جداسازی و شناسایی قارچ تریکودرما از باغ‌های پسته آلوده به پوسیدگی فیتوفتورایی در استان سمنان

مهدی محمدی مقدم[۱]، محمد مرادی[۲]، معصومه حقدل[۳]، امیرحسین محمدی[۴]، مریم آفروشه[۵]، علیرضا برجسته[۶]، مصطفی قاسمی[۷]

تاریخ ارسال: ۱۴۰۴/۱۱/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۳/۱۹

چکیده

بیماری پوسیدگی طوقه یا گموز پسته ناشی از گونه‌های *Phytophthora*، یکی از مهم‌ترین و شایع‌ترین بیماری‌ها در مناطق پسته‌کاری کشور می‌باشد که هر ساله باعث از بین رفتن تعداد زیادی از درختان بارور و غیربارور می‌گردد. یکی از روش‌های مهم در کنترل قارچ عامل بیماری، استفاده ازروش‌های بیولوژیکی مانند قارچ تریکودرما می‌باشد که به‌صورت تجاری در بسیاری از مناطق دنیا استفاده می‌گردد. جهت اجرای تحقیق مذکور و به‌منظور جداسازی و شناسایی قارچ تریکودرما، از ریزوسفر درختان بارور ۱۵ تا ۲۵ ساله، نهال‌های پسته و علف‌های هرز مناطق مهم پسته‌کاری استان سمنان، طی سال‌های ۱۳۸۷ تا ۱۳۹۳ و به‌صورت تصادفی و از عمق۵ تا۳۰ سانتی‌متری نمونه‌برداری انجام و پس از مخلوط‌کردن با یکدیگر و تهیه یک نمونه مرکب به آزمایشگاه منتقل شد. بعد از تهیه سوسپانسیون خاک، مقدار یک میلی‌لیتر از رقت‌های 10^{-1} و 10^{-2} از سوسپانسیون خاک روی محیط‌کشت میکروبیPDA اسیدی و محیط‌کشت انتخابی(TSMC) در ۴ تکرار پخش گردید. پتری‌ها در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت یک هفته قرار داده شدند و به‌طور روزانه جمعیت کلنی‌های تریکودرما مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که قارچ تریکودرما از۳۰ درصد نمونه‌های خاک، جداسازی گردید. همچنین شناسایی جدایه‌ها بر اساس مشخصات میکرومرفولوژیکی نیز نشان داد که جدایه‌های تریکودرما به‌دست آمده متعلق به ۵ گونه *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma longibrachiatum*، *Trichoderma hamatum*، *Trichoderma atroviride* و *Trichoderma brevicompactum* بودند که در بین آن‌ها قارچ *T. harzianum* بیشترین فراوانی را داشت. هدف از انجام این تحقیق، جداسازی و شناسایی گونه‌های تریکودرما، به‌عنوان عوامل بیوکنترل قارچ فیتوفتورا از خاک باغ‌های پسته استان سمنان بود.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، پسته، فیتوفتورا، کنترل بیولوژیکی، گموز

۱ هیات علمی بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران.

۲ هیات علمی پژوهشکده پسته، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان، ایران.

۳ هیات علمی پژوهشکده پسته، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان ، ایران.

۴ هیات علمی پژوهشکده پسته، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان ، ایران.

۵ هیات علمی پژوهشکده پسته، موسسه تحقیقات علوم باغبانی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، رفسنجان ، ایران.

۶ هیات علمی بخش گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران.

۷ هیات علمی بخش تحقیقات زراعی و باغی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، قزوین، ایران.

* نویسنده مسئول: mm.moghadam52@gmail.com شماره تماس: ۰۹۱۲۳۳۱۸۰۸۴

مقدمه

پسته با نام علمی Pistacia vera L. یکی از مهم‌ترین محصولات باغی ایران بوده که در ۳۰ استان کشور کشت می‌شود. در سال ۱۴۰۳ مساحت باغ‌های پسته بارور و غیر بارور پسته در کشور به‌ترتیب حدود ۶۴۵ و ۸۱ هزار هکتار بوده که سه استان کرمان، خراسان رضوی و یزد بیشترین سطح زیرکشت و تولید پسته را به خود اختصاص داده‌اند (معاونت آمارِ مرکز آمار، فناوری اطلاعات و ارتباطات، ۱۴۰۳).

یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پسته، پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از گونه‌های فیتوفتورا می‌باشد که هر ساله باعث از بین‌رفتن تعداد زیادی از درختان بارور و غیربارور می‌گردد. این بیماری که به آن گموز، شیره سیاه و یا انگومک نیز گفته می‌شود، اولین بار توسط مستوفی‌پور در سال ۱۳۴۶ از طوقه و ریشه درختان پسته در قزوین جداسازی و بیماریزایی آن نیز در گلخانه اثبات گردید (مرادی و همکاران، ۱۴۰۰). تاکنون گونه‌های *Phytophthora drechsleri*، *Phytophthora citrophthora*، *Phytophthora megasperma*، *Phytophthora nicotianae*، *Phytophthora cryptogea*، *Phytophthora melonis*، *Phytophthora parsiana* و *Phytophthora pistaciae* به‌عنوان عامل بیماری گموز از مناطق مختلف پسته‌کاری گزارش شده‌اند (مرادی و همکاران، ۱۴۰۰). فراوانی و پراکندگی گونه‌های فیتوفتورا در باغ‌های پسته، متفاوت می‌باشد. تفاوت در فراوانی گونه‌های مختلف را می‌توان به دمای خاک، هوا ، قدرت سازگاری آن‌ها با محیط، میزان حساسیت و مقاومت ریشه در برابر عوامل بیماری، پایداری اندام‌های رویشی و فراوانی اندام‌های مقاوم قارچ نسبت داد (فانی و همکاران، ۱۳۹۸). درختان پسته در تمام مراحل رشد به پوسیدگی ریشه و طوقه فیتوفتورایی مبتلا می‌شوند. در پوسیدگی ریشه، ناحیه کورتکس و استوانه مرکزی ریشه‌های آلوده به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه درآمده و بافت از بین می‌رود و در مراحل پیشرفته بیماری به‌خصوص در درختان کوچک، بیشتر ریشه‌ها می‌میرند (محمدی و حقدل، ۱۳۸۵). درختان مبتلا به پوسیدگی طوقه، معمولاً در مدت یک تا دو سال پس از آلودگی، خشک شده؛ برگ آن‌ها در بهار ریخته و با شروع هوای گرم دچار زوال و مرگ می‌شوند (صداقتی و همکاران، ۱۳۸۸). به‌طور کلی در درختان آلوده نشانه‌هایی مانند ضعف و کم‌رشدی، کاهش تاج درخت، زردی، پژمردگی، حاشیه سوختگی برگ‌ها، برگ‌ریزی زودهنگام، سرخشکیدگی شاخه‌ها و آفتاب‌سوختگی شاخه‌های جانبی و میوه‌ها مشاهده می‌گردد (محمدی و حقدل، ۱۳۸۵). روش‌های مختلفی برای مدیریت بیماری‌های ناشی از قارچ فیتوفتورا در دنیا ارائه و یا به‌کار گرفته شده است که به‌صورت کلی می‌توان

