_3 ، ۳ گرم گلوکز و ۱۷ گرم آگار در یک لیتر آب حل شده و پس از سترون کردن در اتوکلاو، ۵۰ میلی‌گرم در لیتر پنی‌سیلین و استرپتومایسین و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کاپتان ۵۰ درصد پودر وتابل، ۰/۱۲ گرم در لیتر رزبنگال و ۰/۲ گرم در لیتر PCNB اضافه گردید. ۵۰ گرم از هر نمونه‌ی خاک به ۴۵۰ میلی‌لیتر آب آگار ۰/۱ درصد (جرمی-حجمی) سترون اضافه شد و به مدت ۳۰ تا ۴۵ دقیقه روی شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت. برای تهیه رقت‌های 10^{-1} ، 10^{-2} و 10^{-3} یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل به نه میلی‌لیتر آب آگار ۰/۱ درصد سترون اضافه گردید. سپس از هر رقت یک میلی‌لیتر روی سطح محیط کشت انتخابی پخش گردید، که برای هر رقت پنج تکرار در نظر گرفته شد (۲۵). تستک‌های مایه‌زنی شده ابتدا در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت در تاریکی نگهداری شده و پس از آن به مدت ۷ تا ۱۰ روز در تناوب روشنایی/تاریکی (۱۲/۱۲ ساعت) نگهداری شدند. جدایه‌های تریکودرما‌ی رشد یافته در محیط کشت انتخابی، به روش تک‌اسپور خالص شده و در لوله‌های حاوی محیط شیب‌دار PDA و دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

شناسایی شکل‌شناسی

به‌منظور شناسایی شکل‌شناسی جدایه‌ها در سطح بخش و سپس

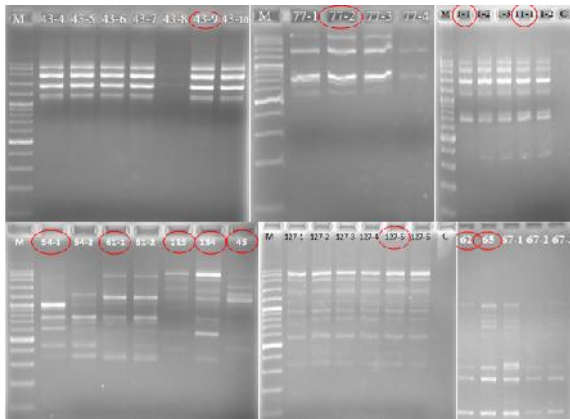
مقایسه‌ی توالی نواحی ITS و *tefl* از برنامه‌ی TrichoKEY و TrichoBLAST استفاده کردند (۳، ۱۰ و ۳۴). در ایران سیزده گونه از جنس تریکودرما از نمونه‌های خاک سراسر کشور توسط ظفری و همکاران (۴۶ و ۴۷) و ۶ گونه‌ی جدید از نمونه‌های خاک، چوب و مواد گیاهی در سواحل جنوبی دریای خزر توسط نظمی رودسری و همکاران (۳۹) شناسایی و گزارش شده است. نعیمی و همکاران (۳۸)، ۲۰۲ جدایه‌ی به‌دست آمده از مزارع برنج را براساس ویژگی‌های شکل‌شناسی و مولکولی از طریق تکثیر ناحیه‌ی rDNA-ITS با استفاده از برنامه‌ی TrichoKEY 2.0 بررسی و شناسایی کردند. در دنیا مطالعات زیادی روی تاکسونومی گونه‌های جنس تریکودرما صورت گرفته ولی در ایران بیشتر پژوهش‌های انجام گرفته مربوط به جنبه‌های کنترل بیولوژیکی برخی از گونه‌های تریکودرما بوده و شناسایی گونه‌ها به صورت محدود و مقطعی صورت گرفته است (۴۶). از طرفی اگرچه تعداد زیادی از آنتاگونیست‌ها در آزمایش‌های با مقیاس کوچک مؤثر هستند اما برای اثبات اثرشان در مقیاس تجاری، مشکلات زیادی وجود دارد که درک کامل از نقش آنتاگونیستی قارچ، به مطالعه‌ی بیش‌تر محیط‌زیست‌شناسی قارچ در مزرعه نیاز دارد (۲۴). با توجه به این که در مبحث استفاده از عوامل آنتاگونیستی در کنترل بیولوژیک، بحث استقرار موفق عوامل بیوکنترل اولین و مهم‌ترین قدم می‌باشد، بنابراین شناسایی عوامل بیوکنترل بومی و مؤثر، جهت استفاده علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی در یک منطقه از اهمیت قابل-توجهی برخوردار است (۳۳). شناسایی تاکسون‌های تریکودرما بومی در خاک و اقلیم‌های مختلف به انتخاب نژادهای بومی و کاربردی مؤثر کمک خواهد کرد (۲۲). تحقیقات زیادی در زمینه‌ی بررسی تنوع گونه‌ای تریکودرما در خاک مناطق مختلف دنیا صورت گرفته از آن جمله می‌توان به مطالعات انجام شده در آسیای جنوب شرقی (۲۹)، استرالیا (۴۵)، آمریکای جنوبی (۱۴)، چین (۴۸)، ساردینیا (۳۷)، نواحی گرمسیری شامل مکزیک، پاناما، اکوادور، پرو، برزیل و کلمبیا (۲۳)، لهستان (۱۰) اشاره نمود. در مورد خاک‌های قلیایی نیز قرباوی و همکاران (۲۲) وجود فقط دو گونه‌ی *T. harzianum* و *H. orientalis* را در اطراف رود نیل در مصر گزارش کردند. تاکنون تحقیقی در مورد تنوع گونه‌های تریکودرما در خاک‌های قلیایی و خشک باغ‌های پسته در ایران و جهان انجام نشده است. مطالعه حاضر با هدف شناسایی، بررسی تنوع گونه‌ای تریکودرما و معرفی گونه‌ی غالب در خاک باغ‌های پسته استان کرمان، براساس ترکیب روش‌های شناسایی شکل‌شناسی و مولکولی انجام شده است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

در مجموع تعداد ۱۹۴ نمونه‌ی خاک از مناطق مختلف پسته‌کاری

آغازگرها و ۱/۲۵ واحد آنزیم Taq DNA Polymerase بود. واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در دستگاه ترموسایکلر C-1000 (Bio Rad) با شرایط زیر: پنج دقیقه واسرشت اولیه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس و ۴۰ چرخه به صورت ۹۵ درجه سلسیوس (یک دقیقه)، ۴۵ درجه سلسیوس (یک دقیقه)، ۷۲ درجه سلسیوس (یک دقیقه) و در نهایت ۱۰ دقیقه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصول حاصل از واکنش PCR روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۱- الگوی اثر انگشتی DNA با استفاده از نشانگر RAPD و آغازگر تصادفی A-5 در جدایه‌های مختلف تریکودرما (جهت تعیین نماینده)

Figure 1- RAPD PCR fingerprinting patterns from genomic DNA of *Trichoderma* isolates generated with primer A-5, M: 3kb ladder (VC 100bp Plus DNA Ladder, Mass ruler Mix, 0.1-3kb)

محصولات PCR جدایه‌های نماینده با استفاده از کیت Axyprep PCR Cleanup Kit خالص‌سازی شدند و برای تعیین توالی ناحیه‌ی تکثیر شده، به انستیتوی ملی بیوتکنولوژی کشاورزی کره‌ی جنوبی فرستاده شدند. توالی‌های به‌دست آمده برای نواحی ITS1 و ITS2 ابتدا با نرم‌افزار BioEdit مورد بازبینی قرار گرفت. سپس توالی‌ها در پایگاه اطلاعاتی بانک ژنی (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) ارائه شدند. توالی‌ها براساس بالاترین درصد شباهت با توالی‌های معتبر موجود در بانک ژن و برنامه‌ی TrichoKEY 2.0، در سایت اختصاصی تریکودرما (www.isth.info/tools/blast/index.php) مقایسه گردید (۱۴ و ۲۶).

