

## شناسایی گونه‌های تریکودرمای اندوفیت درختان بلوط در جنگل‌های ارسباران با استفاده از معیارهای ریخت‌شناختی و مولکولی

سعید قاسمی اسفهلان<sup>۱</sup>، مهدی ارزنلو<sup>۲\*</sup> و اسداله بابای اهری<sup>۲</sup>

۱-دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

۲- به ترتیب استادن بیماری شناسی و قارچ شناسی گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.

\*مسئول مکاتبه: [arzanlou@tabrizu.ac.ir](mailto:arzanlou@tabrizu.ac.ir)

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۲/۱۷

تاریخ دریافت: ۹۵/۳/۴

### چکیده

گونه‌های جنس *Trichoderma* از پراکنش جهانی برخوردار بوده و مایکوبیوتای غالب خاک‌های مناطق مختلف می‌باشند. گونه‌های تریکودرما علیرغم این‌که از پتانسیل ساپروفیتی قوی برخوردار می‌باشند، دارای فاز اپیفیتی قابل توجهی بوده و از پتانسیل نفوذ به بافت‌های داخلی میزبان گیاهی بدون ایجاد خسارت و صدمه به میزبان برخوردار هستند. در سال‌های اخیر، توجه ویژه‌ای به شناسایی و برهمکنش گونه‌های تریکودرمای اندوفیت با میزبان‌های گیاهی معطوف گردیده است، با این وجود، اطلاعات چندانی در مورد تنوع زیستی گونه‌های تریکودرمای اندوفیت در ایران وجود ندارد. تحقیق حاضر با هدف شناسایی گونه‌های تریکودرمای اندوفیت درختان بلوط در جنگل‌های ارسباران انجام گردید. برای این منظور در تابستان سال ۱۳۹۳ از قسمت‌های تنه و سرشاخه‌ی درختان بلوط سالم و درختان دارای علائم زوال در مناطق حاتم بیگ (مشگین شهر) و کلیبر نمونه‌برداری شد. در مجموع، ۲۳ جدایه‌ی تریکودرما از مناطق نمونه‌برداری شده جداسازی و خالص‌سازی گردید. هویت جدایه‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و داده‌های توالی ناحیه ITS-rDNA *Trichoderma atroviride*، *T. citrinoviride*، *T. harzianum* و *T. polysporum* تعیین گردید. در تبارنمای ترسیم شده براساس توالی ناحیه ITS-rDNA، جدایه‌های مربوط به هر یک از گونه‌های شناسایی شده به همراه توالی نمونه‌ی تیپ هریک از گونه‌ها، با اعتبار سنجی بالا گروه‌بندی شدند. کلیه‌ی گونه‌ها برای اولین بار از جنگل‌های ارسباران گزارش می‌شوند و بلوط سیاه (*Quercus macranthera*) به عنوان میزبان جدید برای تمامی گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق معرفی می‌شود. گزارش این گونه‌ها از روی بلوط سیاه برای دنیا جدید می‌باشد. با شناسایی این گونه‌ها امکان ارزیابی کارایی این گونه‌ها در کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی و تقویت رشد گیاهان فراهم خواهد شد.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، بلوط سیاه، تریکودرما، ITS-rDNA.

### مقدمه

کنند که از نظر القای مقاومت به انگل‌های قارچی در گیاهان، تحریک رشد گیاهی و تاثیر آنتاگونیستی بر قارچ‌های بیمارگر گیاهان اهمیت دارند (کلین و اورلیگ ۱۹۹۸، کاور و ساموئلز ۲۰۰۳). به دلیل این ویژگی‌ها، جدایه‌های تریکودرما در تولید آنزیم‌ها و سایر متابولیت‌ها و همچنین کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (بیلی و لومسدون ۱۹۹۸، کوبیک و پنتیلا ۱۹۹۸، سیواسی‌تام‌پارام و گیسالبرتی ۱۹۹۸، لوسیا و همکاران ۲۰۰۹). با این وجود در سال‌های اخیر، توجه

گونه‌های جنس *Trichoderma* Pers. از پراکنش جهانی برخوردار بوده و جزو مایکوبیوتای غالب خاک‌های مناطق مختلف می‌باشند. این پدیده ممکن است به دلیل تنوع در ظرفیت متابولیکی و ماهیت رقابتی آن‌ها باشد (راسمن ۱۹۹۶، ساموئلز ۱۹۹۶، بیلی و ملنیک ۲۰۱۳). گونه‌های تریکودرما دامنه‌ی وسیعی از متابولیت‌های ثانویه از قبیل آنتی‌بیوتیک و تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهان و همچنین آنزیم‌های متنوع را تولید می-

قابل توجهی بوده و از پتانسیل نفوذ به بافت‌های داخلی میزبان گیاهی بدون ایجاد خسارت و صدمه به میزبان برخوردار هستند (بیلی و ملنیک ۲۰۱۳). در این راستا گونه‌ها و جدایه‌های اندوفیت متعددی از بافت‌های گیاهان سالم توصیف گردیده است که از این بین می‌توان به گونه *T. hamatum* (سامولز و اسمعیل ۲۰۰۹) و *T. martiale* (هاندا و همکاران ۲۰۰۸) از روی درخت کاکائو (*Theobroma cacao*) در برزیل؛ گونه *T. gamsii* از روی سرخس (*Pteridium aquilinum* L.) Moench و کرچک (*Ricinus Communis* L.) (جکلیش و همکاران ۲۰۰۶)؛ گونه *T. citrinoviride* از روی بلوط چوب پنبه (*Quercus suber* L.) در ایتالیا (لوسیا و همکاران ۲۰۰۹)؛ گونه *T. viride* از روی بلوط قرمز اروپایی (*Quercus robur* L.) در ایتالیا (راگزی و همکاران ۲۰۰۳) و گونه *T. harzianum* از روی ممرز (*Carpinus caroliniana* Walter) در آمریکا (بیلز و پلیشووک ۱۹۹۱) اشاره کرد. در ایران نیز گونه‌های *T. asperellum* از ریشه پیازچه (*Allium schoenoprasum*) L.، بادمجان (*Solanum melongena* L.) و پنجه مرغی (*Cynodon dactylon* L.)، *T. atroviride* از ریشه و ساقه توتون (*Nicotiana tabacum* L.) و *T. arundinaceum* از ریشه چغندر قند (*Beta vulgaris* L.)، انگور (*Vitis vinifera* L.) و نعناع (*Mentha arvensis* L.) از استان کردستان توسط روغنیان و همکاران گزارش شده‌اند (روغنیان و همکاران ۲۰۱۳). تحقیق حاضر با هدف شناسایی گونه‌های تریکودرمای اندوفیت درختان بلوط در جنگل‌های ارسباران با استفاده از داده‌های ریخت‌شناختی و مولکولی صورت گرفت.