استفاده از پایه‌های مقاوم و روش‌های کنترل شیمیایی، بیولوژیکی، زراعی و فیزیکی را نام برد (Erwin & Ribeiro, 1996). چون ارائه روش‌های پایدار و سازگار با محیط زیست جهت کنترل این بیماری مفید می‌باشد. بنابراین به‌نظر می‌رسد استفاده از یک روش کنترل بیولوژیک مؤثر در تلفیق با روش‌های دیگر، می‌تواند در مدیریت این بیماری مؤثر باشد. در این راستا میکروارگانیسم‌های زیادی تحت شرایط باغی یا مزرعه‌ای استفاده شده‌اند. از آنتاگونیست‌های موفق در این زمینه، گونه‌های قارچ تریکودرما می‌باشند که به خوبی قادر به رقابت با عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشند. موفقیت جدایه‌های تریکودرما به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیک به علت توانایی تکثیر و اسپورزایی بالا، بقاء تحت شرایط نامساعد، تحمل شوری و عناصر سنگین، تغییر محیط ریزوسفر، توان بالای کلونیزاسیون ریزوسفر ریشه و همزیستی با آن، رقابت تغذیه‌ای قوی و قدرت تهاجمی بالا در تقابل با بیمارگرهای ریزوسفر می‌باشد. علاوه‌بر آن ترشح ترکیبات شیمیایی مختلف، قدرت تحمل و یا خنثی‌سازی ترکیبات تولید شده توسط گیاهان و سایر میکروارگانیسم‌ها، ایجاد و القاء مقاومت با تحریک گیاه به تولید زهرابه‌های سمی برای بیمارگر و فعال‌نمودن مکانیسم‌های دفاعی و رشدی از دیگر عوامل موثر در موفقیت تریکودرما است(Banihashemi, 1994, Altomare *et al*., 1999, Kredics *et al*., 2001, Harman *et al*., 2004, Howell, 2003, Vinale *et al*., 2008). اکثر گونه‌های تریکودرما آنتاگونیست تعدادی از قارچ‌های بیمارگر خاک‌زاد هستند و در کنترل بیولوژیک تعداد زیادی از پاتوژن‌های گیاهی خاکزاد مانند *Armillaria mellea* ، *Rhizoctonia solani* ، *Pythium* spp و *Verticillium dahlia* نقش دارند (Chambers & Scott, 1995). جمعیت گونه‌های تریکودرما در خاک تحت تأثیر فاکتورهای مختلفی از جمله رطوبت قرار دارد، زمانی که شرایط خشک در خاک برای زمان طولانی حفظ شود، جمعیت تریکودرما و گلیوکلادیوم کاهش می‌یابد (Davet, 1979). یکی دیگر از فاکتورهای تأثیرگذار، درجه حرارت است که در پراکندگی گونه‌های تریکودرما در مناطق مختلف تأثیرگذار است. پاپاویزاس (۱۹۸۵) گزارش کرد جدایه‌های خاصی از *T. hamatum* و *T. pseudokoningi* با شرایط رطوبتی بالای خاک سازگار شده‌اند. *T. viride* و *T. polysporum* محدود به نواحی با دمای پایین هستند در حالیکه *T. harzianum* عموماً در نواحی با آب و هوای گرم وجود دارد و *T. koningi*, *T. hamatum* به‌صورت گسترده در نواحی با شرایط آب و هوای مختلف یافت می‌شود (Papavizas, 1985).

بر اساس مطالعات فانی و همکاران (۱۳۹۲) مایه‌زنی سویه‌های مختلف *Trichoderma* باعث کاهش معنی‌دار

مرگ و میر ناشی از *Phytophthora melonis* و همچنین افزایش معنی‌دار طول ریشه و ارتفاع نهال‌های پسته گردید. مایه‌زنی *Trichoderma asperellum* روی نهال‌های کاکائو نیز توانست علاوه‌بر کاهش پوسیدگی ناشی از *Phytophthora megakarya*، موجب افزایش ارتفاع نهال‌ها، وزن خشک ریشه و ساقه، افزایش غلظت کلروفیل، ترکیباتی فنلی و پرولین گردد (Tchameni *et al*., 2017). استفاده از چندگونه *Trichoderma* علیه پوسیدگی ساقه نخل روغنی در اثر *Ganoderma boninense*، نشان داد که حضور گونه‌های *Trichoderma* باعث کاهش شدت بیماری و بهبود خصوصیات رویشی (ارتفاع بوته، وزن تر و خشک ساقه و ریشه، قطر ساقه، سطح برگ، ضخامت ساقه) می‌گردد. علاوه‌بر این که فعالیت گونه‌های*Trichoderma* میزان آنزیم‌های پراکسیداز (POD)، و پلی فنل اکسیداز (PPO) و محتویات فنل و پرولین نیز را افزایش داد (Musa, 2017). همچنین کاربرد گونه‌های *Trichoderma* علیه پوسیدگی ناشی از*Rhizopus oryzae* در گوجه‌فرنگی توانست هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در گلخانه باعث جلوگیری از رشد میسلیوم و کنترل بیماری شود (Alka *et al*., 2017).

