

Research Article

Identification of *Trichoderma* species from forest regions of Khorramabad County using morphological and molecular characteristics

Zahra Mirzaeipour¹, Eidi Bazgir^{✉1}, Doustmorad Zafari², Mostafa Darvishnia¹

¹ Department of Plant Protection, Agriculture Faculty, Lorestan University, Khorramabad, Iran
² Department of Plant Protection, Agriculture Faculty, Hamedan Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

Corresponding author

✉Bazgir.ei@lu.ac.ir

Abstract

Keywords

Biodiversity, Phylogeny,
ITS, *tef1-a*, Taxonomy

Trichoderma species are among the most abundant soil-inhabiting fungi with global distribution, occurring in wide range of climates. While most species are cosmopolitan, some species are restricted to certain geographical regions. Members of this genus have been evaluated as a potential plant disease biocontrol agents (BCA) and plant growth promoters. This study was conducted for the identification of *Trichoderma* species from the forest areas of the Khorramabad County, Iran. Soil samples were collected from different geographical areas in the Khorramabad County during different seasons of 2019-2020. After isolation and purification as well as screening of isolates based on morphological characteristics, isolates with different morphological characteristics were selected for molecular studies. A total of 200 isolates belonging to three sections namely *Trichoderma*, *Pachybasium* and *Longibrachiatum* including eight species namely, *T. atroviride*, *T. brevicompactum*, *T. citrinoviride*, *T. longibrachiatum*, *T. virens*, *T. viridescens*, *Trichoderma* sp. 1 and *Trichoderma* sp. 2 were identified based on their morphology and phylogenetic analysis of ITS region and *tef1-a* gene. The results showed the that two isolates namely *Trichoderma* sp. 1 of *Trichoderma* section and *Trichoderma* sp. 2 of *Longibrachiatum* section were not similar to any of the described *Trichoderma* species in terms of micromorphological characteristics, thus representing candidates for novel *Trichoderma* species.

Received: 6 June 2024
Revised: 24 August 2024
Accepted: 30 August 2024

Available online: 19
February 2025

Cite this article:

Mirzaeipour Z, Bazgir E, Zafari D, Darvishnia M, 2024. Identification of *Trichoderma* species from forest regions of Khorramabad County using morphological and molecular characteristics. *J Appl Res Plant Prot* 13 (4): 433–450.
<https://dx.doi.org/10.22034/arpp.2025.19379>

Copyright© 2023 University of Tabriz, Published by the University of Tabriz.
This is an open access article under the CC BY NC license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/>)

شناسایی گونه‌های *Trichoderma* از مناطق جنگلی شهرستان خرم‌آباد با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مولکولی

زهرا میرزایی پور^۱، عیدی بازگیر^۱✉، دوستم‌راد ظفری^۲، مصطفی درویش‌نیا^۱

^۱ گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

^۲ گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان، همدان، ایران

نویسنده مسئول: Bazgir.ei@lu.ac.ir ✉

دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۷ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۶/۰۳ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۹

چکیده

گونه‌های جنس *Trichoderma* از فراوان‌ترین قارچ‌های خاکری جهان می‌باشند. این قارچ‌ها در گستره‌ای از مناطق آب و هوایی گوناگون حضور دارند. در حالی که برخی از گونه‌ها همه‌جازی هستند، برخی نیز محدود به مناطق جغرافیایی خاص می‌باشند. بیشتر اعضای این جنس به عنوان عوامل کنترل زیستی بالقوه بیماری‌های گیاهی و محرک رشد گیاهان ارزیابی شده‌اند. این مطالعه با هدف شناسایی گونه‌های *Trichoderma* از مناطق جنگلی شهرستان خرم‌آباد انجام شد. برای این منظور در سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۹ نمونه‌های خاک از مناطق جغرافیایی مختلف شهرستان خرم‌آباد جمع‌آوری شد. پس از جداسازی و خالص‌سازی و غربال جدایه‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی، جدایه‌های متفاوت برای مطالعات مولکولی انتخاب شدند. در مجموع ۲۰۰ جدایه متعلق به سه بخش به نام‌های *Trichoderma*, *Pachybasium* و *Longibrachiatum* شامل هشت گونه به نام‌های *Trichoderma* sp. 1, *T. viridescens*, *T. virens*, *T. longibrachiatum*, *T. citrinoviride*, *T. brevicompactum*, *T. atroviride* و *Trichoderma* sp. 2 براساس ویژگی‌های ریخت‌سنجی، ریخت‌شناختی و واکاوی تبارزایی ناحیه ITS و ژن *tef1-α* شناسایی شدند. نتایج نشان داد که دو جدایه *Trichoderma* sp. 1 متعلق به بخش *Trichoderma* و *Trichoderma* sp. 2 متعلق به بخش *Longibrachiatum* از نظر ویژگی‌های میکرومورفولوژیکی با هیچ کدام از گونه‌های *Trichoderma* توصیف شده شباهت نداشتند، و به عنوان کاندیدای گونه جدید برای قارچ‌های دنیا مطرح می‌باشند.