نتایج و بحث

شناسایی شکل‌شناسی و مولکولی گونه‌ها

در این مطالعه، در مجموع ۱۱۷ جدایه‌ی تریکودرما از خاک باغ‌های پسته جداسازی شد، که با استفاده از صفات شکل‌شناسی و

گونه، میزان رشد، خصوصیات ماکروسکوپی پرگنه‌ها و مشخصات میکرومورفولوژیک آن‌ها روی محیط کشت‌های مختلف PDA (Potato Dextrose Agar) و CMD (Corn Meal Agar+Dextrose) مورد مطالعه قرار گرفت. محیط کشت PDA برای بررسی خصوصیات ماکروسکوپی جدایه‌ها مانند نحوه‌ی رشد، رنگ و شکل پرگنه (خوابیده یا کرکی بودن)، وجود یا عدم وجود جوش، نحوه‌ی کنیدیوم‌زایی (به صورت جوش و دسته‌ای یا به صورت پراکنده) و وجود یا عدم وجود رنگدانه در پشت تشک پتری استفاده شد. برای بررسی خصوصیات میکروسکوپی مانند شکل و نحوه‌ی انشعاب کنیدیوفور، شکل و اندازه‌ی فیالید، شکل و اندازه‌ی کنیدی و وجود یا عدم وجود کلامیدوسپور از محیط کشت CMD استفاده شد. برای تهیه این محیط کشت مقدار پنج گرم در لیتر دکستروز به محیط پایه CMA افزوده گردید. یک بلوک میسلیمی به ابعاد پنج میلی‌متر از هر جدایه، به تشک‌های پتری حاوی محیط CMD منتقل گردید و تشک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت پنج روز نگه‌داری شدند. در این مرحله از روی الگوی انشعاب و شاخه‌شاخه شدن کنیدیوفور و نیز از روی شکل و آرایش فیالیدها، تشخیص و شناسایی جدایه‌ها در سطح بخش (Section) انجام شد. شناسایی دقیق گونه‌ها با استفاده از کلید شناسایی گمس و بیست (۱۹) و کلید موجود در پورتال یا سایت تریکودرما (http://nt.ars-grin.gov/taxadescription/keys/TrichodermaIndex.cfm) انجام شد.

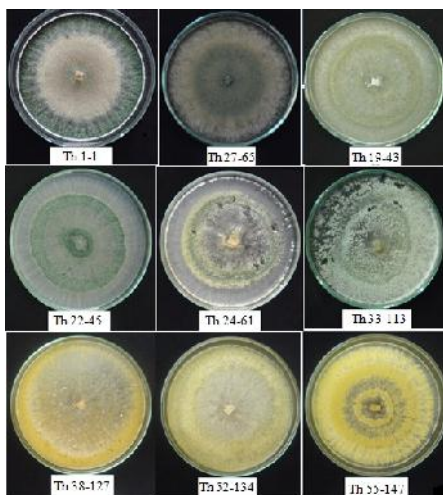
انتخاب جدایه‌های نماینده

جدایه‌های تریکودرما براساس ظاهر و شکل‌شناسی پرگنه روی محیط PDA (معیارهای ماکروسکوپی) و بررسی خصوصیات میکروسکوپی گروه‌بندی شدند. سپس تمامی جدایه‌های مربوط به بخش‌های مختلف، برای بررسی الگوی اثر انگشتی DNA، با استفاده از نشانگر مولکولی RAPD و آغازگر تصادفی (5' -AGGGGTCTTG-3' A-5 (۱۳) آنالیز شدند. سپس از هر گروه (گروه بندی شکل‌شناسی و مولکولی) یک نماینده و جمعاً ۱۶ نماینده برای انجام سایر آزمایشات مولکولی انتخاب گردید (شکل ۱).

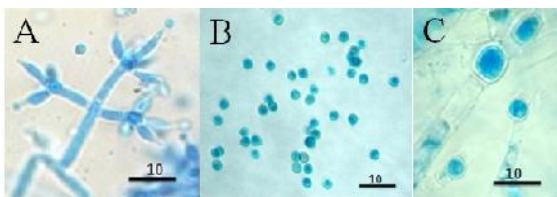
استخراج DNA و تکثیر و تعیین توالی ناحیه rDNA-ITS

استخراج DNA ژنومی با استفاده از ۲% CTAB به روش علایی و همکاران (۲) صورت گرفت. ناحیه‌ی ITS مربوط به rDNA هسته-ای در ۱۶ جدایه‌ی نماینده با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1F (۲۱) و ITS4 (۴۴) تکثیر شد. مخلوط واکنش در هر لوله‌ی PCR (۵۰ میکرولیتر) شامل بافر PCR (۱۰ میلی‌مولار تریس-اسید کلریدیک و ۵۰ میلی‌مول کلرید پتاسیم 9 pH)، ۲/۵ میلی‌مولار MgCl₂، ۰/۲ میلی‌مولار dNTPs، ۰/۲ میکرومولار از هر یک از

ژنی ITS1، ۲۰۷ باز است. در این ناحیه در بین جدایه‌های مختلف چهار تفاوت بازی وجود دارد. طول ناحیه‌ی بین ژنی ITS2، ۱۷۴ باز است. در این ناحیه نیز هفت تغییر بازی در بین جدایه‌های مختلف وجود دارد. اختلاف‌های بازی موجود در نواحی ITS1 و ITS2، در بین جدایه‌های مختلف مربوط به گونه‌ی *T. harzianum* نشان-دهنده‌ی تنوع درون‌گونه‌ای (Intraspecific-Variation) می‌باشد (شکل ۸- Th127, Th43) و (شکل ۷).



شکل ۲- تنوع اشکال پرگنه مربوط به جدایه‌های *Trichoderma harzianum* روی محیط PDA بعد از ۷ روز
Figure 2- Variety colony forms isolates of *Trichoderma harzianum* on PDA medium after of 7 days



شکل ۳- *Trichoderma harzianum* A: Phialides B: Conidia C: Chlamyospore
کلامیدوسپور

Figure 3- *Trichoderma harzianum*- A: Phialides B: Conidia C: Chlamyospore

***Trichoderma virens* (J.H. Miller, Giddens & A.A. Foster) von Arx, 1987**

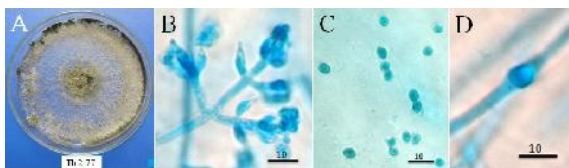
در این گونه، ریشه‌های هوایی، کرکی و به رنگ زرد مات هستند (شکل ۴A). دیواره‌ی صاف دارند و حدود ۱۲-۱/۸ میکرومتر عرض دارند. جدایه‌های این گونه تعداد زیادی کلامیدوسپور به صورت انتهایی یا میانی، به شکل کروی تا بیضوی تولید می‌کنند. کنیدیوم‌زایی به صورت پراکنده در تمام سطح کلونی صورت می‌گیرد. تا حدود نصف

مولکولی در نهایت چهار گونه‌ی *T. harzianum* (Rifai) (Kraus) (*T. brevicompactum* (J.H. Miller, Giddens & A.A. Foster) و *T. virens* Foster) به شرح زیر شناسایی شدند.