استفاده از استرین‌های Trichoderma علیه پژمردگی خیار ناشی از Fusarium oxysporum f.sp. cucumerinum نشان داد که تولید محصول به میزان ۳۳ درصد و کنترل بیماری تا ۷۸ درصد افزایش یافته و علاوه‌بر این که افزایش ارتفاع بوته، وزن تر و خشک ساقه و ریشه، قطر ساقه، سطح برگ، غلظت کلروفیل و نیتروژن، آنزیم‌های موثر در ایجاد مقاومت مانند سوپراکسید دیسموتازها (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) و پلی فنول اکسیداز (PPO) نیز افزایش یافته است (Mei et al., 2019). در مطالعات دیگر با استفاده از دو گونه Trichoderma نشان دادند که این قارچ‌ها ضمن کاهش رشد میسیلیومی Bipolaris maydis در ذرت باعث کاهش شدت بیماری نیز شده علاوه‌بر این که فعالیت آنزیم‌های دفاعی مانند سوپراکسید دیسموتازها (SOD)، پراکسیداز (POD)، کاتالاز (CAT) نیز در اثر فعالیت گونه‌های Trichoderma افزایش نشان داد (Ashlesha et al., 2019).

در تحقیقی دیگرتوسط سانکز با به کار بردن ایزوله‌های طبیعی و تجاری *T. harzianum* بر علیه فیتوفتورایی طوقه گلابی (*Phytophthora cactorum*) در طی دوسال متوالی تأثیر مثبت و معنی‌دار *T. harzianum* را بر پوسیدگی طوقه را نشان دادند و کاهش معنی‌دار مرگ و میر و شدت بیماری و افزایش کلنیزه شدن ریشه و طول ریشه در تیمارهای*T. harzianum* نسبت به شاهد را گزارش کردند(Sánchez *et al*., 2019). در تحقیقی دیگر تأثیر معنی‌دار *Trichoderma*

harzianum در کاهش مرگ‌ومیر خیار و شـــدت بیماری توســـط *Phytophthora drechsleri* و تاثیر معنی‌دار بر افزایش پارامترهای رویشی از جمله طول اندام‌های هوایی و ریشه و وزن تر ریشه و اندام‌های هوایی را گزارش دادند (Delkha. & Behboudi, 2021).

مواد و روش‌ها

- نمونه‌برداری جهت جداسازی قارچ تریکودرما

از ریزوسفر درختان در مناطق مختلف پسته‌کاری کشور شامل استان‌های کرمان، فارس، قم، مرکزی، خراسان رضوی، سمنان و یزد طی سال‌های ۱۳۸۷ تا ۱۳۹۳ به‌صورت مجزا نمونه‌برداری صورت گرفت. در هر باغ، از جهت‌های مختلف جغرافیایی (شمال، جنوب، شرق و غرب) به فواصل ۱۰ تا ۱۵ متر نمونه‌برداری شد و پس از مخلوط‌کردن، سه نمونه مرکب از هر باغ به آزمایشگاه منتقل گردید.

برای این منظور در مناطق مختلف پسته‌کاری استان سمنان (دامغان، سمنان، شاهرود و گرمسار)، باغ‌های سالم و مبتلا به گموز انتخاب و در زمان‌های متفاوت در طول سال از ریزوسفر درختان بارور، نهال‌های پسته و علف‌های هرز به‌صورت مجزا نمونه‌برداری صورت گرفت. برای نمونه‌برداری ابتدا هر باغ به ۵ ناحیه شمالی، جنوبی، شرقی، غربی و مرکزی تقسیم‌بندی شد. از هر ناحیه ۱۰ زیر نمونه خاک در محل سایه‌انداز درختان (در بین ردیف‌ها و از عمق ۳۰-۵ سانتی‌متری) به‌صورت تصادفی تهیه و پس از مخلوط‌کردن با یکدیگر و تولید یک نمونه مرکب به آزمایشگاه منتقل گردید. به این ترتیب تعداد ۲۲ نمونه اصلی خاک از مناطق مختلف استان نمونه‌برداری شد.

- جداسازی جدایه‌های قارچ تریکودرما از خاک و ریزوسفر

برای جداسازی جدایه‌های تریکودرما نمونه‌های خاک با روش سری رقـت تهیـه و روی دو محیط PDA اسیدی و محیط کشت انتخابی TSMC (Trichoderma Selective Medium+Captan) کشت داده شدند. برای تهیه محیط کشت PDA اسیدی (APDA)، ۲/۵ میلی‌لیتر اسیدلاکتیک ۲۵٪ به یک لیتر محیط کشت اضافه گردید و برای تهیه‌ی محیط‌کشت انتخابی تریکودرما TSMC، ۰/۲ گرم $Mgso_4 . 7H_2o$، ۰/۹ گرم K_2HPO_4، ۰/۱۵ گرم KCl، ۱ گرم NH4NO3، 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 به‌عنوان باکتری‌کش و ۲۰ میلی‌گرم در لیتر کاپتان (پودر وتابل ۵۰ درصد) و ۰/۱۵ گرم در لیتر رزبنگال و ۰/۲ گرم در لیتر نیز پنتاکلرونیتروبنزن[1] به‌عنوان قارچ‌کش اضافه