کلمات کلیدی: تنوع زیستی، تاکسونومی، ITS، *tef1-a*، تبارزایی

مقدمه

بیوتکنولوژیکی، تصفیه بیولوژیکی فلزات سنگین و آلاینده‌های محیطی (Contreras-Cornejo et al. 2016)، و در تولید نانو ذرات طلا و نقره در فناوری نانو برای انسان مهم هستند (Maliszewska et al. 2009; Vahabi et al. 2011). برخی از گونه‌های این جنس به عنوان بیمارگر قارچ‌های خوراکی و بیمارگرهای فرصت‌طلب انسانی نیز گزارش شده‌اند (Park et al. 2006; Sandoval-Denis et al. 2014).

جنس *Trichoderma* اولین بار توسط Persoon توصیف شد (Persoon 1794). ولی طبقه‌بندی او از *Trichoderma* دقیق نبود. در سال ۱۹۶۹، ریفای (Rifai 1969) مفهوم گروه (aggregate) را بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی پیشنهاد کرد، وی گونه‌های *Trichoderma* را به ۹ گروه گونه‌ای (species aggregate) تقسیم نمود. متعاقباً، (Bissett 1984; 1991a, b, c) مطالعات دقیقی انجام داد و *Trichoderma* را بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی به پنج بخش تقسیم کرد، که شامل *Longibrachiatum*, *Trichoderma*, *Pachybasium* و *Saturnisporum* و *Hypocreanum* بودند. (Gams & Bissett)

گونه‌های قارچی متعلق به جنس *Trichoderma* Pers. سراسر جهان حضور دارند. این قارچ‌ها از اجزا متداول و شایع اکوسیستم‌های مختلف هستند و در طیف گسترده‌ای از مناطق آب و هوایی وجود دارند. برخی گونه‌ها محدود به مناطق جغرافیایی خاصی هستند. ولی برخی دیگر از گونه‌ها همه‌جازی هستند. اعضای این جنس غالباً به صورت انگل سایر قارچ‌ها، همچنین روی چوب و مواد پوسیده، در خاک و ریزوسفر، در اسفنج‌های دریایی و همراه با گیاهان به صورت اندوفیت یافت می‌شوند (Howell 2003; López-Bucio et al. 2015). تنوع در توانایی متابولیکی و طبیعت رقابتی و تهاجمی، این قارچ‌ها را به عنوان استقرار یابندگان موفق زیست‌گاه‌های خود تبدیل کرده است (Atanasova et al. 2013; Mukherjee et al. 2013; López-Bucio et al. 2015; Waghunde et al. 2016; Mendoza-Mendoza et al. 2017). این قارچ‌ها به دلیل توان کنترل زیستی بیماری‌های گیاهی (Zheng et al. 2021)، تولید آنزیم‌ها و متابولیت‌های ثانویه با کاربردهای دارویی و

قارچ‌های خوراکی صورت گرفت (Danesh et al. 2001). جهت مطالعه و بررسی گونه‌های *Trichoderma*، از مناطق مختلف ایران تحقیقاتی انجام شده و گونه‌های متعددی گزارش شده است (Zafari 2003; Nazmi roudsari et al. 2007; Mehrabi et al. 2008; Koushki et al. 2008; Naeimi et al. 2010; Khalili et al. 2012; Roughanian et al. 2013; Azizi 2015; Ghasemi et al. 2017; Ghasemialitappeh et al. 2018).