***Trichoderma harzianum* Rifai, 1969**

ریشه‌ها به صورت هوایی و کرکی تا خوابیده و غوطه‌ور در محیط می‌باشد. کنیدیوم‌زایی در جدایه‌های مختلف متفاوت و به صورت جوش‌های متراکم تا پراکنده، یا به صورت متراکم نزدیک حاشیه‌ی تشک‌ها است، که مرکز پرگنه بدون اسپور است و یا به صورت دوائر متحدالمرکز مشاهده می‌شود. جوش‌ها ابتدا به رنگ سفید ظاهر شده اما بعد در بعضی از جدایه‌ها به رنگ سبز روشن تا سبز تیره و در بعضی دیگر به رنگ سبز متمایل به زرد تبدیل می‌شوند. در تعدادی نیز، به رنگ زرد در می‌آیند (شکل ۲). کلامیدوسپور در بعضی از جدایه‌ها به تعداد خیلی کم و در بعضی فراوان و به صورت انتهایی یا میانی، به شکل کروی تا بیضوی تشکیل می‌شود. الگوی انشعاب کنیدیوفور به صورت کم‌تراکم و منظم است. مجموعه ساختمان کنیدیوفور (محور اصلی همراه با انشعابات اولیه و ثانویه) هرمی شکل است. این گونه متعلق به بخش *Pachybasium* و کلاد *Lixii* است. تولید فیالیدها از قسمت پایه شروع می‌شود، به همین دلیل در مراحل اولیه‌ی رشد، نوک کنیدیوفور نازا به نظر می‌رسد، ولی در مرحله‌ی بلوغ کنیدیوفور به صورت منظم منشعب شده و تا نوک زایاست. فیالیدها آمپولی شکل تا تقریباً کروی و تنگی شکل بوده که به طور ناگهانی در محل تولید کنیدیوم‌ها باریک می‌شوند و اندازه‌ی آن‌ها ۳-۱×۵ میکرومتر است. فیالیدهای انتهایی بلندتر هستند و طول آن‌ها تا ۱۲ میکرومتر نیز می‌رسد. فیالیدها معمولاً در شاخه‌های فراهم سه تا پنج‌تایی قرار می‌گیرند و برخی مواقع جفت هستند. کنیدی‌ها کروی، نیمه‌کروی تا تخم‌مرغی و بیضوی کوتاه هستند. اندازه‌ی آن‌ها ۳-۱/۸×۱/۸-۴ میکرومتر است. سطح کنیدیوم‌ها صاف و به رنگ سبز روشن تا بی‌رنگ هستند (شکل ۳A-C). پرگنه‌ی قارچ دارای رشد سریع می‌باشد. رنگ پشت پرگنه نیز در جدایه‌های مختلف بین سفید، کرم و زرد متغیر است. ۷۴/۳۶ درصد جدایه‌های جداسازی شده متعلق به این گونه می‌باشد. تکثیر ناحیه‌ی rDNA-ITS در ۱۲ جدایه‌ی مربوط به این گونه، با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1F/ITS4 موفقیت‌آمیز بود و در همه‌ی جدایه‌ها باند حدود ۶۵۰ جفت‌بازی تکثیر شد. مقایسه‌ی نتایج به‌دست آمده از توالی‌یابی جدایه‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Clustal X و پایگاه اطلاعاتی NCBI و برنامه‌ی TrichoKEY مشخص کرد که جدایه‌های (Th 1-1, Th 4-11, Th 27-19-43, Th 22-45, Th 23-53, Th 24-61, Th 26-62, Th 33-113, Th 38-127, Th 52-134, Th 55-147) به-عنوان *T. harzianum* (آنامورف *H. lixii*) با درصد تشابه ۹۹ و ۱۰۰ درصد با توالی‌های مرجع معتبر، می‌باشند (شکل ۷). طول ناحیه‌ی بین

مشاهده می‌شود. جوش‌ها ابتدا سفید رنگ و بعد از حدود یک هفته شروع به تغییر رنگ می‌دهند و سبز می‌شوند. جوش‌ها تقریباً پهن و نیمه‌کروی هستند (شکل ۵A). الگوی انشعاب کنیدیوفور شبیه بخش *Pachybasium* است، که کنیدیوفورها اغلب پهن و منشعب هستند. فیالیدها در دسته‌های دو تا پنج‌تایی و گاهی منفرد تشکیل می‌شوند. آن‌ها پهن و آمیولی شکل و گاهی باریک و کشیده و تقریباً هم‌گرا و متراکم هستند. اندازه‌ی فیالیدها $1/8-3/2 \times 5-10$ میکرومتر است. کنیدیوم‌ها کروی، نیمه‌کروی تا بیضوی شکل بوده و صاف هستند. اندازه‌ی آن‌ها $2-3 \times 2-4$ میکرومتر است (شکل ۵B-D). پشت پرگنه‌ی این قارچ‌ها روی محیط PDA، بدون رنگ است. تکثیر ناحیه‌ی rDNA-ITS در گونه‌ی *T. brevicompactum* نیز، با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1F/ITS4 موفقیت‌آمیز بود و باند حدود ۶۵۰ جفت‌بازی تکثیر شد. جدایه‌ی Tb 2-77 به‌عنوان *T. brevicompactum* شناسایی شد (شکل ۷). مقایسه‌ی توالی ناحیه‌ی ITS جدایه‌های مربوط به دو گونه‌ی *T. harzianum* و *T. brevicompactum* نشان داد که در ناحیه‌ی ITS1 در ۲۶ باز و در ناحیه‌ی ITS2 در ۲۳ باز با هم تفاوت دارند (شکل ۸). مقایسه‌ی توالی ITS دو گونه‌ی *T. longibrachiatum* و *T. brevicompactum* نیز نشان داد که در ناحیه‌ی ITS1 ۴۷ تفاوت بازی و در ناحیه‌ی ITS2 ۱۲ تفاوت بازی بین دو گونه وجود دارد. در ناحیه‌ی ابتدایی 28S، دو گونه اختلاف تک بازی دارند (شکل ۸-Tb77, T154).

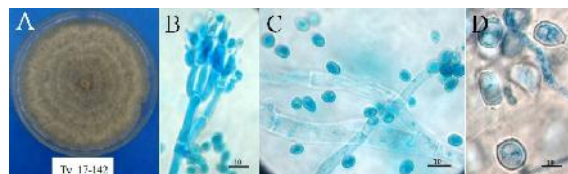


شکل ۵- *Trichoderma brevicompactum* - A: ظاهر پرگنه روی محیط PDA بعد از ۸ روز B: فیالید C: اسپور D: کلامیدوسپور
Figure 5- *Trichoderma brevicompactum*- A: colony formation on PDA medium after of 8 days B: Phialides C: Conidia D: Chlamydospore