1 :PCNB

گردید (میرخانی و همکاران، ۱۳۹۵ Elad & Chet, 1983) ;. بعد از الک کردن خاک‌های نمونه‌برداری شده، مقدار ۱۰ گرم خاک الک‌شده در داخل فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل همراه با توئین ۲۰ (۱ در ۱۰۰۰) ریخته شد. فلاسک‌ها به مدت ۳۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰ تا ۲۰۰ دور در دقیقه با استفاده از شیکر به هم زده شد. پس از تهیه رقت‌های 10^{-1} تا 10^{-3} از سوسپانسیون حاصله، مقدار یک میلی لیتر از هر رقت روی سطح محیط‌کشت انتخابی پخش گردید. برای هر رقت سه تکرار در نظر گرفته شد. پتری دیش‌ها حاوی عصاره خاک، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی به‌مدت یک هفته قرار داده شد و به‌صورت روزانه جمعیت کلنی‌های تریکودرما مورد بررسی قرار گرفت (میرخانی و همکاران، ۱۳۹۵). جدایه‌های تریکودرمای رشد کرده بر روی محیط‌کشت، به‌صورت جداگانه و انفرادی روی محیط PDA کشت داده شدند. برای خالص‌سازی این جدایه‌ها از روش تک‌اسپور در محیط‌کشت آب-آگار ۲ درصد استفاده گردید. جدایه خالص‌شده به لوله شیب‌دار حاوی محیط PDA انتقال داده شدند و بعد از رشد قارچ، در دمای چهار درجه سلسیوس نگه‌داری شدند.

- شناسایی جدایه‌های تریکودرما

به‌منظور شناسایی دقیق جدایه‌های مختلف قارچ تریکودرما، بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی (رنگ، شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های کنیدیوفورها، فیالیدها، کلامیدوسپورها، کنیدیوم‌ها، ریسه‌های هوایی و ریسه‌های فرورفته در محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar و TSMC (Trichoderma Selective Medium+Captan) با استفاده از کلید شناسایی (; Gams & Bissett, 1998 Samuels *et al.*, 2013) و کلید موجود در پورتال تریکودرما به آدرس (http: //nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm) انجام شد.

نتایج

از میان ۱۰۲ جدایه تریکودرمای به‌دست‌آمده از باغ‌های پسته، تعداد ۶۱ سویه‌ی *T. harzianum*، ۱۴ سویه *T. hamatum*، ۱۰ سویه *T. artroviridae*، ۹ سویه *T. brevicompactum* و ۸ سویه*T. longibrachiatum* به‌دست آمد (جدول ۱). از میان دو محیط‌کشت استفاده شده برای جداسازی جدایه‌های تریکودرما، محیط TSMC به‌عنوان محیط‌کشت مطلوب و بهینه جهت جداسازی انتخاب شد. نتایج حاصل از جداسازی نشان داد که از ۳۰ درصد نمونه‌ها، قارچ تریکودرما جدا گردید. بر اساس مشخصات میکرومرفولوژیکی شامل رنگ، شکل، اندازه و سایر ویژگی‌های کنیدیوفورها، فیالیدها، کلامیدوسپورها، کنیدیوم‌ها، ریسه‌های هوایی و ریسه‌های فرورفته در محیط‌کشت، جدایه‌های به‌دست‌آمده به گونه‌های *Trichoderma harzianum*، *T.longibrachiatum*، *T.*

T. brevicompactum artroviridae و *T. hamatum* تعلق

داشتند (جدول ۱).

جدول ۱ - محل، زمان و گونه تشخیص داده شده جدایه‌های تریکودرما به‌دست‌آمده از مناطق مختلف پسته‌کاری استان سمنان

ردیف	شماره جدایه	محل جمع‌آوری	تاریخ جداسازی	گونه
۱	ST1	دامغان	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۲	ST2	دامغان	۱۳۸۹	*T. harzianum*
۳	ST3	سمنان	۱۳۸۹	*T. harzianum*
۴	ST4	میامی	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۵	ST5	شاهرود	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۶	ST6	گرمسار	۱۳۸۷	*T.* longibrachiatum
۷	ST7	دامغان	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۸	ST8	دامغان	۱۳۹۱	*T. harzianum*
۹	ST9	دامغان	۱۳۹۰	*T.* longibrachiatum
۱۰	ST10	دامغان	۱۳۸۸	*T. harzianum*
۱۱	ST11	دامغان	۱۳۸۸	*T. harzianum*
۱۲	ST12	گرمسار	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۱۳	ST13	دامغان	۱۳۹۱	T. hamatum
۱۴	ST14	دامغان	۱۳۸۸	*T. harzianum*
۱۵	ST15	سمنان	۱۳۸۸	*T. harzianum*
۱۶	ST16	میامی	۱۳۹۱	*T. harzianum*
۱۷	ST17	شاهرود	۱۳۹۲	*T.* brevicompactum
۱۸	ST18	دامغان	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۱۹	ST19	دامغان	۱۳۹۲	*T. artroviridae*
۲۰	ST20	دامغان	۱۳۹۱	*T. harzianum*
۲۱	ST21	دامغان	۱۳۸۸	*T.* brevicompactum

ادامه جدول ۱ – محل، زمان و گونه تشخیص داده شده جدایه‌های تریکودرما به‌دست‌آمده از مناطق مختلف پسته‌کاری استان سمنان