با توجه به اهمیت قارچ‌های جنس *Trichoderma* و اینکه تاکنون مطالعه جامعی در ارتباط با گونه‌های *Trichoderma* در شهرستان خرم‌آباد صورت نگرفته، هدف از این تحقیق جداسازی و شناسایی گونه‌های *Trichoderma* از مناطق جنگلی این شهرستان بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی گونه‌های *Trichoderma*

نمونه‌برداری به طور تصادفی از قسمت‌های مختلف خاک مناطق جنگلی شهرستان خرم‌آباد انجام شد. بدین منظور لایه سطحی خاک کنار زده شد و تعداد ۸-۱۰ نمونه از عمق ۵-۳۰ سانتی‌متری خاک هر منطقه برداشته و با هم مخلوط، سپس مقدار ۲-۳ کیلوگرم از هر نمونه داخل کیسه پلاستیکی ریخته و پس از ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل شدند. در نهایت تعداد ۲۵۰ نمونه خاک جمع‌آوری شد. نمونه‌ها یا بلافاصله مورد استفاده قرار گرفت یا تا زمان استخراج در دمای چهار درجه سانتی‌گراد یخچال نگهداری شدند (Samuels et al. 2009; Savín-Molina et al. 2021). جهت جداسازی و بررسی خصوصیات ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی جدایه‌های *Trichoderma* از محیط کشت‌های انتخابی و عمومی مناسب از جمله محیط کشت‌های انتخابی داوه (Davet 1979) و محیط کشت‌های عمومی، PDA (Potao Dextrose Agar, Merck)، MEA (Malt Extract Agar, Germany ۴۹ گرم در یک لیتر)، CMD (Merck, Germany ۵۰ گرم در یک لیتر آب)، Cornmeal Agar (برای یک لیتر: ۳۰ گرم آرد ذرت، ۲۰ گرم دکستروز و ۲۰ گرم آگار) و SNA (Synthetic Low-Nutrient) (برای یک لیتر: ۱ گرم KH_2PO_4 ، ۱ گرم KNO_3 ، ۰/۵ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۵ گرم KCL، ۰/۲ گرم Glucose، ۰/۲ گرم Sucrose و ۲۰ گرم آگار) استفاده شد (Silva Lisboa et al. 2017).

جداسازی با روش سری رقیق‌سازی و با استفاده از محیط کشت انتخابی داوه (Davet) با اندکی تغییرات از جمله به دلیل در دسترس نبودن وینکلوزولین از فرمالین ۴۰ درصد به میزان

۱۹۹۸ بخش *Saturnisporum* را در بخش *Longibrachiatum* ادغام و بدین ترتیب تعداد بخش‌ها را به چهار بخش کاهش دادند. بعداً ثابت شد که این طبقه‌بندی یعنی تعیین حدود گونه‌ها براساس معیارهای ریخت‌شناختی برای تمایز گونه‌ها کافی نیست (Kullnig-Gradinger et al. 2002).

با ظهور تکنیک‌های مولکولی، طبقه‌بندی مبتنی بر ریخت‌شناختی *Trichoderma* مورد بررسی مجدد قرار گرفت. در سال‌های اخیر، با توسعه TrichoKEY و TrichoBlast شناسایی *Trichoderma* و *Hypocera* براساس بارکد DNA الیگونوکلوئیدی تسهیل شده است. در برنامه TrichoKEY براساس چندین مشخصه خاص جنس واقع در توالی ITS1 و ITS2 استفاده می‌شود. پایگاه داده TrichoBLAST با استفاده از ابزارهای تشخیص توالی و شباهت براساس دسته‌ای از نشانگرهای تبارزایی معمول شامل ITS1 و ITS2، Intron tef1، int4 و int5_intron tef1 می‌باشد. امروزه گونه‌ها بر اساس ترکیبی از روش‌های تبارزایی و فنوتیپی و همچنین تا حدودی داده‌های بیوجغرافیایی و اکولوژیک تشخیص داده می‌شوند (Jaklitsch & Voglmayr 2015).

طبق آخرین طبقه‌بندی، قارچ‌های جنس *Trichoderma* متعلق به شاخه Ascomycota زیرشاخه Pezizomycotina، رده Sordariomycetes، راسته Hypocreales و خانواده Hypocreaceae می‌باشند (Jaklitsch & Voglmayr 2015; Waghunde et al. 2016). گونه‌های این جنس بر اساس اطلاعات تبارزایی به ۱۷ کلاد تقسیم شده‌اند (Zhu & Zhuang 2014; Jaklitsch & Voglmayr 2015; Qin & Zhuang 2016; Cai & Druzhinina 2021; Zañfano et al. 2024; Zhao et al. 2025). در میان این کلادها، کلاد *Trichoderma* بزرگترین است. تاکنون، بیش از ۴۴۱ گونه *Trichoderma* براساس تجزیه و تحلیل ترکیبی داده‌های تبارزایی و ریخت‌شناختی توصیف شده است (Cao et al. 2022). *Hypocrea* مرحله جنسی *Trichoderma*، اولین بار توسط برادران Tulasne در سال ۱۸۶۳ توصیف شده است (Tulasne & Tulasne 1863).