Trichoderma longibrachiatum Rifai, 1969

در این گونه، ریشه‌ها غالباً داخل محیط کشت رشد می‌نمایند و ریشه‌های هوایی اندک و محدود به حاشیه‌ی محیط کشت می‌شوند. ریشه‌ها بی‌رنگ و دارای دیواره‌ی صاف بوده و عرض آن‌ها $1/5-12$ میکرومتر است. کنیدیوم‌زایی به رنگ سبز تیره و به‌صورت متراکم تمام سطح محیط کشت را می‌پوشاند. سطح پرگنه حالت لایه‌لایه دارد (شکل ۶A). کلامیدوسپورها فراوان و بی‌رنگ، نیمه‌کروی تا بیضوی و دارای دیواره‌ی صاف هستند. الگوی انشعاب کنیدیوفور شبیه بخش *Longibrachiatum* است یعنی کنیدیوفورها بلند و ایستاده، با انشعابات کم‌تراکم و نامنظم که با محور اصلی تشکیل زاویه‌ی قائمه

طول پایه‌ی کنیدیوفور نازک و غیرمنشعب است، اما به طرف نوک کنیدیوفور، شاخه‌ها به‌طور نامنظم منشعب شده و هر یک به یک دسته‌ی سه تا شش‌تایی از فیالیدها منتهی می‌شوند. الگوی انشعاب کنیدیوفورها تقریباً شبیه *Gliocladium* هستند. یعنی به‌صورت هم-گرا در یک حالت Penicillate قرار می‌گیرند. این گونه نیز متعلق به بخش *Pachybasium* و کلاد *Virens* می‌باشد. فیالیدها تنگی شکل تا آمیولی شکل و هم‌گرا هستند. اندازه‌ی آن‌ها $2-4 \times 5-12$ میکرومتر می‌باشد. کنیدیوم‌ها تخم‌مرغی تا بیضوی بوده و اندازه‌ی آن‌ها $2-5 \times 2-6$ میکرومتر است و دارای دیواره‌ی صاف هستند (شکل ۴B-D). پرگنه‌ی قارچ دارای رشد متوسطی است. رنگ پشت پرگنه روی محیط PDA زرد تا زرد کهربایی می‌باشد. تکثیر ناحیه‌ی rDNA-ITS در دو جدایه‌ی متعلق به این گونه، با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1F/ITS4 موفقیت‌آمیز بود و باند ۶۵۰ جفت‌بازی تکثیر شد. جدایه‌های Tv 3-132 و Tv 17-142 نیز به‌عنوان *T. virens* شناسایی شدند (شکل ۷). مقایسه‌ی توالی ITS دو گونه‌ی *T. virens* و *T. harzianum* نشان داد که بین توالی این گونه‌ها در ناحیه‌های ژنی 18S، 5.8S و 28S هیچ تفاوت بازی وجود ندارد. اما در ناحیه‌ی ITS1 در پنج باز و در ناحیه‌ی ITS2 در ۱۱ باز با هم تفاوت هستند (شکل ۸-Tv142, Th43). تفاوت بازی بین این دو گونه نسبت به گونه‌های دیگر کمتر است. دلیل این امر آن است که، توالی ITS گونه‌ی *T. virens* تشابه و ارتباط نزدیکی با *T. harzianum* دارد. مقایسه‌ی توالی ITS دو گونه‌ی *T. virens* و *brevicompactum* نیز نشان داد که بین دو گونه فقط در ناحیه‌ی ITS1، ۲۳ تفاوت بازی و در ناحیه‌ی ITS2 ۱۲ اختلاف بازی وجود دارد (شکل ۸-Tv142, Tb77). مقایسه‌ی توالی ITS دو گونه‌ی *T. longibrachiatum* و *T. virens* نیز نشان داد که بین آن‌ها در ناحیه‌ی ITS1، ۴۶ تفاوت بازی و در ناحیه‌ی ITS2، هشت تفاوت بازی وجود دارد (شکل ۸-Tv142, T154).

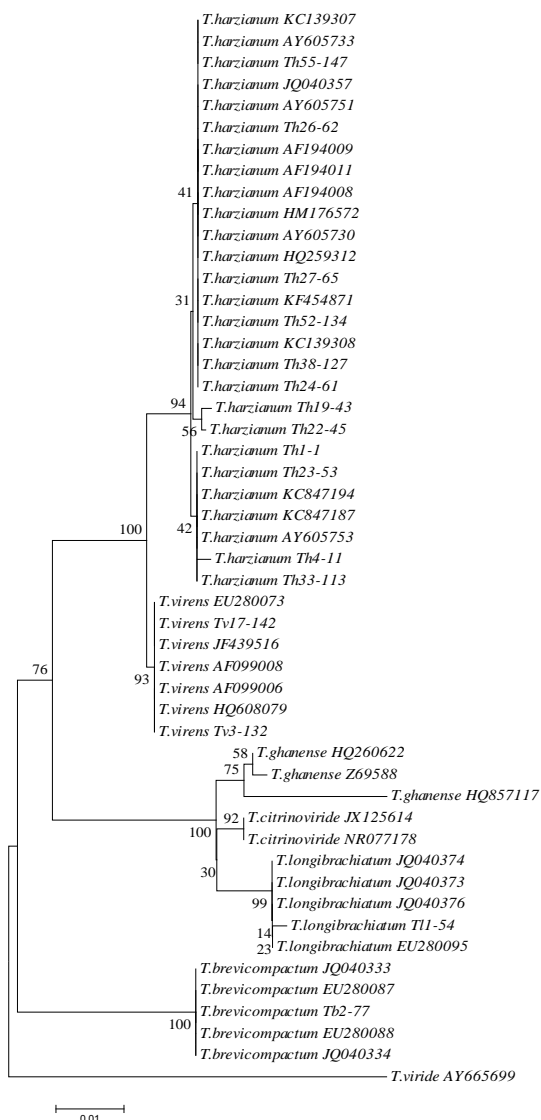


شکل ۴- *Trichoderma virens* - A: ظاهر پرگنه روی محیط PDA بعد از ۷ روز B: فیالید C: اسپور D: کلامیدوسپور
Figure 4- *Trichoderma virens*- A: colony formation on PDA medium after of 7 days B: Phialides C: Conidia D: Chlamydospore

Trichoderma brevicompactum G.F. Kraus, C.P. Kubicek & W. Gams, 2004

در این گونه، ریشه‌ها به‌صورت غوطه‌ور در محیط و سفید رنگ هستند. کنیدیوم‌زایی به‌صورت جوش‌های پراکنده در سطح محیط

طول بیشتر و عرض کمتری داشتند.



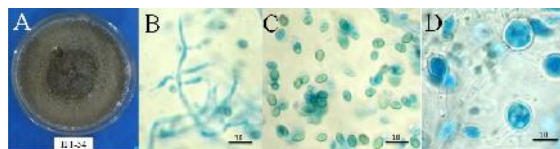
شکل ۷- روابط تکاملی گونه‌های بخش *Pachybasium* و

Longibrachiatum براساس روش Neighbour-Joining. آزمون اعتبارسنجی با ۱۰۰۰ تکرار در کنار انشعابات نشان داده شده‌است.