### مواد و روش‌ها

#### تهیه جدایه‌های قارچی

جهت نمونه‌برداری، بازدیدهایی از جنگل‌های حاتم بیگ (شهرستان مشکین شهر) و شهرستان کلپیر طی مرداد ماه و شهریور ماه سال ۱۳۹۳ به عمل آمد. نمونه‌برداری از قسمت‌های تنه و سرشاخه درختان بلوط سالم و درختان دارای علایم زوال به صورت تصادفی انجام شد. نمونه‌ها با ذکر نام محل و تاریخ جمع‌آوری

ویژه‌ای به طبیعت اندوفیتی گونه‌های این جنس و امکان استفاده از آنها در حفاظت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا و تقویت رشد آنها معطوف گردیده است. قارچ‌های اندوفیت در داخل بافت‌های گیاهی سالم به صورت ریشه‌های غیر فعال و بدون ایجاد خسارت روی میزبان زندگی می‌کنند. حضور قارچ‌های اندوفیت در گیاه مزایای زیادی برای گیاه میزبان به همراه دارد که از جمله می‌توان ایجاد مقاومت به تنش‌های محیطی شامل تنش کمبود آب، سرما، تغییرات pH و یون‌های سمی در خاک را نام برد (مالینکوسکی و بلسکی ۲۰۰۰، میرلوحی و همکاران ۲۰۰۴، دهقانپور و همکاران ۲۰۰۶، پارسائیان و همکاران ۲۰۰۷). همچنین اندوفیت‌ها از طریق تولید آلکالوئید باعث ایجاد مقاومت گیاه به تنش‌های زیستی شامل بیماری‌های ویروسی، باکتریایی و حشرات می‌گردند (سبزیلیان و همکاران ۲۰۰۴). طبق نظر شولز و بوئل (۲۰۰۵) میزبان ممکن است از طریق القای متابولیت‌های دفاعی، تولید فیتوهورمون‌ها، تامین مواد غذایی از ریزوسفر و افزایش فعالیت‌های متابولیکی در برابر عوامل بیماری‌زا، از تعامل با اندوفیت‌ها سود ببرد. اندوفیت‌ها برای گیاهان فایده‌هایی نیز دارند، از جمله اینکه مایکوتوکسین‌های تولید شده توسط اندوفیت‌ها در بافت‌های گیاهی، ممکن است باعث افزایش مقاومت گیاهان در برابر سایر بیمارگرها شوند (بولتمن و مورفی ۲۰۰۰). اندوفیت‌ها ممکن است آنتی‌اکسیدان‌هایی را در گیاهان تولید کنند و یا گیاهان را تحریک به تولید آنتی‌اکسیدان کنند که آنها را در برابر تنش‌های اکسیداتیوی که در ارتباط با بیماری‌های گیاهی، خشکسالی و فلزات سنگین محافظت کنند (وایت و تورس ۲۰۱۰). در برخی موارد گیاهان مرتبط با اندوفیت‌ها، در مقابل بیمارگرهای گیاهی به ویژه قارچ‌ها و نماتدها مقاومت بیشتری نشان داده‌اند (زابالگوگیزکوا ۲۰۰۸). اندوفیت‌ها همچنین می‌توانند با محافظت از درختان در برابر عوامل خسارت‌زای زنده (سایکونن و همکاران ۱۹۹۸، آرنوالد و همکاران ۲۰۰۳) و تنش‌ها (تن و زو ۲۰۰۱) باعث بهبود و شادابی درختان شوند.

گونه‌های تریکودرما علیرغم این‌که از قدرت ساپروفیتی قوی برخوردار می‌باشند، دارای فاز اپیفیتیکی

با استفاده از روش مولر و همکاران (۱۹۹۲) استخراج گردید. پس از اتمام عملیات استخراج، کمیت و کیفیت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

### تکثیر ناحیه ITS-rDNA و آنالیز فیلوژنتیک

در مورد تعدادی از جدایه‌های قارچی، ناحیه ITS-rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز تکثیر گردید. جهت تکثیر ناحیه ITS-rDNA آغازگر رفت ('ITS1=5'TCCGTAGTTGGACCTGCGG3') و برگشت ('ITS4=5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') در جدایه‌ها مورد استفاده واقع شد (وایت و همکاران ۱۹۹۰). این آغازگرها بخشی از ناحیه ۳ زیر واحد کوچک DNA ریپوزومی (SSU-rDNA)، ناحیه ITS1 و ۵/AS، ITS2 و بخشی از ناحیه ۵ زیر واحد بزرگ DNA ریپوزومی (LSU-rDNA) را تکثیر می‌کنند. این جفت آغازگر قطعه‌ای به طول ۵۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز را تکثیر می‌نماید. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش (1X PCR buffer)، ۱/۵ میلی‌مول کلرید منیزیم، ۰/۲ میلی‌مول از هر dNTP، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۵ واحد آنزیم پلی‌مرز (Taq DNA polymerase) و ۱۰ الی ۱۵ نانوگرم از DNA الگو را شامل می‌شد. حجم واکنش با استفاده از آب دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (GenAmp PCR System 9700) و با اعمال حرارت  $95^{\circ}\text{C}$  به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه و به دنبال آن  $36^{\circ}\text{C}$  چرخه شامل  $94^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه،  $56^{\circ}\text{C}$  به مدت ۳۰ ثانیه و  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه  $72^{\circ}\text{C}$  به مدت ۷ دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. جهت جلوگیری از تجزیه و تخریب محصول PCR دمای دستگاه پس از انجام واکنش روی  $10^{\circ}\text{C}$  برای مدت نامحدود، تنظیم گردید. محصولات واکنش PCR از ژل آگاروز یک درصد حاوی اتیدیم بروماید در بافر  $1\times$  TAE (1mM EDTA، 40 mM Tris base، 20 mM acetic acid، pH=8) عبور داده شد و عکس برداری با استفاده از دستگاه تصویر-

در پاکت‌های جداگانه قرار داده شده و به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی اندوفیت‌ها مطابق روش‌های رایج جداسازی اندوفیت‌ها (هلاندر و همکاران ۲۰۰۷، بلومنستین ۲۰۱۰)، انجام شد. به این صورت که ابتدا با استفاده از اسکالپل استریل قطعاتی به اندازه ۳-۵ سانتی متر از بافت‌های چوب و پوست جداسازی شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۵ درصد غوطه‌ور شدند، بعد از آن بلافاصله در هیپوکلریت سدیم چهار درصد (تجاری) به مدت پنج دقیقه قرار داده شد و بعد از این مرحله، نمونه‌ها به مدت ۱۵ ثانیه با استفاده از اتانول ۷۵ درصد ضد عفونی شدند. سپس نمونه‌ها با استفاده از آب مقطر استریل سه بار شست‌شو داده شدند و به مدت پنج دقیقه با استفاده از کاغذ صافی استریل خشک آب‌گیری شدند. بعداً قطعات در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت عصاره‌ی مالت آگار دو درصد (MEA) ساخت کارخانه مرک، آلمان) کشت داده شدند. برای ممانعت از رشد باکتری‌ها به میزان صد میلی‌گرم بر لیتر کلرامفنیکل به محیط کشت اضافه شد. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای  $25^{\circ}\text{C}$  نگهداری و جدایه‌های قارچی رشد کرده پس از ثبت ویژگی‌های ظاهری خالص‌سازی شدند. خالص‌سازی قارچ‌ها به روش تک اسپور کردن انجام گردید. ویژگی‌های ریخت‌شناختی شامل نحوه انشعاب کنیدیوفورها، شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های فیالیدها، کنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها و ریشه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت. برای این منظور از محیط عصاره‌ی مالت آگار دو درصد و قرار گرفتن در شرایط دو روز تاریکی و چهار روز در تناوب تاریکی/روشنایی (۱۲:۱۲ ساعت) و دمای  $21^{\circ}\text{C}$  استفاده شد. نمونه‌های میکروسکوپی با استفاده از آب مقطر تهیه و با میکروسکوپ المپوس BX51 بررسی شدند. عکس برداری از ساختارهای قارچی به وسیله دوربین المپوس DP72 انجام گرفت.