در ایران تحقیقات انجام شده روی *Trichoderma* در دهه ۱۳۷۰ بیشتر در ارتباط با جنبه‌های کنترل زیستی *Trichoderma* بود. در این زمینه Bazgir et al. (1991) تاثیر تعدادی از جدایه‌های *Trichoderma* و *Gliocladium* را روی پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه لوبیا ناشی از *Rhizoctonia solani* Kuhn. مورد بررسی و مطالعه قرار دادند و تأثیر مثبت آن را در کاهش بیماری بیان کردند. اولین کار تاکسونومیک به منظور جداسازی و شناسایی گونه‌های *Trichoderma* از

مشخصات میکرومورفولوژیکی از جمله اندازه، شکل و سایر ویژگی‌های کنیدیوفورها، فیالیدها، کنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها، ریشه‌های هوایی و ریشه‌های خوابیده در محیط کشت عصاره مالت-آگار (MEA) دو درصد و قرار گرفتن در شرایط چهار روز در تناوب تاریکی/روشنایی (۱۲/۱۲) در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفتند. به منظور تعیین حداقل و حداکثر اندازه هر یک از اندام‌ها بین ۴۰-۳۰ مورد اندازه‌گیری و میانگین و کمینه و بیشینه اندازه‌ها ثبت گردید. بررسی و اندازه‌گیری خصوصیات میکرومورفولوژیکی با قرار دادن نمونه‌ها داخل یک قطره لاکتوفنل (یک قطره اسید لاکتیک ۲۵٪ به اضافه یک قطره رنگ آبی/متیلن بلو) و سپس قرار دادن یک عدد لامل روی نمونه و یا قرار دادن نمونه‌ها در یک قطره آب و مشاهده آن با استفاده از میکروسکوپ نوری مجهز به لنز Dino eye انجام شد. رشد جدایه‌ها روی محیط‌ها PDA، CMD، MEA و همچنین SNA بررسی شد (Samuels et al. 2009). تصاویر ترسیمی با استفاده از نرم‌افزار CorelDRAW Graphic Suite 2019 DRAW ترسیم شدند.

بررسی‌های مولکولی

برای این منظور، یک یا چند جدایه از هر گونه با ظاهر پرگنه و سایر خصوصیات متفاوت، انتخاب شدند و بعد از خالص‌سازی با استفاده از محیط کشت PDA تکثیر شده و DNA ژنومی جدایه‌ها با استفاده از روش CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) با اندکی تغییرات استخراج شد (Doyle 1990). جهت شناسایی مولکولی گونه‌های *Trichoderma* ناحیه ITS با استفاده از آغازگر ITS4 و ITS5 (White et al. 1990) و ناحیه‌ی ژنی *tef1-a* با جفت آغازگرهای EF1 LLerev و EF1-728F (Chaverri & Samuels 2003) واکنش زنجیره‌ای (Jaklitsch et al. 2005) تکثیر گردید. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل یک میکرولیتر از DNA (100 ng)، ۱۲/۵ میکرولیتر Master Mix2x، یک میکرولیتر آغازگر رفت (10 μM)، یک میکرولیتر آغازگر برگشت (10 μM) و نه و نیم میکرولیتر آب مقطر دیونیزه با برنامه دمایی، واسرشتگی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس سه دقیقه، واسرشتگی در ۹۵ درجه سلسیوس در ۱۵ ثانیه، جفت‌شدگی در ۵۳ درجه سلسیوس ۱۵ ثانیه، گسترش در ۷۲ درجه سلسیوس یک دقیقه و گسترش نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس پنج دقیقه با ۳۲ چرخه با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (مدل Bio Rad iCycler) انجام یک درصد با استفاده از دستگاه عکس‌برداری از ژل تحت نور