۲۲	ST22	دامغان	۱۳۹۲	*T. harzianum*
۲۳	ST23	شاهرود	۱۳۸۷	*T. artroviridae*
۲۴	ST24	گرمسار	۱۳۸۹	*T. harzianum*
۲۵	ST25	دامغان	۱۳۸۹	*T. harzianum*
۲۶	ST26	دامغان	۱۳۸۸	*T. artroviridae*
۲۷	ST27	سمنان	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۲۸	ST28	میامی	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۲۹	ST29	دامغان	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۳۰	ST30	دامغان	۱۳۹۲	*T. harzianum*
۳۱	ST31	دامغان	۱۳۹۰	*T. artroviridae*
۳۲	ST32	دامغان	۱۳۸۸	T. hamatum
۳۳	ST33	دامغان	۱۳۸۸	T. hamatum
۳۴	ST34	میامی	۱۳۸۷	*T.* brevicompactum
۳۵	ST35	شاهرود	۱۳۹۱	T. hamatum
۳۶	ST36	گرمسار	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۳۷	ST37	دامغان	۱۳۹۰	*T. artroviridae*
۳۸	ST38	دامغان	۱۳۸۹	*T.* brevicompactum
۳۹	ST39	سمنان	۱۳۹۲	*T. harzianum*
۴۰	ST40	میامی	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۴۱	ST41	شاهرود	۱۳۹۰	*T. artroviridae*
۴۲	ST42	دامغان	۱۳۹۰	T. hamatum
۴۳	ST43	دامغان	۱۳۹۱	T. hamatum
۴۴	ST44	دامغان	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۴۵	ST45	سمنان	۱۳۸۹	*T. harzianum*

ادامه جدول ۱ – محل، زمان و گونه تشخیص داده شده جدایه‌های تریکودرما به‌دست‌آمده از مناطق مختلف پسته‌کاری استان سمنان

۴۶	ST46	میامی	۱۳۸۹	*T. harzianum*
۴۷	ST47	دامغان	۱۳۸۸	*T. harzianum*
۴۸	ST48	گرمسار	۱۳۸۸	T. hamatum
۴۹	ST49	دامغان	۱۳۸۹	*T. harzianum*
۵۰	ST50	دامغان	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۵۱	ST51	دامغان	۱۳۹۱	*T. harzianum*
۵۲	ST52	میامی	۱۳۸۷	T. hamatum
۵۳	ST53	شاهرود	۱۳۸۸	T. hamatum
۵۴	ST54	گرمسار	۱۳۸۸	*T.* brevicompactum
۵۵	ST55	دامغان	۱۳۸۸	*T.* longibrachiatum
۵۶	ST56	دامغان	۱۳۹۱	*T. harzianum*
۵۷	ST57	دامغان	۱۳۸۷	*T. artroviridae*
۵۸	ST58	دامغان	۱۳۸۹	*T.* brevicompactum
۵۹	ST59	دامغان	۱۳۸۹	*T. harzianum*
۶۰	ST60	دامغان	۱۳۹۲	*T. harzianum*
۶۱	ST61	دامغان	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۶۲	ST62	دامغان	۱۳۹۰	T. hamatum
۶۳	ST63	سمنان	۱۳۹۱	T. hamatum
۶۴	ST64	میامی	۱۳۹۱	*T. harzianum*
۶۵	ST65	شاهرود	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۶۶	ST66	گرمسار	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۶۷	ST67	دامغان	۱۳۸۹	*T. harzianum*
۶۸	ST68	دامغان	۱۳۸۸	T. hamatum
۶۹	ST69	سمنان	۱۳۸۹	*T. harzianum*

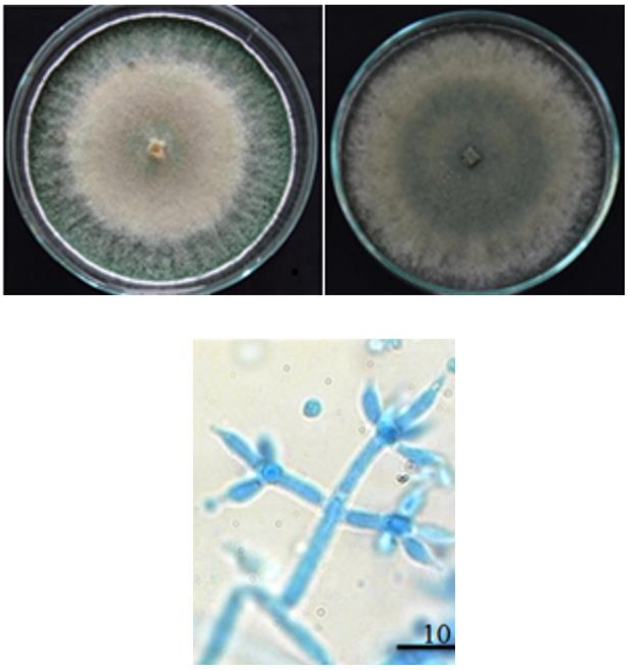
ادامه جدول ۱ – محل، زمان و گونه تشخیص داده شده جدایه‌های تریکودرما به‌دست‌آمده از مناطق مختلف پسته‌کاری استان سمنان

۷۰	ST70	میامی	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۷۱	ST71	شاهرود	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۷۲	ST72	گرمسار	۱۳۹۱	T. hamatum
۷۳	ST73	دامغان	۱۳۹۰	T. hamatum
۷۴	ST74	دامغان	۱۳۸۸	*T.* brevicompactum
۷۵	ST75	دامغان	۱۳۸۸	*T. harzianum*
۷۶	ST76	دامغان	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۷۷	ST77	شاهرود	۱۳۸۷	*T. artroviridae*
۷۸	ST78	گرمسار	۱۳۸۷	*T.* longibrachiatum
۷۹	ST79	دامغان	۱۳۸۹	*T. harzianum*
۸۰	ST80	دامغان	۱۳۸۹	*T. artroviridae*
۸۱	ST81	سمنان	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۸۲	ST82	میامی	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۸۳	ST83	دامغان	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۸۴	ST84	گرمسار	۱۳۹۱	*T. harzianum*
۸۵	ST85	دامغان	۱۳۹۲	*T. harzianum*
۸۶	ST86	دامغان	۱۳۸۷	*T.* brevicompactum
۸۷	ST87	سمنان	۱۳۸۹	*T. harzianum*
۸۸	ST88	میامی	۱۳۸۹	*T. harzianum*
۸۹	ST89	دامغان	۱۳۸۸	*T.* brevicompactum
۹۰	ST90	گرمسار	۱۳۸۹	*T.* longibrachiatum
۹۱	ST91	دامغان	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۹۲	ST92	دامغان	۱۳۹۱	*T.* longibrachiatum
۹۳	ST93	سمنان	۱۳۹۱	*T. harzianum*