T. viride AY 665699 به‌عنوان outgroup استفاده شده است. Figure 7- Phylogenetic tree of representative isolates of *Trichoderma* belonging to section *Pachybasium* and *longibrachiatum*, inferred by Neighbour Joining analysis of ITS1, 5.8s and ITS2 sequences in MEGA 4.0. *T. viride* (Accession No. AY665699) was used as an outgroup. The bootstrap support from 1000 replication is indicated on the branches. Isolates of related to *T. harzianum*: Th19-43, Th23-53, Th1-1, Th4-11, Th33-113, Th26-62, Th52-134, Th27-65, Th22-45, Th55-147, Th38-127 and Th24-61; *T. virens*: Tv3-132, Tv17-142, *T. brevicompactum*: Tb2-77 and *T. longibrachiatum*: Tl1-54

می‌دهند و یا این که نوک آن‌ها به طرف محور اصلی کنیدیوفور خم می‌شود. فیالیدها بلند و باریک، تنگی شکل تا سیلندری خصوصا فیالید انتهایی که بلندتر و نازک‌تر و کم‌ویش نوک‌تیز است. فیالیدها غالبا به‌صورت منفرد روی کنیدیوفور تشکیل می‌شوند، یا گاهی به‌صورت دسته‌های دو تا سه‌تایی تولید می‌شوند. اندازه‌ی آن‌ها ۲-۱۰ × ۵-۱۰ میکرومتر است. طول فیالید انتهایی تا ۱۲ میکرومتر نیز می‌رسد. کنیدیوم‌ها بیضوی کشیده تا تخم‌مرغی کشیده هستند و اندازه‌ی آن‌ها ۲/۷-۲/۷ × ۴/۲-۴/۲ میکرومتر است (شکل ۶B-D). پرگنه‌ی قارچ رشد سریعی دارد. رنگ پشت کلونی روی محیط PDA سبزرزد درخشان می‌باشد.

تکثیر ناحیه‌ی rDNA-ITS در این گونه نیز، با استفاده از آغازگرهای عمومی ITS1F/ITS4 موفقیت‌آمیز بود و باند ۶۵۰ جفت-بازی تکثیر شد. جدایه‌ی Tl 1-54 به‌عنوان *T. longibrachiatum* شناسایی گردید (شکل ۷). مقایسه‌ی توالی ناحیه‌ی ITS جدایه‌های *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* نیز نشان داد که بین دو گونه در ناحیه‌ی ITS1 ۴۵ تفاوت بازی و در ناحیه‌ی ITS2 ۱۷ اختلاف بازی وجود دارد (شکل ۸- Tl54, Th43). براساس نتایج حاصل، بیشترین تغییر بازی بین گونه‌ها مربوط به ناحیه‌ی ITS1 می‌باشد.



شکل ۶- *Trichoderma longibrachiatum* - A: ظاهر پرگنه روی محیط PDA بعد از ۵ روز B: فیالید C: اسپور D: کلایدوسپور
Figure 6- *Trichoderma longibrachiatum* - A: colony formation on PDA medium after of 5 days B: Phialides C: Conidia D: Chlamydospore

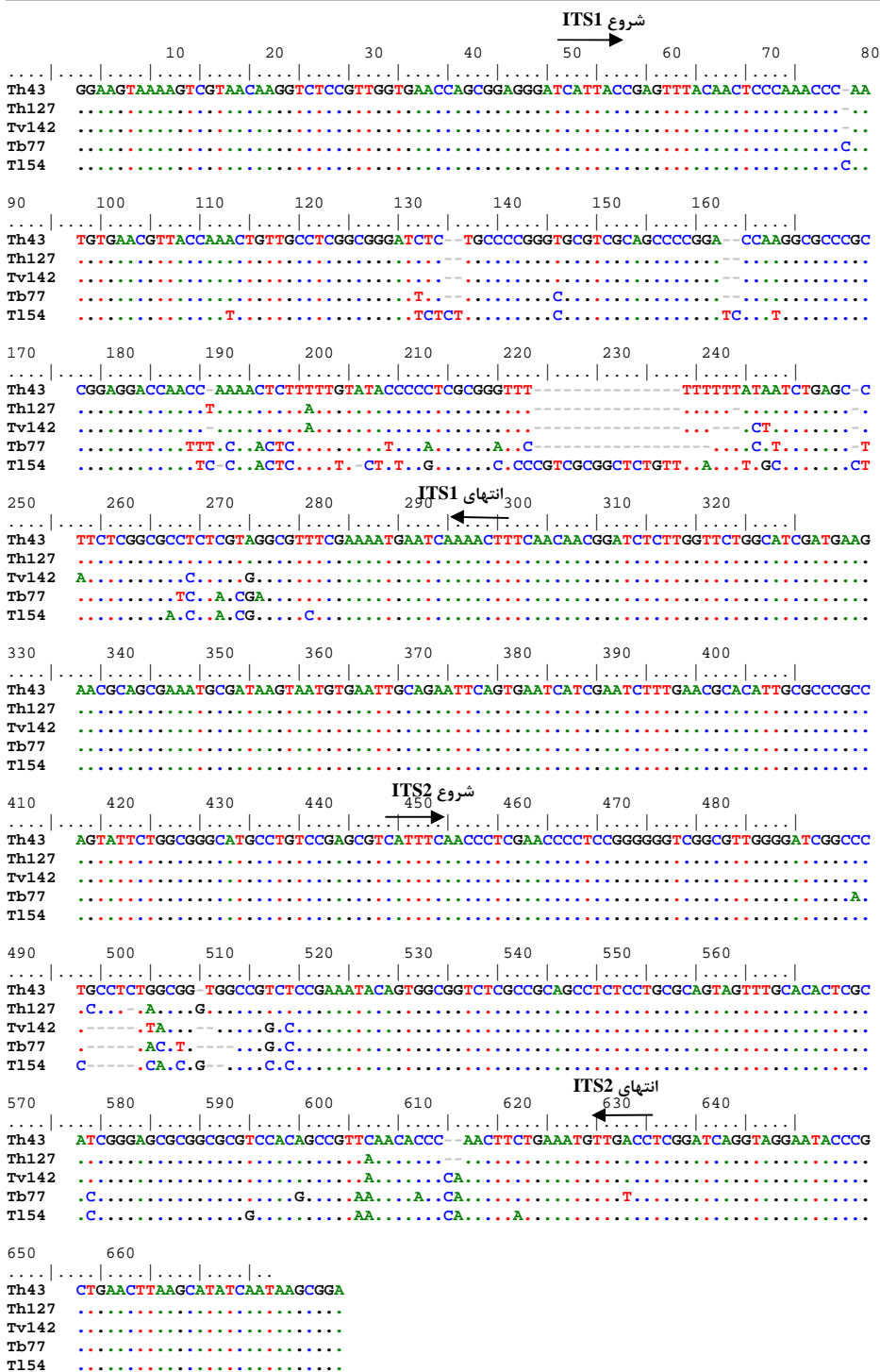
تریکودرما با فرم جنسی *Hypocrea* از جمله قارچ‌های همه-جازی است که در خاک، مواد آلی و چوب‌های در حال تجزیه به فراوانی یافت می‌شوند و در مناطق جغرافیایی مختلف، از اعضای غالب میکروفلور خاک به‌شمار می‌روند (۲۹). در این پژوهش جدایه‌های مربوط به گونه‌ی *T. harzianum* با داشتن کنیدیوفورهای کم-تراکم و منظم و کنیدی‌های کروی و کوچک و فیالیدهای تنگی شکل و تقریبا کوتاه از سایر گونه‌های تریکودرما قابل تفکیک هستند. این گونه توسط دانش و همکاران (۴۱) از قارچ خوراکی جدا و معرفی شده است. فنوتیپ پرگنه‌ی اعضای این گونه تنوع زیادی دارد. خصوصیات ماکرو - میکرومورفولوژیکی مشاهده شده با توصیف گمس و بیست (۱۹)، ظفری و همکاران (۴۶) مطابقت داشت. فقط ابعاد فیالید در تعدادی از جدایه‌های بررسی شده، متفاوت بود، به‌طوری که فیالیدها

برداری شده، جدایه‌هایی از تریکودرما به دست آورد، در صورتی که میشل و همکاران (۳۵) جدایه‌های تریکودرما را از ۸۸ درصد مکان-های نمونه برداری به دست آوردند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که خاک باغ‌های پسته‌ی استان کرمان از نظر تعداد جدایه‌ها و همچنین تنوع گونه‌ای تریکودرما غنی نیستند و نشان‌دهنده‌ی این است که جدایه‌های این جنس مهم با شرایط اکولوژیکی خاک باغ‌های پسته چندان سازگار نیست. دلیل این امر احتمالاً می‌تواند فاکتورهای محیطی مؤثر روی رشد و تکثیر این جنس قارچی از قبیل دمای خاک، رطوبت خاک، pH، مقدار مواد آلی و غذایی در دسترس، نوع گیاه، ساختمان و بافت خاک و ترکیب اتمسفری خاک باشد.