۰/۲ میلی‌لیتر در لیتر انجام شد: محیط کشت داوه شامل ۱ گرم $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ، ۱ گرم $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ، ۲ گرم Sucrose، ۲۵۰ میلی‌گرم KNO_3 ، ۲۵۰ میلی‌گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۵۰ میلی‌گرم Citric acid، ۱۲۵ میلی‌گرم KH_2PO_4 ، ۲۰ گرم Agar، ۰/۵ میلی‌لیتر آلایل الکل، ۲/۵ میلی‌گرم وینکلوزولین، ۳۰ میلی‌گرم سولفات استرپتومایسین و ۱ لیتر آب مقطر استریل می‌باشد. همه اجزای این محیط به استثنای آلایل الکل، فرمالین و سولفات استرپتومایسین در ۴۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به طور کامل حل و با آب مقطر به حجم ۱ لیتر رسانده شد. سپس در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو به مدت ۲۰ دقیقه استریل گردید. زمانی که دمای محیط کشت به حدود ۴۵-۵۰ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت آلایل الکل، فرمالین و سولفات استرپتومایسین اضافه و در نهایت تقریباً ۲۰ میلی‌لیتر از آن در هر تشتک پتری ۹ سانتی‌متری ریخته شد. سپس در ادامه ۱۰ گرم از هر نمونه خاک به ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت زمان ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک در ۹ میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد تا رقت اول (۱۰۱) حاصل شود و سپس به همین ترتیب رقت‌های بعدی (۱۰۲، ۱۰۳، ۱۰۴ و ۱۰۵) تهیه شد. یک میلی‌لیتر از هر رقت به سطح تشتک‌های پتری حاوی محیط اختصاصی داوه منتقل شد و برای هر رقت سه تکرار در نظر گرفته شد. علاوه بر این، از توده‌های کوچک و متراکم خاک نیز به طور مستقیم روی محیط کشت‌های انتخابی قرار گرفت. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در تناوب روشنایی/تاریکی ۱۲/۱۲ نگهداری شدند. پس از گذشت چهار الی پنج روز حاشیه پرگنه میسلیم‌های رشد کرده به محیط کشت جدید منتقل و به روش تک اسپور خالص‌سازی صورت گرفت.

بررسی‌ها و مشاهدات ریخت‌شناختی *Trichoderma*

مشاهده و مقایسه ویژگی‌های ریخت‌شناختی و ریخت‌سنجی جدایه‌های *Trichoderma* به صورت ماکروسکوپی و میکروسکوپی انجام گرفت. جهت بررسی و شناسایی جدایه‌ها در سطح گونه تمامی ویژگی‌های مطرح شده در کلیدها، کتاب‌ها و سایت‌های معتبر مربوط به جنس *Trichoderma* از جمله ویژگی‌های ماکروسکوپی پرگنه‌ها شامل رنگ پشت و روی پرگنه، الگوی رشدی، سرعت رشد، بوی پرگنه، نحوه کنیدیوم‌زایی (به صورت پراکنده، دسته‌ای و جوش مانند) و شد (Cai & Druzhinina 2021). محصول PCR روی ژل آگارز

نتایج و بحث

در این تحقیق طی فصول مختلف سال‌های ۱۳۹۸-۱۳۹۹ از خاک مناطق جنگلی شهرستان خرم‌آباد به طور کلی ۲۰۰ جدایه *Trichoderma* به دست آمد. جدایه‌ها با کدهای LT1 تا LT200 کدگذاری شدند. از ۲۰۰ جدایه به دست آمده در مجموع ۱۲۰ جدایه متعلق به بخش *Trichoderma*، ۴۰ جدایه متعلق به بخش *Longibrachiatum* و ۴۰ جدایه متعلق به بخش *Pachybasium* بودند. از کل ۲۰۰ جدایه، ۴۰ جدایه براساس ترکیب ویژگی‌های ریخت‌شناختی و آنالیز تبارزایی ناحیه ITS و ژن *tef1-a* شناسایی شد که این جدایه‌ها متعلق به ۱۳ گونه بودند. از بین گونه‌های شناسایی شده گونه *T. harzianum* بیش‌ترین فراوانی را به خود اختصاص داد. گونه‌های جداسازی شده مربوط به کلاد *Harzianum* در مقاله Mirzaei-pour et al. (2023a) شرح داده شده است. اطلاعات مربوط به جدایه‌های *Trichoderma* در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. فهرست جدایه‌های شناسایی شده از مناطق جنگلی شهرستان خرم‌آباد به همراه کد دسترسی جدایه‌های *Trichoderma* و کد دستیابی بانک ژن.

Table 1. The list of isolates identified from the forest areas of the Khorramabad County along with the accession code of *Trichoderma* isolates and the accession code of gene bank.