### مطالعات فیلوژنتیکی

#### استخراج DNA

برای این منظور، جدایه‌ها روی محیط کشت عصاره‌ی مالت آگار دو درصد (MEA) به مدت ۱۰ روز در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  و در تاریکی رشد داده شدند و DNA ژنومی

بود. کلیه ی ژن‌ها فراوانی *dirichlet base* داشتند. گونه *Hyocrea farinosa* (GenBank accession NR-119700) نیز به عنوان آرایه خارجی به کار گرفته شد. تجزیه و تحلیل بیژین، منتهی به ۱۴۰۲ تبارنما گردید. بعد از حذف ۲۵ درصد از تبارنماهای جمع‌آوری شده برای مرحله *burn-in* تبارنمای اجمالی و توزیع احتمال پسین خوشه‌ها از ۱۰۵۲ تبارنمای باقی مانده محاسبه گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، جدایه‌های مورد مطالعه با اعتبارسنجی بالایی به همراه سایر جدایه‌های اخذ شده از بانک ژن (شکل ۱) گروه‌بندی شدند.

### توصیف گونه‌ها

*Trichodema atroviride* P. Karst. 1892.

پرگنه روی محیط کشت MEA دو درصد، در دمای ۲۱°C و در شرایط دو روز در تاریکی و چهار روز در تناوب تاریکی/روشنایی (۱۲:۱۲ ساعت) به رنگ سفید تا سبز تیره درآمد. پرگنه سریع‌الرشد و قطر آن پس از شش روز به ۶۵ میلی‌متر رسید. پرگنه دارای دوایر متحدالمرکز متشکل از محدوده‌ای با اسپورزایی کم و پراکنده به شکل جوش‌های حاصل از تجمعات کنیدیوفورهای حامل کنیدیوم است که توسط محدوده‌ای با اسپورزایی بالا احاطه شده است، تجمعات متراکم جوش‌ها ظاهر سفید به این محدوده می‌دهند که با افزایش سن پرگنه این محدوده به رنگ سبز تیره تغییر می‌کند. رنگ پرگنه از پشت تشنگ پتری بی‌رنگ و فاقد رنگدانه در محیط کشت بوده و دارای ریشه‌های سطحی، هوایی، بی‌رنگ و به قطر ۲-۵ میکرومتر هستند. کنیدیوفورها معمولاً باریک و خمیده، انشعابات اولیه کنیدیوفورها معمولاً به صورت جفت یا دسته‌های سه تایی قرار می‌گیرند. فیالیدها منفرد یا در دستجات دو تا چهار تایی، آمپولی شکل خمیده و در اندازه‌های ۲-۳ × ۱۰-۶ میکرومتر تشکیل می‌شوند. کنیدیوم‌ها سبز تیره، دارای سطح صاف، گرد تا تخم مرغی و در اندازه‌های سه تا چهار میکرومتر، و کلامیدوسپورها نیز بصورت میانی تشکیل می‌شوند (شکل ۲). ویژگی‌های ریخت شناختی این گونه با توصیف بی‌ست (۱۹۹۲) مطابقت دارد.

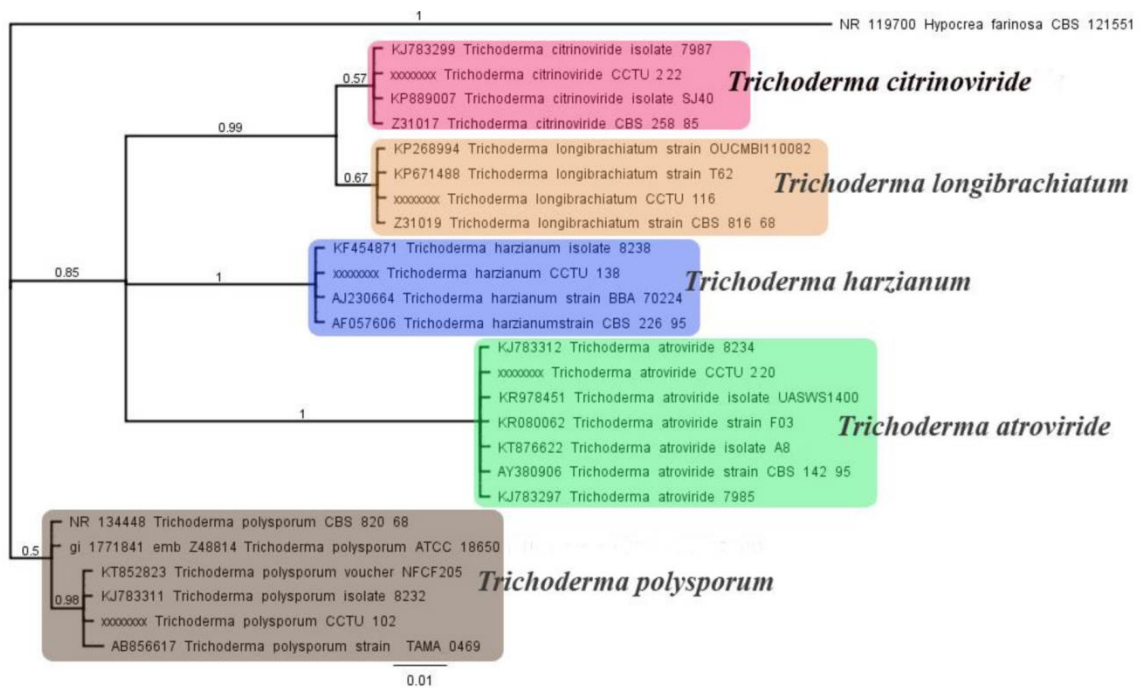
برداری از ژل (Gel Documentation) انجام گردید. واکنش ترادف‌یابی نوکلئوتیدی به‌وسیله کیت تجارتي بیگ‌دای BigDye® Terminator V301 Cycle Sequencing kit ساخت کارخانه کالیفرنیا آمریکا و مطابق دستورالعمل کارخانه صورت‌گرفت. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از دستگاه 3700® ABI persim انجام شد. توالی نوکلئوتیدی با نرم‌افزار (Lasergene package, SeqMan DNASTAR, Madison, USA) بررسی و ویرایش شد و با استفاده از نرم‌افزار برخط بلاست (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) با توالی‌های موجود در بانک ژن مقایسه و توالی‌های با درصد مشابهت بالا از بانک ژن (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) دریافت گردیدند. رج-بندی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA6 انجام شد (تامورا و همکاران ۲۰۱۳). ترسیم تبارنما با روش بیژین (Bayesian) با استفاده از نرم‌افزار MrBayes v. 3.2.2 انجام گردید (رونکوئیست و هلسنیک ۲۰۰۳). آزمون اعتبارسنجی به روش احتمال پسین (Posterior Probabilities) انجام شد و تعیین مدل‌ها بر اساس نتایج نرم‌افزار مستر مدل تست (MrModelTest v. 2.3) انجام شد (نیلاندر ۲۰۰۴).