ترکیب، بیومس و فعالیت بیولوژیکی جمعیت‌های میکروبی در خاک به فاکتورهای شیمیایی و فیزیکی مهم وابسته هستند که قارچ-ها، خصوصاً گونه‌های تریکودرما نیز از این امر مستثنی نمی‌باشند (۲۰). مقدار pH در خاک‌هایی که تریکودرما از آن‌ها جداسازی شد به علاوه‌ی تعدادی از خاک‌هایی که تریکودرما از آن‌ها جداسازی نشد از قبیل (علی‌آباد رفسنجان، زرن، خیرآباد، صدرآباد و طالب‌آباد انار)، ۷ تا ۸/۳ بود، که این محدوده، نشان‌دهنده‌ی pH بازی است. در حالی-که، اکوت و همکاران (۴۰) و کامپوز و همکاران (۱۲) گزارش کردند که تریکودرما در خاک‌های اسیدی فراوان‌تر است. اکرمی و همکاران (۱) اشاره داشتند که دما و pH دو فاکتور کلیدی برای رشد، اسپورزایی و توانایی ساپروفیتی و تولید متابولیت‌های فرار و غیرفرار هستند. از طرف دیگر، نشان داده شده است که استرین‌های تریکودرما در محدوده‌ی وسیعی از pH فعال هستند، اما در pH اسیدی تنوع و گسترش بیشتری دارند. همچنین دمای بهینه برای رشد در میان استرین‌های تریکودرما متفاوت است. اگرچه بیشتر استرین‌ها مزوفیلیک هستند (۲۸). نتایج پژوهش حاضر، نشان می‌دهد که تریکودرما در زیستگاه‌های مختلف وجود دارد، اما فراوانی آن در خاک‌های قلیایی کمتر است. نتایج تحقیق حاضر با نتایج قرباوی و همکاران (۲۲) مطابقت دارد. آن‌ها از خاک‌های قلیایی (pH ۷/۳ تا ۸/۴) در نه منطقه‌ی جغرافیایی مختلف در شمال رود نیل در مصر نیز فقط دو گونه‌ی *T. harzianum* و *H. orientalis* را جداسازی و شناسایی کردند. در واقع گونه‌های موجود در خاک‌های قلیایی، احتمالاً نسبت به pH بالا متحمل هستند و گونه‌های تریکودرما موجود در خاک‌های قلیایی، اعضای بومی خاک محسوب می‌شوند (۲۲). مقدار EC در خاک‌های مورد آزمایش در این پژوهش، بین ۱/۵ تا ۱۲/۳ دسی زیمنس بر متر متغیر بود. محدوده‌ی این دو فاکتور در خاک باغ‌های پسته‌ی استان کرمان تقریباً یکسان است، ولی از تعداد زیادی از نمونه‌ها با داشتن مقادیر pH و EC یکسان، تریکودرما جداسازی نشد.

گونه‌ی *T. virens*، با داشتن الگوی انشعاب کنیدیوفوری شبیه *Gliocladium* و فیالیدهای هم‌گرا و کنیدیوم‌های سبز و بزرگ به-راحتی از سایر گونه‌های تریکودرما قابل تشخیص هستند. در ایران این گونه ابتدا با نام *Gliocladium virens* از خاک‌های ایران جدا شده است (۴). گونه‌ی *T. virens* توسط دانش و همکاران (۴۱) از قارچ خوراکی جدا و گزارش شده است. خصوصیات ماکرو-میکرومورفولوژیکی مشاهده شده با توصیف گمس و بیست (۱۹)، ظفری و همکاران (۴۶). ولی عرض فیالید، در جدایه‌های بررسی شده از اندازه‌ی ذکر شده در توصیفات فوق کمتر است. گونه‌ی *T. longibrachiatum* نیز با داشتن کنیدیوفور تپیک بخش *Longibrachiatum* از گونه‌های سایر بخش‌ها و با میزان رشد روی محیط کشت PDA در دماهای ۳۰ و ۴۰ درجه سلسیوس، اندازه‌ی کنیدیوم‌ها و بی‌رنگ ماندن سطح زیرین پرگنه‌ها در دمای ۴۰ درجه از سایر گونه‌های بخش خود قابل تشخیص است. این گونه قبلاً از ایران توسط دانش و همکاران (۴۱) از قارچ خوراکی جدا و معرفی شده است. خصوصیات ماکرو-میکرومورفولوژیکی مشاهده شده با توصیف گمس و بیست (۱۹)، ظفری و همکاران (۴۶) مطابقت دارد. هر چهار گونه‌ی معرفی شده در بالا، توسط روحانی و صفری (۴۳) از نمونه‌های مختلف، از نقاط مختلف ایران جداسازی و شناسایی شدند. گونه‌ی *T. brevicompactum* با داشتن کنیدیوفور تپیک بخش *Pachybasium* براساس خصوصیات شکل‌شناسی فقط در سطح بخش شناسایی شد. شناسایی مولکولی، شناسایی شکل‌شناسی را تأیید کرد و گونه‌ی *T. brevicompactum* به چهار گونه‌ی قبلی اضافه شد. این گونه اولین بار توسط کرائوس و همکاران (۲۷) از خاک و پوست درخت در آمریکای شمالی، مرکزی و جنوبی و جنوب‌شرق و جنوب‌غرب آسیا جداسازی شد و براساس خصوصیات شکل‌شناسی و فیزیولوژیکی و بررسی توالی‌های ITS1، ژن 5.8S و ITS2 از DNA ریبوزومی و بخشی از ژن *tefl* شناسایی گردید. خصوصیات مشاهده شده در این گونه با توصیفات کرائوس و همکاران (۲۷) مطابقت دارد، ولی طول فیالید در جدایه‌های بررسی شده در این تحقیق بلندتر از اندازه‌ی ذکر شده توسط آن‌ها می‌باشد. مطابق گزارش قارچ‌های ایران (۱۸) اگرچه، گونه‌های معرفی شده در این تحقیق برای فلور قارچی ایران جدید نیستند، ولی اولین تحقیق انجام شده در زمینه‌ی بررسی تنوع گونه‌ای تریکودرما در خاک‌های قلیایی و میزبان پسته در ایران می‌باشد.