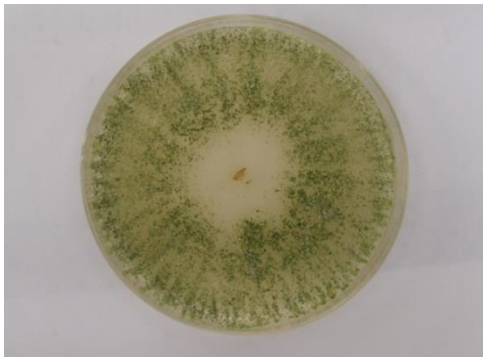
ادامه جدول ۱ – محل، زمان و گونه تشخیص داده شده جدایه‌های تریکودرما به‌دست‌آمده از مناطق مختلف پسته‌کاری استان سمنان

۹۴	ST94	میامی	۱۳۹۰	*T. harzianum*
۹۵	ST95	شاهرود	۱۳۸۸	*T.* longibrachiatum
۹۶	ST96	دامغان	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۹۷	ST97	دامغان	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۹۸	ST98	دامغان	۱۳۹۱	*T. harzianum*
۹۹	ST99	سمنان	۱۳۸۷	*T. harzianum*
۱۰۰	ST100	میامی	۱۳۸۹	*T. artroviridae*
۱۰۱	ST101	شاهرود	۱۳۸۹	*T.* longibrachiatum
۱۰۲	ST102	دامغان	۱۳۹۲	*T. harzianum*

رنگ کلنی‌های گونه *Trichoderma harzianum* پس از اسپورزایی از سفید به سبز تغییر می‌یابد. اسپورزایی در دمای ۳۰ درجه سلسیوس بیشتر بوده و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس رشد رویشی متوقف می‌شود. کنیدیوم‌زایی به‌صورت جوش‌های متراکم تا پراکنده و عمدتاً در نزدیک حاشیه پتری‌هاست. فیالیدها آمپولی شکل و معمولا در شاخه‌های فراهم سه تا پنج‌تایی قرار می‌گیرند (شکل ۱ و ۲).

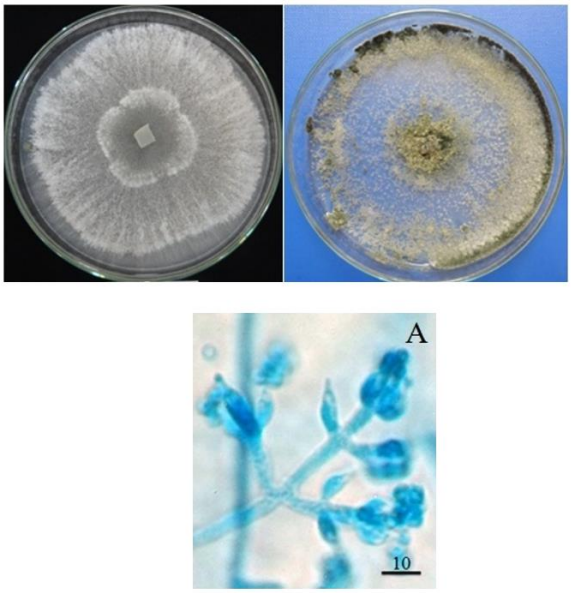


شکل ۱ - مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی *Trichoderma harzianum*



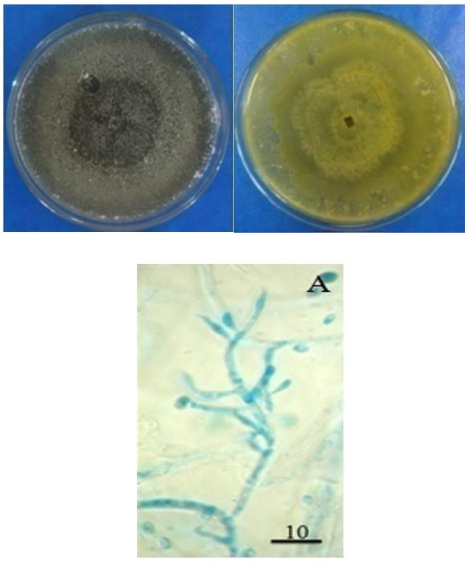
شکل ۲- پرگنه قارچ Trichoderma harzianum

توده اسپورهای گونه *Trichoderma brevicompactum* به‌صورت جوش‌های پراکنده در سطح کلنی‌ها مشاهده شده که همزمان با مسن‌تر شدن به رنگ سبز دیده می‌شوند. فیالیدهای پهن و آمپولی شکل در دسته‌های دو تا پنج‌تایی تشکیل می‌شود (شکل ۳).



شکل ۳ - مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی Trichoderma brevicompactum

توده اسپورها در گونه *Trichoderma longibrachiatum* به رنگ سبز تیره و به‌صورت متراکم در سطح محیط‌کشت بوده، فیالیدها بلند، کوزه‌ای تا سیلندری شکل و غالباً به‌صورت منفرد روی کنیدیوفور تشکیل می‌شوند. رشد کلنی‌های قارچ سریع بوده و اسپورزایی در کل سطح کلنی دیده می‌شود (شکل ۴).