### نتایج و بحث

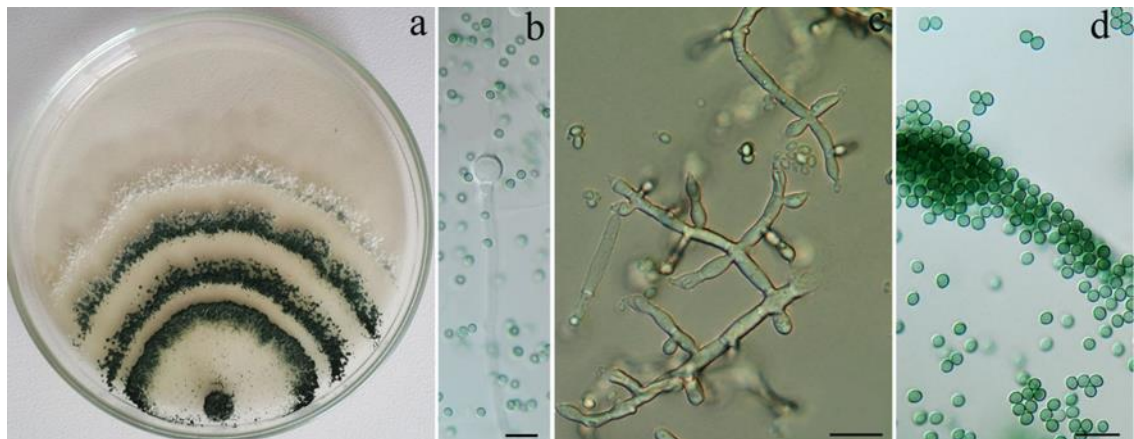
در این تحقیق، تعداد ۲۳ جدایه‌ی تریکودرما از بافت‌های تنه و سرشاخه‌ی درختان بلوط سالم و درختان دارای علایم زوال در جنگل‌های حاتم‌بیگ و مشکین‌شهر جداسازی گردید. اطلاعات مربوط به جدایه‌های قارچی در جدول ۱ ذکر شده‌اند.

### فیلوژنی

تبارنما با استفاده از نرم‌افزار بیژین بر مبنای ناحیه‌ی ITS-rDNA برای جدایه‌های مورد مطالعه در این تحقیق و جدایه‌های موجود در بانک ژن ترسیم شد. فایل رج‌بندی شده نهایی شامل ۲۵ آرایه‌ی داخلی، ۴۷۹ کاراکتر و ۱۰۶ الگوی مکانی منحصربه‌فرد بود. بر اساس نتایج نرم‌افزار مدل تست، بهترین مدل جایگزینی F81+G



شکل ۱- تبارنمای اجمالی برآیند ۱۰۵۲ تبارنمای حاصل از استنتاج بیژین رج‌بندی توالی ناحیه ITS با استفاده از نرم افزار MrBayes v. 3.2.2 برای گونه *Trichoderma* مقیاس، ۰/۰۱ تغییر مورد انتظار در هر مکان را نشان می‌دهد. گونه *Hypocrea farinosa* به عنوان آرایه خارجی در نظر گرفته شده است. توالی‌های بدست آمده از این پژوهش با پیشوند CCTU نشان داده شده‌اند.



شکل ۲- *Trichoderma atroviride*: a: پرگنه شش روزه روی محیط کشت MEA. b: کلامیدوسپور. c: کنیدیوفورها و فیالیدها. d: کنیدیوم‌ها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

جدول ۱- فهرست جدایه‌های تریکودرمای بازیافت شده از درختان بلوط کلیبر و مشگین شهر.

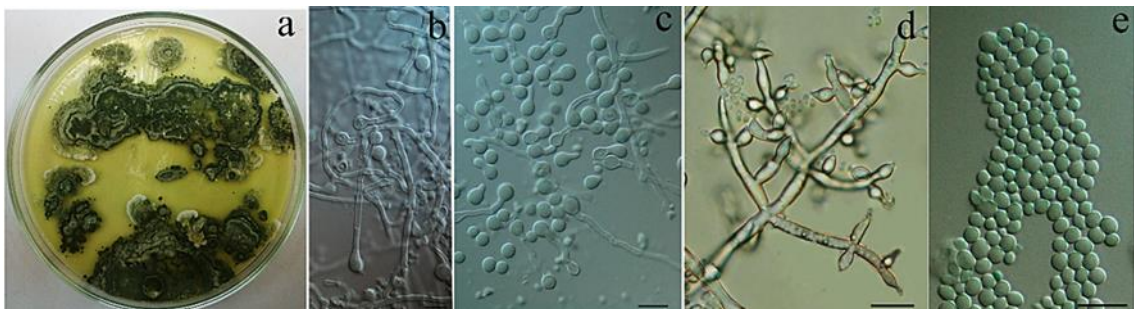
بافت	گونه فارچی	تاریخ جمع آوری	منطقه نمونه برداری	جدایه‌ها
پوست-بیمار	<i>Trichoderma atroviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MOp-4
پوست-سالم	<i>Trichoderma atroviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MLp1-4
پوست-بیمار	<i>Trichoderma atroviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MKp1-4
سرشاخه و شاخه-سالم	<i>Trichoderma atroviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MRT4-4= CCTU220
سرشاخه و شاخه-بیمار	<i>Trichoderma atroviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MKt5-4
پوست-بیمار	<i>Trichoderma atroviride</i>	۹۳/۶/۴	کلیبر	BYp2-4
پوست-بیمار	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MEp2-4
سرشاخه و شاخه-بیمار	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MOt3-4
سرشاخه و شاخه-سالم	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MUt1-4
سرشاخه و شاخه-بیمار	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MJt1-4= CCTU222
سرشاخه و شاخه-سالم	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MAt-4
سرشاخه و شاخه-بیمار	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MMt2-4
پوست-سالم	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MNp-4
پوست-سالم	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	۹۳/۶/۴	کلیبر	BCp-4
پوست-سالم	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	۹۳/۶/۴	کلیبر	BPP3-4
پوست-سالم	<i>Trichoderma citrinoviride</i>	۹۳/۶/۴	کلیبر	BEp-4
سرشاخه و شاخه-بیمار	<i>Trichoderma harzianum</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MMt-4
پوست-سالم	<i>Trichoderma harzianum</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MNap1-4= CCTU138
سرشاخه و شاخه-سالم	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	۹۳/۶/۴	کلیبر	BZt-4= CCTU116
پوست-بیمار	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MPP3-4
پوست-سالم	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MIP2-4
پوست-بیمار	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	۹۳/۴/۳	مشگین شهر	MJp1-4
پوست-سالم	<i>Trichoderma polysporum</i>	۹۳/۶/۴	کلیبر	BSp1-4= CCTU102

سطحی، هوایی، بی‌رنگ و به قطر ۳-۴ میکرومتر است. کنیدیوفورها دارای محور اصلی بلند و دارای انشعابات بر روی خود هستند. انشعابات اولیه کنیدیوفورها معمولاً به صورت جفت و به ندرت دارای انشعابات ثانویه است. فیالیدها منفرد یا در دستجات دو تا چهار تایی، آمپولی شکل یا آمپولی شکل خمیده و در اندازه‌های ۲-۳ × ۱۱-۶ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها سبز روشن، دارای سطح صاف، کروی و در اندازه‌های ۲-۱٫۵ × ۳-۴ میکرومتر و کلامیدوسپورها نیز بصورت میانی تشکیل می‌شوند (شکل ۳).

این گونه قبلاً از ایران گزارش شده است (ارشاد ۲۰۰۹) و گزارش این گونه از روی بلوط سیاه (*Quercus macranthera* Fish and Mey.) برای دنیا جدید می‌باشد.