Isolates	GenBank accession number		<i>Trichoderma</i> species
	<i>tef1-a</i>	ITS	
LT7	OQ702628	OR103279	<i>Trichoderma atroviride</i>
LT9	OQ525911	OQ469480	<i>Trichoderma virens</i>
LT11	PQ072332	OQ421448	<i>Trichoderma viridescens</i>
LT20	OQ525910	OR121528	<i>Trichoderma</i> sp.
LT35	OQ504829	OQ469493	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
LT38	OQ848749	OQ469323	<i>Trichoderma</i> sp.
LT103	OQ702634	OR551442	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>
LT110	PQ072329	PQ057007	<i>Trichoderma virens</i>
LT134	OQ702637	OQ469486	<i>Trichoderma brevicompactum</i>
LT163	PQ072330	OR551452	<i>Trichoderma citrinoviride</i>
LT190	PQ072331	OR551453	<i>Trichoderma citrinoviride</i>
LT197	OQ702646	PQ057013	<i>Trichoderma virens</i>
LT200	OR554886	OQ469772	<i>Trichoderma citrinoviride</i>

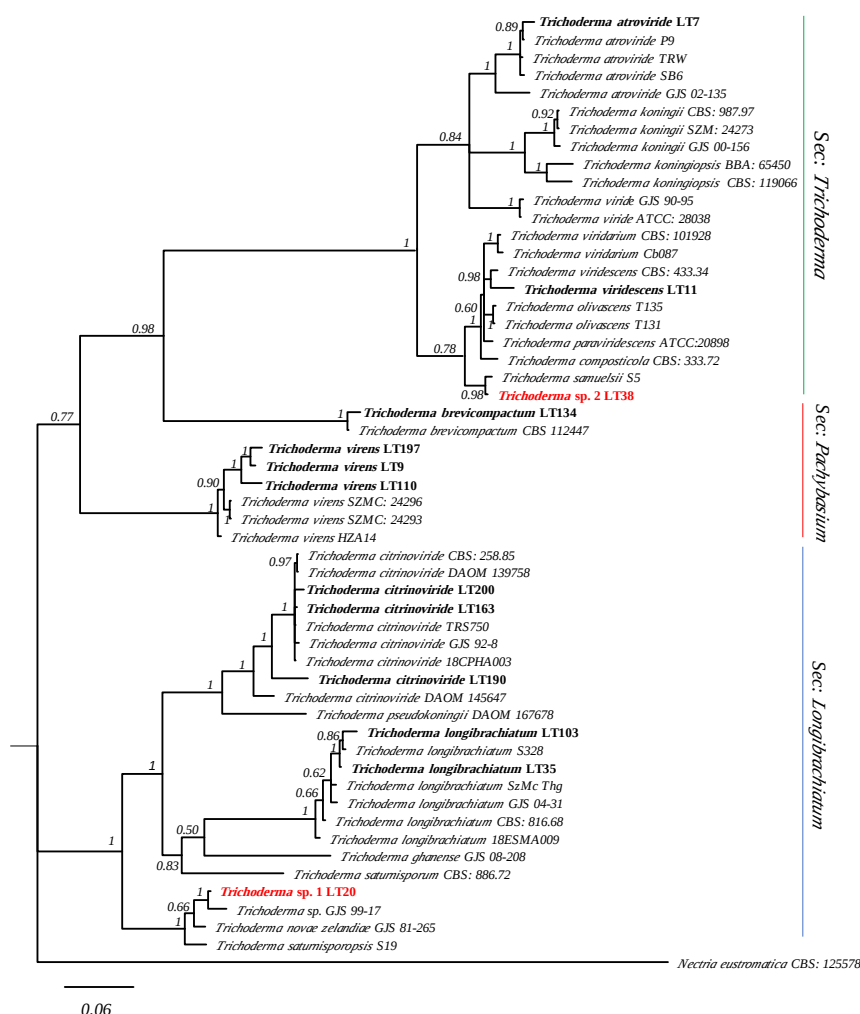
الگوی منحصر بفرد (مرزهای ژن، ITS: 1-631 و *tef1-a*: 632-1330) بود. بر اساس نتایج نرم‌افزار مدل تست، مدل F81+G بهترین مدل جایگزینی برای ناحیه ITS و مدل GTR+I+G بهترین مدل جایگزینی برای ناحیه ژنی *tef1-a* بود. *Necteria* (CBS 125578) به عنوان گروه خارجی انتخاب و *tef1-a* تعداد شش گونه شناخته شده و دو گونه ناشناخته (تحت نام‌های *Trichoderma* sp.1 و *Trichoderma* sp.2) را شناسایی نمود (شکل ۱). شناسایی جدایه‌ها براساس خصوصیات