شکل ۴ - مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی Trichoderma longibrachiatum

بحث و نتیجه‌گیری

قارچ تریکودرما از جمله قارچ‌های همه‌جازی است که در خاک، مواد آلی و چوب‌های در حال تجزیه به فراوانی یافت می‌شود و در مناطق جغرافیایی مختلف، از اعضای غالب میکروفلور خاک به‌شمار می‌رود (Kubicek et al., 2003). در مطالعه حاضر در بین ۴ گونه شناسایی شده، قارچ *T. harzianum* ، فراوان‌ترین گونه‌ی تریکودرما در باغ‌های پسته‌ی استان سمنان بود. به‌طور کلی *T. harzianum* از فراوان‌ترین گونه‌های تریکودرما در دنیا و ایران می‌باشد (Rifai, 1969 ; ظفری و همکاران ،۱۳۸۱). همچنان که فانی و همکاران (۱۳۹۲) نیز از میان ۵۰ جدایه تریکودرما به‌دست آمده از باغ‌های پسته استان کرمان، یزد، خراسان رضوی و سمنان، ۳۲ جدایه را *T. harzianum* شناسایی کردند. همچنین میرخانی و همکاران (۱۳۹۵) نیز در شناسایی گونه‌های تریکودرمای باغ‌های پسته‌ی استان کرمان براساس ویژگی‌های مورفولوژیک ، ۵ گونه‌ی *Trichoderma harzianum*، *T. aureoviride*، *T. virens*، *T. brevicompactum* و *T. longibrachiatum* جداسازی و شناسایی کردند. در مطالعه آن‌ها بیش از ۵۰ درصد جدایه‌های شناسایی شده، متعلق به گونه‌ی *T. harzianum* بودند که به‌عنوان گونه‌ی غالب خاک باغ‌های پسته‌ی استان کرمان معرفی گردید. بر اساس مطالعات انجام شده قارچ *T. harzianum* در بیشتر مناطق مختلف پسته‌کاری کشور وجود دارد، هر چند در بعضی از مناطق، جداسازی آن به سختی صورت می‌گیرد که این موضوع می‌توانند انعکاس‌دهنده فاکتورهای اکولوژیکی مؤثر در پراکندگی تریکودرما، بقاء و دینامیک جمعیت آن در خاک‌ها باشد، که توسط محققین مختلف مورد بررسی قرار گرفته است (Hubbard *et al*., 1983). جمعیت قارچ تریکودرما وقتی شرایط خشک در خاک برای مدت زمان طولانی ادامه یابد، کاهش می‌یابد. میزان آهن خاک نیز ممکن است به‌عنوان یک فاکتور مهم برای وجود تریکودرما در خاک مطرح باشد (Danielson & Davey, 1973). تحقیقات نشان می‌دهد سودوموناد‌های فلورسنت خاک، توانایی و استقرار گونه‌های تریکودرما را محدود می‌کنند (Hubbard *et al*., 1983). با توجه به استراتژی بیوکنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی و اهمیت جنس تریکودرما به‌عنوان یک عامل بیوکنترل موفق، شناسایی گونه‌های تریکودرما موجود در منطقه و معرفی گونه‌ی غالب، می‌تواند نویدی برای مطالعات بعدی در زمینه استفاده از آن‌ها در مدیریت تلفیقی پوسیدگی فیتوفتورایی پسته در منطقه باشد.

منابع

صداقتی، ناصر، شیبانی تذرجی، زهرا، تاج آبادی پور، علی، حکم آبادی، حسین، حقدل، معصومه و عبدالهی عزت آبادی، محمد. (۱۳۸۸). راهنمای تولید پسته (ترجمه). انتشارات سروا. ۵۶۶ صفحه

ظفری، دوستمراد، ارشاد، جعفر، زارع، رسول وعلیزاده، عزیزاله. (۱۳۸۱). تحقیقی در زمینه شناسایی گونه‌های *Trichoderma* در ایران. بیماری‌های گیاهی، جلد ۳۸، ۶۸-۵۶.

فانی، سیدرضا، مرادی قهدریجانی، محمد ، علیپور مقدم، مهدیه، شرافتی، عبدالحمید، محمدی مقدم، مهدی، صداقتی، ابراهیم و خدایگان، پژمان . (۱۳۹۲). کارایی سویه‌های بومی *Trichoderma harzianum* در بیوکنترل گموز پسته. دانش گیاهپزشکی ایران, ۴۴(۲)، ۲۴۳-۲۵۲. doi: 10.22059/ijpps.2014.36672

فانی، سید رضا، مرادی قهدریجانی، محمدو میرابوالفتحی، منصوره.(۱۳۹۸). مروری بر بیماری انگومک پسته دانش بیماری شناسی گیاهی، ۸ (۲) :۳۰-۱۶

محمدی، امیرحسین و حقدل، معصومه .(۱۳۸۹). بیماری‌های درختان میوه خشکباری در مناطق معتدله. (ترجمه تویتدال، بت.ال؛ تمیس جی میکائیلیدس و جی دبلیو شیدت. ۲۰۰۲). موسسه تحقیقات پسته کشور. ۴۰۷ صفحه.

مرادی، محمد، حقدل، معصومه و سلمانی نژاد، حمیده. (۱۴۰۰). نشریه مدیریت تلفیقی بیماری پوسیدگی فیتوفتورایی طوقه و ریشه پسته (گموز). مؤسسه تحقیقات علوم باغبانی، پژوهشکده پسته،نشریه ۱۱۱

میرخانی، فهیمه، علایی، حسین، محمدی، امیر حسین و حقدل، معصومه. (۱۳۹۵). شناسایی گونه‌های غالب تریکودرما در باغات پسته‌ی استان کرمان. پژوهش‌های حفاظت گیاهان ایران،۳۰(۱)، ۹۲-۸۲.

Alka, P.R.K., & Prajapati, B.K. (2017). Effect of Trichoderma Spp. and its culture filtrate antagonists on growth and management of Rhizopus rot of tomato fruit in vitro and in vivo. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 6(4): 394-398

Ashlesha, A., Oberoi, H. & Kumar, P. (2019). Rhizosphere Trichoderma Isolates as Potential Biocontrol Agent for Maydis Leaf Blight Pathogen (Bipolaris maydis) in Fodder Maize. *Indian National Science*, 85(4): 885-893.

Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T. & Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, (7): 2926-2933.

Banihashemi, Z. (1994). Identification of Phytophthora species associated with pistachio gummosis in Southern Iran. *Acta Horticulture*, (ISHS) 419: 349-352.