#### *Trichoderma citrinoviride* Bissett.

پرگنه روی محیط کشت MEA دو درصد، در دمای ۲۱°C و در شرایط دو روز تاریکی و چهار روز در تناوب تاریکی/روشنایی (۱۲:۱۲ ساعت) به رنگ سبز تیره درآمد. پرگنه سریع‌الرشد و قطر آن پس از شش روز به ۶۰ میلی‌متر رسید. پرگنه فاقد دواير متحد المركز، رنگ آن از پشت تشنگ پتری سبز مایل به زرد و دارای رنگدانه در محیط کشت بوده و دارای ریشه‌های



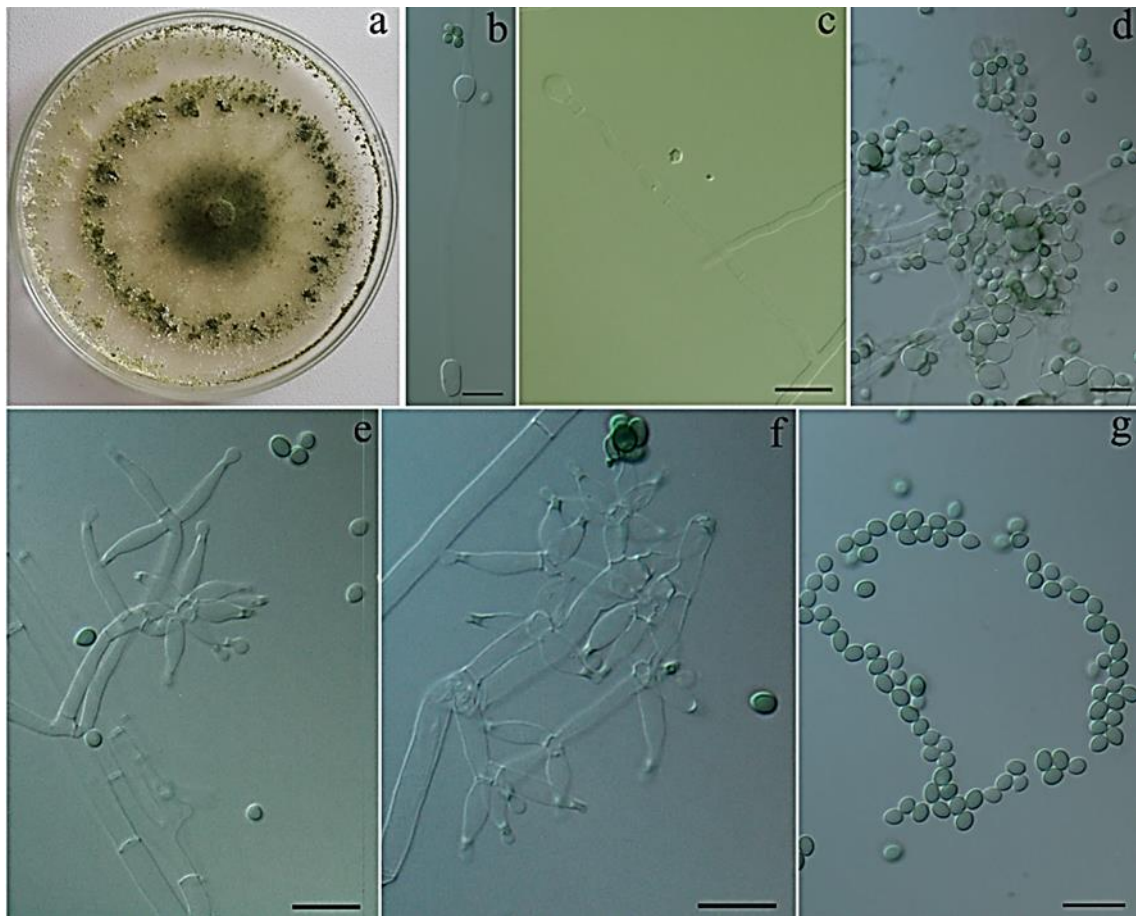
شکل ۳- *Trichoderma citrinoviride*. a: پرگنه ده روزه روی محیط کشت MEA. b-c: کلامیدوسپورها. d: کنیدیوفورها و فیالیدها. e: کنیدیوم‌ها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

رسید. رنگ پرگنه از قسمت زیرین تشنگ پتری بی‌رنگ و ریشه‌ها به صورت سطحی و هوایی تشکیل شدند و به قطر ۳-۴ میکرومتر رسیدند. الگوی انشعابات کنیدیوفورها هرمی شکل بوند (انشعابات کوتاه در قسمت انتهایی و انشعابات طویل در قسمت‌های پایینی واقع شده بودند) انشعابات با زاویه ۹۰° درجه از محور اصلی ایجاد می‌شوند. فیالیدها آمپولی شکل تا کوزه‌ای و در دستجات ۳ تا ۶ تایی در کنار هم قرار گرفته و اندازه‌هایی معادل ۲-۴ × ۱۲-۸ میکرومتر داشتند. کنیدیوم‌ها کوچک، به اشکال گرد تا تخم مرغی، دارای دیواره صاف، به رنگ سبز روشن و در اندازه‌های ۲-۳ × ۳-۴ میکرومتر و کلامیدوسپورها بصورت انتهایی و میانی تشکیل می‌شوند (شکل ۴).

گونه *T. citrinoviride* برای اولین بار در دنیا در سال ۱۹۸۴ توسط بی‌ست (۱۹۸۴) معرفی شد. این گونه از روی میزبان‌هایی همچون نارون (*Ulmus americana* L.)، بلوط (*Quercus acutissima* Carruth)، توس نقره‌ای (*Betula pendula* Roth.) و کدو (*Cucurbita pepo* L.) در دنیا گزارش شده است و گزارش آن از روی بلوط سیاه برای دنیا جدید می‌باشد (فار و راسمن ۲۰۱۷). این گونه قبلاً از ایران گزارش شده است (ارشاد ۲۰۰۹).

#### *Trichoderma harzianum* Rifai. 1969.

پرگنه روی محیط کشت MEA دو درصد، در دمای ۲۱°C و در شرایط دو روز تاریکی و چهار روز در تناوب تاریکی/روشنایی (۱۲:۱۲ ساعت) به رنگ سبز مایل به زرد، سریع‌الرشد، به صورت دواير متحدالمركز و قطر آن پس از شش روز به ۹۰ میلی‌متر



شکل ۴- *Trichoderma harzianum*: a: پرگنه شش روزه روی محیط کشت MEA. b-d: کلایدوسپورها. e-f: کنیدیوفورها و فیالیدها. g: کنیدیومها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