در این مطالعه قارچ‌های تریکودرما، از ۱۳/۴٪ نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده از باغ‌های پسته‌ی استان کرمان جداسازی شدند (۲۶) نمونه از ۱۹۴ نمونه‌ی خاک). کامپوز (۱۲) نیز در نمونه‌برداری‌های انجام شده از ایالت مکزیک، فقط توانست از ۲۲ درصد مناطق نمونه



شکل ۸- مقایسه‌ی نقشه‌ی توالی ناحیه‌ی rDNA-ITS گونه‌های *T. brevicompactum* (Tv142) *T. virens* (Th43,Th127) *T. harzianum* (T154) *T. longibrachiatum* و (Tb77)

Figure 8- Alignment of the complete nucleotide sequence of the internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) region of the nuclear ribosomal RNA genes of *Trichoderma harzianum* (Th43,Th127), *T. virens* (Tv142), *T. brevicompactum* (Tb77) and *T. longibrachiatum* (T154) isolates including the 5.8S subunit. The sequences are written 5' to 3'. Identical nucleotides are indicated by dots. The ITS1 and ITS2 regions are marked with arrows

۷۸ جدایه را به عنوان *T. harzianum* شناسایی کردند و آن را به- عنوان فراوان ترین گونه معرفی کردند. کارواجال و همکاران (۲۳) نیز این گونه را دومین گونه‌ی غالب موجود در خاک‌های مزارع کاکائو، قهوه و کائوچو در تعدادی از کشورهای گرمسیری نظیر مکزیک، پاناما، اکوادور، پرو، برزیل و کلمبیا معرفی کردند. توزیع و گسترش جهانی و تنوع تریکودرما در چندین مطالعه بررسی و به اثبات رسیده است (۳۱). *T. harzianum* متداول ترین گونه‌ی گزارش شده در این جنس می‌باشد و در اکوسیستم‌ها و موقعیت‌های اکولوژیکی مختلف حضور دارد. جدایه‌های این گونه بیشترین تنوع را از نظر مشخصات ظاهر پرگنه از خود نشان دادند. با توجه به اهمیت جنس تریکودرما در کنترل بیولوژیکی بیمارگرهای گیاهی، شناسایی گونه‌های موجود در منطقه و معرفی گونه‌ی غالب حائز اهمیت می‌باشد. این نکته برای انجام تحقیقات بعدی، به خصوص کاربرد نژادهای بیوکنترل در مزرعه، بسیار مهم خواهد بود.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه ولی عصر (عج) رفسنجان به جهت تامین مالی بخشی از هزینه‌های اجرای این پژوهش از محل پژوهانه تشکر و قدردانی می‌گردد. نویسندگان از آقایان محمد گرجی (جهاد کشاورزی انار)، حسین کهنوجی (جهاد کشاورزی نوق و کبوترخان)، حیدر معصومی (موسسه تحقیقات پسته کشور) و حسن سعیدی نژاد و امید نبی‌زاده به خاطر همکاری و کمک در جمع‌آوری نمونه‌های خاک تشکر و قدردانی می‌نمایند.

با توجه به نتایج به‌دست آمده می‌توان چنین استنباط کرد که، pH و EC خاک فاکتورهایی هستند که روی حضور، تراکم، طول عمر، تکثیر و تنوع این جنس قارچی تاثیر می‌گذارند. اما فاکتورهای تعیین-کننده نیستند، چرا که آنالیز رگرسیونی نیز نشان داد که، ارتباط مستقیم و معنی‌داری میان مقدار pH و EC این خاک‌ها با فراوانی جمعیت تریکودرما وجود ندارد ($R^2=0.25$, $Pr=0.74$, $0.26>0.05$). الزاماً فاکتورهای دیگری از قبیل رطوبت خاک، دمای خاک، ساختار و بافت خاک، مقدار مواد آلی موجود در خاک، نوع گیاه، نوع گونه و هم-چنین وجود میکروارگانیسم‌های دیگر در خاک روی سازگاری یک گونه در یک منطقه تاثیر می‌گذارند. در واقع خاک محیط کمپلکسی است که واکنش متقابل چندین فاکتور در آن، می‌تواند روی تعداد و تنوع و فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک تأثیر بگذارد (۱۱). *T. harzianum* با ۷۴/۳۶ درصد فراوانی از کل جمعیت جدایه‌ها، فراوان ترین گونه‌ی شناسایی شده از باغ‌های پسته‌ی استان کرمان می‌باشد. نتایج تحقیقات ظفری و همکاران (۴۶) نیز نشان داد که گونه *T. harzianum* فراوان ترین گونه‌ی تریکودرما در ایران است. نیمی و همکاران (۳۸) نیز *T. harzianum* را به‌عنوان فراوان ترین گونه‌ی جدا شده از خاک مزارع برنج استان مازندران معرفی کردند. *T. harzianum* فراوان ترین گونه‌ی تریکودرما در دنیا هم می‌باشد (۴۲). *T. harzianum* گونه‌ای با گسترش وسیع در نواحی معتدله‌ی شمالی از قبیل آمریکای شمالی، اروپا و آسیا است (۴۸). کول‌نیگ و همکاران (۳۲) نیز *T. harzianum* را به‌عنوان فراوان ترین گونه‌ی جدا شده از خاک مناطق سردسیری معرفی کردند. کویچک و همکاران (۲۹) نیز از ۹۶ جدایه حاصل از خاک‌های جنوب شرق آسیا،

منابع

- 1- Akrami M., Golzary H., and Ahmadzadeh M. 2011. Evaluation of different combinations of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of lentil. African Journal of Biotechnology, 10: 2653-2658.
- 2- Alaei H., Baeyen S., Maes M., Hofte M., and Heungens K. 2009. Molecular detection of *Puccinia horiana* in *Chrysanthemum x morifolium* through conventional and real-time PCR. Journal of Microbiological Methods, 76:136-145.
- 3- Anees M., Tronsmo A., Edel-Hermann V., Hjeljord L.G., Heraud C., and Steinberg C. 2010. Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. Fungal Biology, 114:691-701.
- 4- Bazgir E., Rouhani H., and Okhovat M. 1991. Evaluation of antagonistic effect of *Gliocladium* sp. on *Rhizoctonia solani* the causal agent of bean damping-off and seed rot. p. 108. Proceeding of the 10th plant protection congress of Iran, 1-5 sep. 1991. Kerman, Iran.
- 5- Bissett J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sect. Nov. Canadian Journal of Botany, 62:924-931.
- 6- Bissett J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany, 69:2357-2372.
- 7- Bissett J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section Pachybasium. Canadian Journal of Botany, 69:2373- 2417.
- 8- Bissett J. 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section Longibrachiatum. Canadian Journal of Botany, 69:2418-2420.
- 9- Bissett J., Szakacs G., Nolan C.A., Druzhinina I., Gradinger C., and Kubicek C.P. 2003. New species of