ماورابنفش مورد بررسی قرار گرفت، و جهت توالی‌یابی به شرکت کدون ژنتیک ارسال شدند. فایل‌های توالی خام توسط نرم‌افزار SeqMan (DNASTAR, Madison, WI, USA) بررسی و ویرایش شدند. سپس با استفاده از نرم‌افزار برخط بلاست (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) با توالی‌های موجود در بانک ژن مورد مقایسه قرار گرفتند. برای هر دو ناحیه، توالی‌هایی با درصد مشابهت بالا از جمله استرین‌های مرجع (استرین‌های تیپ) از بانک ژن دریافت شد. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MAFFT v. 7 زیر هم چینی شدند (Katoh et al. 2019). سپس نرم‌افزار Mr modeltest v.2.2 برای تخمین بهترین مدل تکاملی مناسب برای هر ژن استفاده شد (Darriba et al. 2012). تلفیق داده‌های ITS و *tef1-a* با استفاده از نرم‌افزار Mesquite رج‌بندی شدند. تجزیه و تحلیل بیژین در MrBayes v3.2.2 انجام شد (Ronquist & Huelsenbeck 2003). در نهایت مشاهده تبارنما با استفاده از نرم‌افزار FigTree v1.4.3 صورت گرفت.

بررسی فیلوژنتیک جدایه‌های *Trichoderma* تبارنما با استفاده از روش بیژین برای ناحیه ITS و ناحیه ژنی *tef1-a* حاصل از این تحقیق و دیگر توالی‌های موجود برای گونه‌های مختلف جنس *Trichoderma* ترسیم گردید. فایل رج‌بندی شده نهایی شامل ۵۴ ارایه و ۱۳۳۰ کاراکتر و ۷۱۳ شد. بر اساس نتایج به دست آمده جدایه‌های مورد مطالعه با اعتبارسنجی بالایی همراه با جدایه‌های اخذ شده از بانک ژن گروه‌بندی شدند. تبارنمای حاصل از ترکیب توالی‌های ناحیه ITS

نشان داد که شناسایی تعدادی از گونه‌ها تنها براساس خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی امکان پذیر نبوده و منجر به تشخیص اشتباه شده است.

ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی و مشاهدات میکروسکوپی به تنهایی جهت شناسایی معتبر گونه‌ها ناکافی بود، زیرا مقایسه نتایج بررسی‌های ریخت‌شناسی با نتایج حاصل از مطالعات مولکولی



شکل ۱. تبارنمای ترسیم شده مربوط به جدایه‌های *Trichoderma* بر اساس تلفیق توالی‌های ITS و *tef1-α* به روش بیژین. آرایه‌های بولد شده مربوط به جدایه‌های این مطالعه است. مقیاس ۰/۰۶ تغییر مورد انتظار را در هر مکان مشخص می‌کند. تبارنما با استفاده از *Nectria eustromatica* (CBS 125578) ریشه‌دار شده است.

Figure 1. Phylogenetic tree constructed for *Trichoderma* isolates based on combination of ITS and *tef1-α* sequences by Bayesian method. The isolates in this study are indicated with bold. The scale bar shows 0.06 expected changes per site. The tree was rooted with *Nectria eustromatica* (CBS 125578).

به‌طور مؤثر تشخیص دهد. مطالعات قبلی نشان داده‌اند که صفات فنوتیپی ثابت نیستند و تحت تأثیر شرایط کشت و همچنین تولید متابولیت ثانویه قرار می‌گیرند (Mazrou et al. 2020) و به ویژه در تشخیص *Trichoderma*، اغلب می‌توانند گمراه کننده باشند. جدایه‌های منتخب به دست آمده در این مطالعه ابتدا براساس نواحی ITS مورد مطالعه قرار گرفتند. آنالیز توالی‌های به دست آمده از جدایه‌های مورد مطالعه نشان داد که طول کل نواحی ITS در جدایه‌های منتخب از مناطق جغرافیایی مختلف شهرستان خرم‌آباد و گونه‌های اخذ شده از بانک ژن، مورد بررسی