#### *Trichoderma longibrachiatum* Rifai. 1969.

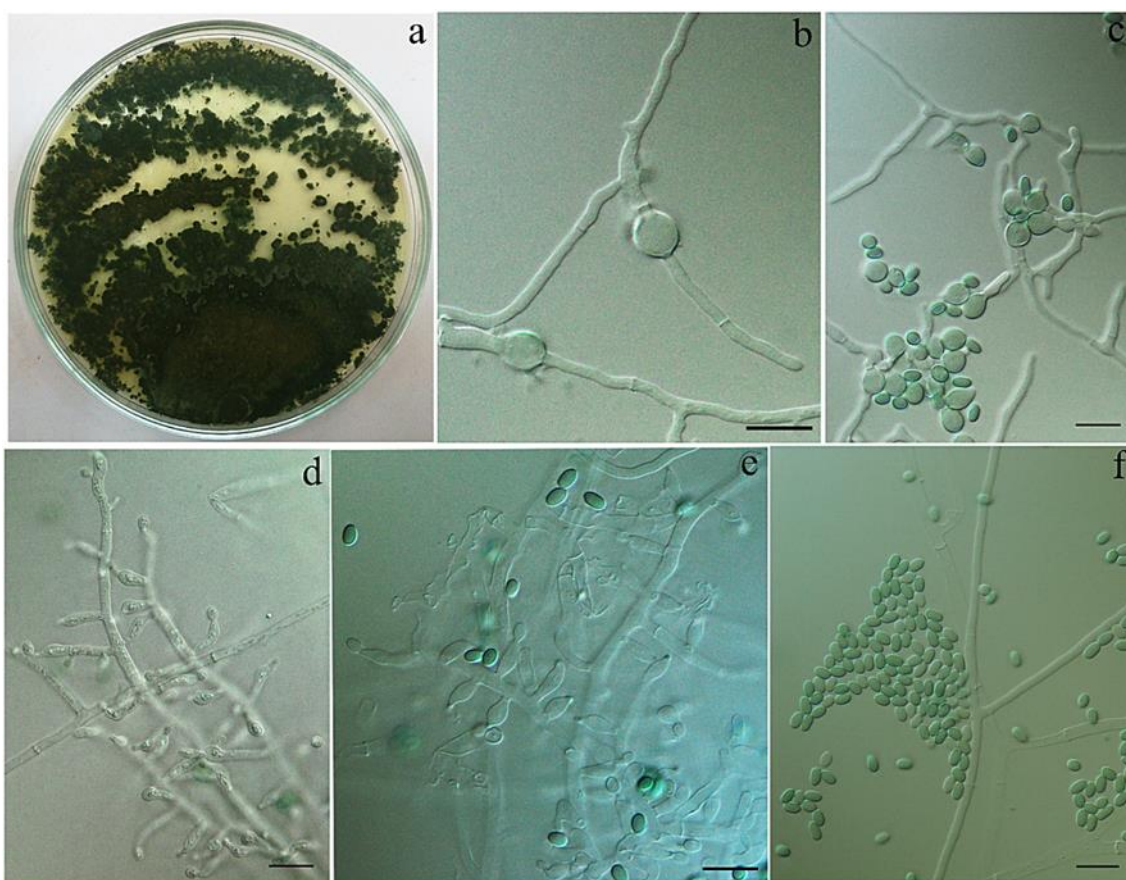
پرگنه روی محیط کشت MEA دو درصد، در دمای ۲۱° و در شرایط دو روز تاریکی و چهار روز در تناوب تاریکی/روشنایی (۱۲:۱۲ ساعت) به رنگ سبز تیره درآمد. پرگنه سریع الرشد و قطر آن پس از شش روز به ۶۰ میلی متر رسید. پرگنه دارای دواير متحدالمركز و سطح زیرین آن سبز مایل به زرد و دارای ریشه‌های سطحی، هوایی، بی‌رنگ و به قطر ۲-۳ میکرومتر بودند. محور اصلی کنیدیوفورها بلند و دارای انشعابات کم تراکم و نامنظم، انشعابات اولیه غالباً کوتاه و نامنظم بوده و به ندرت دارای انشعابات ثانویه هستند. فیالیدها بیشتر به صورت منفرد و نامنظم دیده می‌شوند و ندرتاً به صورت دسته‌های چندتایی متمرکز ظاهر می‌شوند که ویژگی اخیر به ویژه در نوک کنیدیوفورها مشهودتر هستند. فیالیدها آمپولی شکل یا استوانه‌ای و کشیده و در

این گونه برای اولین بار توسط ریفایی معرفی شد (ریفایی ۱۹۶۹). این گونه همه جازی می‌باشند و از خاک، بافت‌های قارچی، بافت‌های گیاهان، چوب و حشرات جداسازی شده‌اند. میزبان‌های مختلفی همچون کاج سیاه (*Pinus nigra* L.)، اکالیپتوس (*Eucalyptus nitens* Deane and Maiden)، بلوط سفید (*Quercus petraea* Matt.)، انگور (*Vitis vinifera* L.)، سورگوم (*Sorghum vulgare* L.) و گوجه فرنگی (*Lycopersicon esculentum* L.) برای *T. harzianum* در دنیا معرفی شده است (فار و راسمن ۲۰۱۷). این گونه قبلاً از ایران گزارش شده است (ارشاد ۲۰۰۹) و گزارش آن از روی بلوط سیاه برای دنیا جدید می‌باشد (فار و راسمن ۲۰۱۷).



اندازه‌های  $2-3 \times 7-8$  میکرومتر دیده می‌شوند. کنیدیوم‌ها سبز رنگ دارای سطح صاف، بیضوی و در اندازه‌های  $2-3 \times 3-5$  میکرومتر می‌باشند. کلامیدوسپور نیز بصورت میانی تشکیل می‌شوند (شکل ۵). این گونه برای اولین بار توسط ریفایی (۱۹۶۹) معرفی شد. میزبان‌هایی همچون اکالیپتوس (*Eucalyptus*، گیاه چای (*Camellia sinensis* L.)، انگور فرنگی (*Ribes nigrum* Cassis)، گندم (*Triticum aestivum* L.) و کاج (*Pinus sylvestris* L.) برای این گونه در دنیا معرفی شده است و گزارش آن از روی بلوط سیاه برای دنیا جدید می‌باشد (فار و راسمن ۲۰۱۷). این گونه قبلا از ایران گزارش شده است (ارشاد ۲۰۰۹).

شکل ۵- *Trichoderma longibrachiatum*: a: پرگنه ده روزه روی محیط کشت MEA. b-c: کلامیدوسپورها. d-e: کنیدیوفورها و فیالیدها. f: کنیدیوم‌ها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

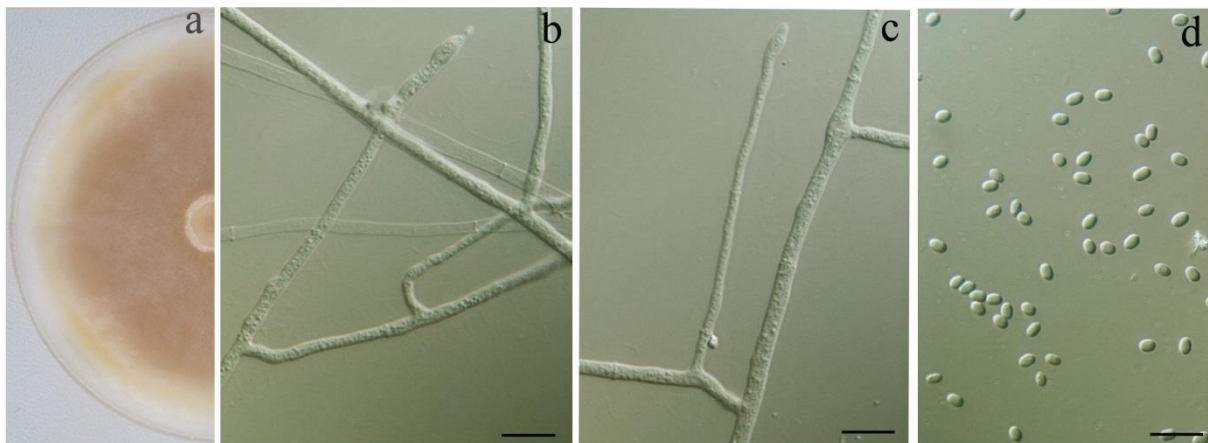


شکل ۵- *Trichoderma longibrachiatum*: a: پرگنه ده روزه روی محیط کشت MEA. b-c: کلامیدوسپورها. d-e: کنیدیوفورها و فیالیدها. f: کنیدیوم‌ها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

کشت و با ریشه‌های سطحی، هوایی، بی‌رنگ و به قطر ۲-۳ میکرومتر هستند. کنیدیوفورها دارای محور اصلی بلند و فاقد انشعابات بر روی خود می‌باشند. فیالیدها منفرد یا به صورت دسته‌ای، آمپولی شکل یا آمپولی شکل خمیده و در اندازه‌های  $2-3 \times 6-10$  میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها سبز روشن، دارای سطح صاف، بیضوی و در اندازه‌های  $2-3 \times 1/5-2$  میکرومتر و کلامیدوسپورها به صورت انتهایی یا میانی تشکیل می‌شوند (شکل ۶).