- Trichoderma* from Asia. Canadian Journal of Botany, 81:570-586.
- 10- Blaszczyk L., Popiel D., Chelkowski J., Koczyk G., Samuels G.J., Sobieralski K., and Siwulski M. 2011. Species diversity of *Trichoderma* in Poland. Journal of Applied Genetics, 52:233-243.
 - 11- Bourguignon, E. 2008. Ecology and diversity of indigenous *Trichoderma* species in vegetable cropping systems. Ph.D dissertation, National Centre for Advanced Bio-Protection Technologies, Lincoln University.
 - 12- Campos, A.R.M. 2012. Isolation native strain of *Trichoderma* spp from soil horticulture tiluca valley with potential of biocontrol on *Sclerotinia*. Tropical and Subtropical Agroecosystems, 15:357-365.
 - 13- Chacraborty B.N., Chacraborty U., Saha A., Dey P.L., and Sunar K. 2010. Molecular characterization of *Trichoderma viride* and *Trichoderma harzianum* isolated from soils of North Bengal based on rDNA markers and analysis of their PCR-RAPD profiles. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry, 5:55-61.
 - 14- Druzhinina I.S., Kopchinskiy A.G., Komon M., Bissett J., Szakacs G., and Kubicek C.P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology, 42:813-828.
 - 15- Druzhinina I.S., and Kubicek C.P. 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? Journal Zhejiang University Science, 6(2):100-112.
 - 16- Ehyae A., and Behbahanzade A.A. 1372. The methods of soil chemical analysis. Soil and Water Research Institute, Technical Bulletin.
 - 17- Elad Y., and Chet I. 1983. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. Phytoparasitica, 11:55-58.
 - 18- Ershad D. 2009. Fungi of Iran. Iranian Ministry of Agriculture, Tehran, Iran.
 - 19- Gams W., and Bissett J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. p. 3-34. In *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor and Francis Ltd. London.
 - 20- Garbeva P., Van Veen J.A., and Van Elsas, J.D. 2004. Microbial diversity in soil: selection of microbial populations by plant and soil type and implications for disease suppressiveness. Annual Review Phytopathology, 42:243-270.
 - 21- Gardes M., and Bruns T.D. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology, 2:113-118.
 - 22- Gherbawy Y., Druzhinina I.S., Shaban G.M., Wuczковский M., Yaser M., El-Naghy M.A., Prillinger H.J., and Kubicek C.P. 2004. *Trichoderma* populations from alkaline agricultural soil in the Nile valley, Egypt, consist of only two species. Mycological Progress, 3:211-218.
 - 23- Hoyos-Carvajal L., Orduz S., and Bissett J. 2009. Genetic and metabolic biodiversity of *Trichoderma* from Colombia and adjacent neotropical regions. Fungal Genetics and Biology, 46:615-631.
 - 24- Isnaini M., Burgess D.R., and Keane P.J. 1998. The use of cultures of *Sclerotinia minor* for selective isolation and enumeration of mycoparasitic isolates of *Trichoderma* from soil and roots. Australasian Plant Pathology, 27:244-250.
 - 25- Johnson L.F. 1959. Methods for Studying Soil Microflora Plant Disease Relationships. Minneapolis, Burgess Publishing Company.
 - 26- Kopchinskiy A., Komon M., Kubicek C.P., and Druzhinina I.S. 2005. Tricho blast: a multilocus database for *Trichoderma* and *Hypocrea* identifications. Mycological Research, 109:658-660.
 - 27- Kraus G.F., Druzhinina I.S., Gams W., Bissett J., Zafari D., Szakacs G., Kopchinskiy A., Prillinger H., Zare R., and Kubicek C.P. 2004. *Trichoderma brevicompactum* sp. nov. Mycologia, 96:1059-1073.
 - 28- Kredics L., Antal Z., Manczinger L., Szekeres A., Kevei F., and Nagy E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Food Technology and Biotechnology, 41:37-42.
 - 29- Kubicek C.P., Bissett J., Druzhinina I.S., Kullnig-Gradinger C., and Szakacs G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South-East Asian isolates. Fungal Genetics and Biology, 38:310-319.
 - 30- Kubicek C.P., and Penttila M.E. 1998. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma*. p. 49-71. In G.E. Harman and C.P. Kubicek (eds.) *Trichoderma* and *Gliocladium*: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor and Francis Ltd. London, UK.
 - 31- Kubicek C.P., Komon-Zelazowska M., and Druzhinina I.S. 2008. Fungal genus *Hypocrea/Trichoderma*: from barcodes to biodiversity. Journal of Zhejiang University-Science B, 9:753-763.
 - 32- Kullnig C., Szakacs G., and Kubicek C.P. 2000. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and the Himalaya. Mycological Research, 104:1117-1125.
 - 33- Leandro L.F.S., Guzman T., Ferguson L.M., Fernandez G.E., and Louws F.J. 2007. Population dynamics of *Trichoderma* in fumigated and compost-amended soil and on strawberry roots. Applied Soil Ecology, 35:237-246.
 - 34- Lopez-Mondejar R., Ros M., and Pascual J.A. 2011. Mycoparasitism-related genes expression of *Trichoderma harzianum* isolates to evaluate their efficacy as biological control agent. Biological Control, 56:59-66.
 - 35- Michel-Aceves A.C., Rebollo-Dominguez O., Lezama-Gutierrez R., Ochoa-Moreno M.E., and Samuels G.J. 2001. Especies de *Trichoderma* en suelos cultivados con mangoafector por Escoba de bruja y su potencial inhibitorio sobre *Fusarium oxysporum* y *F. subglutinans*. Revista Mexicana de Fitopatologia, 19:154-160.
 - 36- Miller S.L. 1957. The mechanism of synthesis of amino acids by electric discharges. Biochimica et Biophysica

- Acta, 23:480-489.
- 37- Migheli Q., Balmas V., Komon-Zelazowska M., Scherm B., Fiori S., Kopchinskiy A.G., Kubicek C.P., and Druzhinina I.S. 2009. Soils of a mediterranean hot spot of biodiversity and endemism (Sardinia, Tyrrhenian Islands) are inhabited by pan-European, invasive species of *Hypocrea/Trichoderma*. *Environmental Microbiology*, 11:35-46.
 - 38- Naeimi S., Okhovat M., Javannikkhah M., Kredics L., and Khosravi V. 2010. Frequency and distribution of *Trichoderma* spp. in the rice (paddy) fields of Mazandaran province, Iran. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 40: 79-91. (in Persian with English abstract).
 - 39- Nazmi Roudsari F., Zafari D., Khodaparast S.A., and Rouhani H. 2007. Introducing some new species of *Trichoderma* for Iran. *Rostaniha*, 8: 67-83. (in Persian with English abstract).
 - 40- Okoth S.A., Roimen H., Mutsotso B., Muya E., Kahindi J., Owino J.O., and Okoth P. 2007b. Land use systems and distribution of *Trichoderma* species in Embu region, Kenya tropical and subtropical agroecosystems. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 7:105-122.
 - 41- RezaeeDanesh U.R., Mohammadi Goltapeh A., and Rouhani H. 2000. Identification of *Trichoderma* species causing green mold in button mushroom farms, and their loss assessment. p. 104. *Proceedings of the 14th Iranian Plant Protection Congress*, vol. II, 5-8 Sep. 2000. Isfahan, Iran.
 - 42- Rifai M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116:1-116.
 - 43- Rouhani H., and Safari M. 1998. Introducing species of *Trichoderma* Pers. from Iran. p. 301. *Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress*, vol. II, 23-27 Aug. 1998. Karaj, Iran.
 - 44- White T.J., Bruns T., Lee S., and Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a guide to methods and applications*, 18:315-322.
 - 45- Wuczkowski M., Druzhinina I.S., Gherbawy Y., Klug B., Prillinger H., and Kubicek C.P. 2003. Species pattern and genetic diversity of *Trichoderma* in a mid-European, primeval floodplain-forest. *Microbiological Research*, 158:125-133.
 - 46- Zafari D., Ershad D., Zare R., and Alizadeh A. 2002. A contribution to the identification of *Trichoderma* species in Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 38: 21-45. (in Persian with English abstract).
 - 47- Zafari D., Ershad D., Zare R., and Alizadeh A. 2004. Three new species of *Trichoderma* for the mycoflora of Iran. *Rostaniha*, 5: 159-170. (in Persian with English abstract).
 - 48- Zhang C., Druzhinina I.S., Kubicek C.P., and Xu T. 2005. *Trichoderma* biodiversity in China: evidence for a North to South distribution of species in East Asia. *FEMS Microbiology Letters*, 251:251-257.