Bissett, J. (1991). A revision of the genus Trichoderma II. Infrageneric Classification. *Canadian Journal of Botany*, 69: 2357-2372.

Chambers, S.M., & Scott , E.S. (1995). Invitro antagonism of Phytophthora cinnamomi & P. citricola by isolates of *Trichoderma* spp. and *Gliocladium virens*. *Journal of Phytopathology*, 143: 471-477 .

Danielson, R.M. & Davey, C.B. (1973). Non nutritional factors affecting the growth of Trichoderma in culture. *Soil Biology Biochemistry*, 5:495-504.

Davet, P. (1979). Techniques pour I'analy se des population de Trichoderma et de *Gliocladium virens* dans le sol. *Annual Phytopathology*, 11:529-33.

Delkhah, Z. & Behboudi, K. (2021). Improvement of biocontrol efficacy of Trichoderma harzianum Tr6 vs.

Musa, H. (2017). *Efficacy of Trichoderma spp. consortium as potential biocontrol agents of Ganoderma disease of oil palm, and involvement of antioxidant enzymes and total phenolic content.* Masters thesis, Universiti Putra Malaysia.120pp.

Papavizas G.C. (1985). Trichoderma and Gliocladium biology and the potential for bio-control. *Annual Review Phytophathology*, 23:23-77 .

Rifai, M.A. (1969). A revision of the genus Trichoderma. *Mycological Papers*, 116, 1-55.

Samuels, G.J., P. Chaverri, D.F. Farr & McCray, E.B. (2013). Trichoderma Online, systematic mycology and microbiology laboratory, ARS, USDA. Retrieved November 28, 2013, from /taxadescriptions-/keys/TrichodermaIndex.cfm.

Sánchez, A.D., Ousset, M.J. & Sosa, M.C. (2019). Biological control of Phytophthora collar rot of pear using regional Trichoderma strains with multiple mechanisms. Biological Control, 135: 124-134.

Tchameni, N.S., Sameza, M.L., O'donovanb, A., Fokom, R.,. (2017). Antagonism of Trichoderma asperellum against Phytophthora megakarya and its potential to promote cacao growth and induce biochemical defence. Mycology, 8(2):84–92

Vinale, F.,K. Sivasithamparam, E.L. Ghisalberti, R. Marra, S.l. Woo & Lorito. M. (2008). Trichoderma–plant–pathogen interactions in soil agro-ecosystems. *Soil Biology Biochemistry*, 40:1–10

Phytophthora drechsleri, the causal agent of damping-off disease in Cucumis sativus. Journal of Crop Protection, 10(2): 411-423.

Elad, Y. & Chet, I. (1983). Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. *Phytoparasitica*, 11: 55-58

Erwin, D.C. & Ribeiro, O.K. (1996) Phytophthora Diseases Worldwide. Plant Pathology, 47, 224-226.https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1998.0179a.x

Gams, W. & Bissett, J. (1998). Morphology and identification of Trichoderma. in: Kubicek, C. P., Harman, G. E. (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor and Francis Ltd., London, 3-34.

Harman, G.E, Howell, C.R, Viterbo, A. Chet, I. & Lorito, M. (2004). Trichoderma species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review of Microbiology*, 2:43–56.

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.

Hubbard, J.P, Harman, G.E. & Hadar, Y.(1983). Effect of soilbome Pseudomonas spp. on the biologicaI control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. *Phytopathology*, 73:655-59

Kredics, L., I. Dóczi, Z. Antal & Manczinger, L. (2001). Effect of heavy metals on growth and extracellular enzyme activities of mycoparasitic Trichoderma strains. *Bulletin of Environmental Contaminant*, 66(2):249-54.

Isolation and identification of *Trichoderma* fungi from pistachio orchards in Semnan province

Mehdi Mohammadi Moghadam[۱], Mohammad Moradi[۲], Masoumeh Haghdel[۳], Amirhossein Mohammadi[۴], Maryam Afrousheh[۵], Alireza Barjasteh[۶], Mostafa Ghasemi[۷]

Abstract

Phytophthora crown and root rot annually kills numerous productive and non-productive pistachio trees. Once the pathogen is established in an orchard, it can lead to the progressive death of trees over several years, rendering the orchard economically unviable. One of the important strategies for biological control of *Phytophthora* utilizes *Trichoderma* fungi, which are commercially applied in many regions worldwide. To implement the study and isolate and identify Trichoderma fungi, soil samples were collected from the rhizosphere of productive trees (15–25 years old), pistachio seedlings, and weeds in key pistachio-growing areas of Semnan Province between 2008 and 2014. Sampling was performed randomly at depths of 5–30 cm. The collected samples were then mixed to create a composite sample and transported to the laboratory. After preparing the soil suspension, 1 mL from each of the 10^{-1} and 10^{-2} dilutions was spread onto both acidified PDA and TSMC media in four replicates. The Petri dishes were incubated in darkness at 25°C for one week,

۱ *Crop and Horticultural Sciences Research Department, Semnan Agricultural and Natural Resources Research and Education Center (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran*

۲ *Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran*

۳ *Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran*

۴ *Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran*

۵ *Pistachio Research Center, Horticultural Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Rafsanjan, Iran*

۶ *Department of Plant Protection, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran*

۷ *Horticulture Crops Research Department, Qazvin Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Qazvin, Iran*

∗ Corresponding author: mm.moghadam52@gmail.com

and Trichoderma colony populations were examined daily. The results showed that *Trichoderma* fungi were isolated from 30% of the soil samples. Also, micromorphological characterization of the isolates indicated that the obtained Trichoderma isolates belonged to five species: Trichoderma harzianum, Trichoderma longibrachiatum, Trichoderma atroviride, and Trichoderma brevicompactum. Among these isolates, T. harzianum had the highest abundance. The aim of this study was to isolate and identify Trichoderma species as biocontrol agents against Phytophthora fungi from the soil of pistachio orchards in Semnan Province.

Key words: Antagonist, Biological Control, Gummosis , *Phytophthora*, Pistachio.