#### *Trichoderma polysporum* (Link) Rifai. 1969.

پرگنه روی محیط کشت MEA دو درصد، در دمای  $21^{\circ}\text{C}$  در شرایط دو روز تاریکی و چهار روز در تناوب تاریکی/روشنایی (۱۲:۱۲ ساعت) به رنگ سفید با گذشت زمان مایل به قهوه‌ای کم رنگ، سریع‌الرشد و قطر آن پس از شش روز به ۶۵ میلی‌متر رسید. پرگنه فاقد دواير متحد‌المركز، رنگ آن از پشت تشتك پتری سفید مایل به قهوه‌ای کم رنگ و دارای رنگدانه در محیط



شکل ۶- *Trichoderma polysporum*: a: پرگنه ده روزه روی محیط کشت MEA. b-c: کنیدیوفورها و فیالیدها. d: کنیدیوم‌ها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

این گونه قبلا از بلوط قرمز اروپایی (*Quercus robur* L.)، نراد نقره‌ای (*Abies alba* Mill.)، توس نقره‌ای (*Betula pendula* Roth.)، کاج (*Picea abies* L.) گندم (*Triticum aestivum* L.) و باقلا (*Vicia faba* L.) در دنیا (فار و راسمن ۲۰۱۷) معرفی شده است. این گونه قبلا از ایران گزارش شده (ارشاد ۲۰۰۹) و گزارش آن از بلوط سیاه برای دنیا جدید می‌باشد.

**بحث**

در تحقیق حاضر، پنج گونه تریکودرما از درختان بلوط جنگل‌های ارسباران جداسازی گردید. شناسایی این گونه‌ها بر اساس ترکیب داده‌های ریخت‌شناختی با داده‌های توالی ناحیه ITS امکان پذیر گردید. شناسایی گونه‌های تریکودرما تنها با اتکا به داده‌های ریخت‌شناختی مشکل می‌باشد. ریفایی (۱۹۶۹) و بی‌ست (۱۹۹۱) خصوصیات ریخت‌شناختی مورد استفاده در توصیف و تشخیص گونه‌های تریکودرما را شرح داده‌اند. هر دو محقق به وجود مشکلاتی در شناسایی گونه‌های تریکودرما بر مبنای معیارهای مورفولوژیک اشاره کرده‌اند. ساموئلز (۱۹۹۶) هم مشاهدات و تفسیرهای مفصلی راجع به استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی در تعیین گونه‌های تریکودرما ارائه کرد. بی‌ست (۱۹۸۴، ۱۹۹۱) آرایه بندی جنس تریکودرما را به طور دقیق مورد بررسی قرار داده و در مجموع، بیش از ۳۰ گونه را در این جنس معرفی کرده است. گمس و بی‌ست (۱۹۹۸) بخش *Saturnisporum* را در بخش

*Longibrachiatum* ادغام و بدین ترتیب تعداد بخش‌ها را به چهار عدد کاهش دادند. این چهار بخش شامل: ۱- *Trichoderma* ۲- *Pachybasium* ۳- *Longibrachiatum* ۴- *Hypocreanum* می‌باشند. تشخیص گونه‌ها بر اساس ویژگی‌های پرگنه و مشخصات ریخت‌شناختی شامل نحوه انشعاب کنیدیوفورها، شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های فیالیدها، کنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها و ریشه‌ها با استفاده از کلیدهای شناسایی صورت می‌گیرد (بی‌ست ۱۹۹۱، ساموئلز ۱۹۹۶، گمس و بی‌ست ۱۹۹۸، ساموئلز و همکاران ۲۰۱۲). با توجه به مشکلات و نارسایی‌های موجود در استفاده از داده‌های ریخت‌شناختی در شناسایی گونه‌های تریکودرما، در سال‌های اخیر داده‌های توالی نوکلئوتیدی به صورت رایج برای شناسایی گونه‌های تریکودرما مورد استفاده واقع شده‌اند. توالی ناحیه ITS-rDNA از تنوع بین گونه‌ای قابل توجهی برخوردار بوده و کارایی خوبی در تفکیک اغلب گونه‌های این جنس دارد، با این وجود استفاده از داده‌های توالی ژن‌های کد کننده پروتئین از قبیل ژن فاکتور بسط ترجمه (*Tef-a*) جهت شناسایی دقیق ۲۶۰ گونه توصیف شده تریکودرما ضروری است (ساموئلز و همکاران ۲۰۱۲، بی‌ست و همکاران ۲۰۱۵).

گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق در دو بخش *Longibrachiatum* و *Pachybasium* قرار گرفتند. تفکیک گونه‌های این دو بخش بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی از قبیل شکل و اندازه فیالیدها و کنیدیوفورها و

کنیدیومی را به وجود می‌آورند. فیالیدهای این گونه‌ها آمپولی شکل بوده، معمولا در دسته‌های ۷-۲ تایی و به صورت پیرامونی روی کنیدیوفورها قرار دارند. کنیدیوم‌ها تک سلولی، گرد تا بیضی یا مستطیلی شکل، به رنگ سبز و دارای سطح صاف هستند. در این تحقیق، دو گونه *T. polysporum* و *T. harzianum* از این بخش شناسایی گردید. هویت گونه‌ها با استفاده از داده‌های توالی ناحیه ITS تایید گردید. در تبارنمای ترسیم شده، گونه‌های شناسایی شده در این بررسی همراه با توالی نمونه‌های تیپ هر یک از گونه‌ها در یک گروه با اعتبار سنجی بالا قرار گرفتند.

به طور کلی با شناسایی و معرفی گونه‌های تریکودرمای اندوفیت، امکان ارزیابی کارایی این گونه‌ها در کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی و افزایش راندمان تولید محصولات کشاورزی در مطالعات بعدی فراهم می‌گردد.

نیز میزان شعاع رشد پرگنه امکان پذیر است. گونه‌های مربوط به بخش *Longibrachiatum* دارای کنیدیوفور-هایی با محور اصلی بلند و انشعاب‌های نامنظم و کم تراکم، با انشعاب‌های ثانویه معمولا کوتاه هستند. فیالید-ها معمولا آمپولی تا کوزه‌ای شکل، معمولا بصورت منفرد و نامنظم یا به ندرت به شکل دسته‌های چند تایی روی کنیدیوفورها قرار دارند. کنیدیوم‌ها تک سلولی، غالبا مستطیلی تا بیضوی و دارای سطح صاف هستند. گونه‌های این بخش رنگ زرد مایل به سبز مشخص در سطح زیرین پرگنه‌ها تولید می‌کنند (گمس و بی‌ست ۱۹۹۸). در تحقیق حاضر سه گونه *T. T. atroviride* از این بخش *longibrachiatum* و *citrinoviride* شناسایی گردیدند.

اعضای بخش *Pachybasium* دارای کنیدیوفورهای بسیار قوی و غیر قابل انعطاف با انشعاب‌های پیرامونی فراوان، در فواصل نامنظم هستند که معمولا در سطح پرگنه‌ها در کنار هم تولید می‌شوند و جوش‌های

## منابع

- Arnold AE, Mejia LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N and Herre EA, 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 15649-15654.
- Bailey BA and Lumsdon RD, 1998. Direct effects of *Trichoderma* and *Gliocladium*, In: Harman GE, Kubicek CP (eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*: enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis, Bristol, PA, pp. 185-204.
- Bailey BA and Melnick RL, 2013. The endophytic *Trichoderma*. In: Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M, Schmoll M (eds.), *Trichoderma*: biology and applications, 1st edn. CAB International, London, pp. 152-172.
- Bills GF and Polishook JD, 1991. Microfungi from *Carpinus caroliniana*. *Canadian Journal of Botany* 69: 1477-1482.
- Bisset J, 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany* 62: 924-931.
- Bisset J, 1991. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69: 2357-2372.
- Bisset J, 1992. *Trichoderma atroviride*. *Canadian Journal of Botany* 70: 639-641.
- Bisset J, Gams W, Jaklitsch W, Samuels GJ, 2015. Accepted *Trichoderma* names in the year 2015. *IMA Fungus* 6: 263-295.
- Blumenstein K, 2010. Characterization of endophytic fungi in the genus *Ulmus*: putative agents for the biocontrol of Dutch elm disease (DED). Diploma thesis, University of Kassel, Germany.
- Bultman TL and Murphy JC, 2000. Do fungal endophytes mediate wound-induced resistance? In: Bacon CW, White JF Jr, (eds.), *Microbial endophytes*. Marcel Dekker, pp: 421-453.

- Chaverri P, Samuels GJ, 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): species with green ascospores. *Studies in Mycology* 48: 1–116.
- Dehghanpour FS, Sharifnabi B and Mirlohi AF, 2006. Application of 5.8 S gene and ITS, PCR-RFLP pattern in taxonomy of *Neotyphodium* endophytic fungi. *Rostaniha* 7(1): 1-15.
- Ershad D, 2009. Fungi of Iran. 3rd edition, Iranian Research Institution of Plant Protection, 531 p.
- Farr DF, Rossman AY. 2017. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Retrieved January, 12, 2017, from <https://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>
- Gams W and Bissett J, 1998. Morphology and identification of *Trichoderma* In: Kubicek *Trichoderma* and *Gliocladium* 1: 3-34.
- Hanada RE, De Souza JT, Pomella AWV, Hebbar KP, Pereira JO, Ismaiel A and Samuels GJ , 2008. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* and a potential agent of biological control. *Mycological Research* 112: 1335-1343.
- Helander M, Ahlholm J, Sieber TN, Hinneri S and Saikkonen K, 2007. Fragmented environment affects birch leaf endophytes. *New Phytologist* 175: 547-553.
- Jaklitsch WM, Samuels GJ and Dodd SL, 2006. *Hypocrea rufa* / *Trichoderma viride*: a reassessment and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology* 56: 135-177.
- Klein D and Everleigh DE, 1998. Ecology of *Trichoderma*, In: Kubicek CP, Harman GE (eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taylor & Francis, London, UK. pp: 57-74.
- Kubicek CP and Penttila ME, 1998. Regulation of production of plant polysaccharide degrading enzymes by *Trichoderma* In: Kubicek CP, Harman GE (eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium*: enzymes, biological control and commercial applications. Taylor & Francis Ltd. London UK. pp. 49-71.
- Lucia M, Annalisa C, Antonio F, Benedetto TL, Salvatore C, Tonina R and Daniela P, 2009. Occurrence and characterization of peptaibols from *Trichoderma citrinoviride*, an endophytic fungus of cork oak, using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microbiology* 155: 3371-3381.
- Malinowski DP and Belesky DP, 2000. Adaptation of endophyte infected cool-season grasses to environmental stresses. *Crop Science* 40: 923-940.
- Mirlohi AF, Sabzalian MR and Khayam nekoie M, 2004. Endophytic fungi, characteristics and their potential for genetic manipulation. *Iranian Journal of Biotechnology* 2: 75-83.
- Moller EM, Bahnweg G, Sanderman H and Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20: 6115-6116.
- Nylander JAA, 2004. MrModeltest v. 2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Parsaeian M, Mirlohi AF, Rezaie AM and Khayam nekoie M, 2007. The effect of endophytic fungi on physiological characteristics and cold tolerance of two species of meadow fescue and tall fescue. *Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources* 10: 197-212.
- Ragazzi A, Moricca S, Capretti P, Dellavalle I and Turco E, 2003. Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining *Quercus* species in Italy. *Forest Pathology* 33: 31-38.
- Rifai MA, 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycologia* 116: 1-56.
- Roghalian M, Amini J, Abdollahzadeh J and Zafari D, 2013. A record of endophytic *Trichoderma* species in Kurdistan. *Plant Protection Journal* 5: 115-124.
- Ronquist F and Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

- Rossmann AY, 1996. Morphological and molecular perspectives on systematics of *Hypocreales*. *Mycologia* 88: 1-19.
- Sabzalian MR, Hatami B and Mirlohi AF, 2004. Mealybug, *Phenacoccus solani*, and barley aphid, *Sipha maydis*, response to endophyte-infected tall and, meadow fescues. [Entomologia Experimentalis et Applicata](#) 113: 205-209.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M and Sullivan TJ, 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319-343.
- Samuels GJ, 1996. *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. *Mycological Research* 100: 923-935.
- Samuels GJ and Ismaiel A, 2009. *Trichoderma evansii* and *T. lieckfeldtia*: two new *T. hamatum*-like species. *Mycologia* 101: 142-156.
- Samuels GJ, Ismaiel A, Mulaw TB, Szakacs G, Druzhinina IS, Kubicek CP, Jaklitsch WM, 2012. The Longibrachiatum clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal Diversity* 55: 77-108.
- Schulz B and Boyle C, 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661-686.
- Sivasithamparan K and Ghisalberti EL, 1998. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*, In: Kubicek CP, Harman GE (eds.). *Trichoderma and Gliocladium: basic biology, taxonomy and genetics*. Taylor and Francis Ltd. London, UK. pp: 131-191.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A and Kumar S, 2013. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tan RX and Zou WX, 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 18: 448-459.
- White JFJ and Torres MS, 2010. Is plant endophyte-mediated defensive mutualism the result of oxidative stress protection?. *Physiologia Plantarum* 138: 440-446.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), *PCR Protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego. pp: 315-322.
- Zabalgoitia I, 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 138-146.

## Identification of Endophytic *Trichoderma* Species From Oak Trees in Arasbaran Forests Using Morphological and Molecular Characteristics

S Ghasemi Esfahlan<sup>1</sup>, M Arzanlou<sup>2\*</sup> and A Babai-ahari<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Former MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

<sup>2</sup>Professors of Plant Pathology and Mycology Respectively, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

\*Corresponding author: [arzanlou@tabrizu.ac.ir](mailto:arzanlou@tabrizu.ac.ir)

Received: 24 May 2016

Accepted: 7 March 2017

### Abstract

*Trichoderma* species have a global distribution, representing dominant mycobiota of soils in different regions. Even though *Trichoderma* species exhibit strong saprophytic potential, they possess significant epiphytic phase and can penetrate internal tissues of plants without causing any harm to host plant. In recent years, substantial attention has been paid on the identification and interaction of endophytic *Trichoderma* species with plant hosts. However, there is a huge paucity of knowledge on biodiversity of endophytic *Trichoderma* species in Iran. The present study was aimed to characterize endophytic *Trichoderma* species from oak trees in Arasbaran forests. For this purpose, during August-September 2014, samples from twig and trunk of oak trees were collected in the Hatam-baig (Meshgin-Shahr) and the Kaleibar regions. A total number of 23 *Trichoderma* isolates were recovered from sampled areas. *Trichoderma* isolates were characterized based on morphological data and sequence data of ITS-rDNA region as *Trichoderma atroviride*, *T. citrinoviride*, *T.harzianum*, *T. longibrachiatum* and *T. polysporum*. In a phylogeny inferred based on sequence data of ITS-rDNA region, *Trichoderma* spp were clustered with the representative sequence of the type strain for each of the species with high bootstrap support. All five species are newly recorded from Arasbaran forests and black oak (*Quercus macranthera*) is reported as new host for these species. With the identification of these species, it will be possible to evaluate their efficacy in control of plant pathogens and promotion of plant growth.

**Keywords:** Endophyte, Black oak, *Trichoderma*, ITS-rDNA.