در این مطالعه، مشخص شد که تشخیص گونه‌های *Trichoderma*، به‌ویژه برای مجموعه گونه‌ها تنها بر اساس ویژگی‌های فنوتیپی دشوار است. برای تعیین دقیق محل قرارگیری گونه‌ها و همچنین شناسایی گونه‌های مبهم باید آنالیزهای فیلوژنتیکی انجام شود. در این مطالعه جهت شناسایی نهایی گونه‌ها از ترکیب ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ریخت‌سنجی و همچنین آنالیز فیلوژنتیکی ناحیه ITS و ناحیه ژنی *tef1-α* استفاده شد. زیرا مطالعه ویژگی‌های میکرومورفولوژیکی و کشت نمی‌توانست برخی از جدایه‌های *Trichoderma* را تا سطح گونه

نتایج این بررسی‌ها کارآمدی مطالعات فیلوژنتیک بر اساس تجزیه و تحلیل توالی‌های ITS و جایگاه ژنی *tef1-a* را در مطالعه و شناسایی مولکولی *Trichoderma spp.* تأیید کرد. بدیهی است که به کارهای بیشتری نیاز است، و درک جامع این جنس مهم بر اساس ترکیبی از ویژگی‌های فنوتیپی و فیلوژنتیک با استفاده از سایر ژن‌ها جهت استنباط فیلوژنی تاکسون‌ها در تمام سطوح و همچنین تا حدودی داده‌های بیوجغرافیایی و اکولوژیک می‌باشد.

تاکسونومی

بخش *Longibrachiatum*: در این تحقیق بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی و مولکولی سه گونه شامل گونه‌های *T. Trichoderma sp. 2*، *T. longibrachiatum*، *citrinoviride* از این بخش شناسایی گردید.

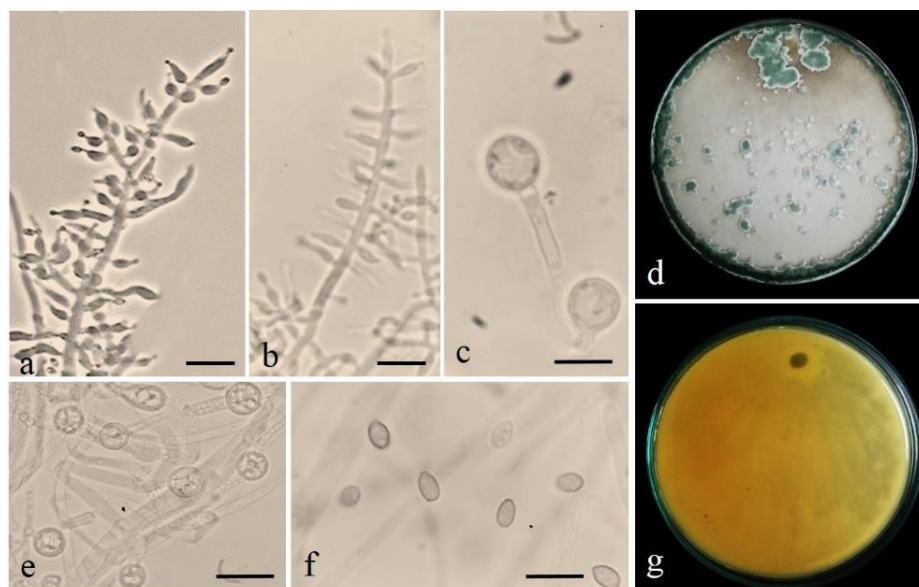
Trichoderma longibrachiatum Rifai, Mycol. Pap. 116:42 (1969).

(شکل ۲)

رشد پرگنه در اکثر جدایه‌های مورد بررسی بسیار سریع بود، به طوریکه بعد از ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تشک‌های پتری ۹ سانتی‌متری حاوی محیط PDA را به طور کامل پوشش دادند. رنگ پرگنه سبز تیره و سطح زیرین پرگنه معمولاً زرد مایل به سبز بود. کنیدیوم‌زایی در این گونه سریع و روی محیط کشت PDA بعد از ۲۴ ساعت شروع شد. کنیدیوم‌زایی به صورت پراکنده یا گاهی مجتمع بوده و به رنگ سبز دیده شد. گاهی توده‌های کنیدیومی خال‌مانند (Flecks) و سفید رنگ در سطح پرگنه ظاهر می‌شد به طوری که پرگنه‌ها حالتی شبیه گل‌سنگ می‌گرفت. فیا‌لیدها غالباً به صورت منفرد در قسمت انتهایی محور اصلی کنیدیوفور، شاخه‌های فرعی اولیه و یا در انتهای یک شاخه فرعی ثانویه کوتاه دیده شدند، گاهی به صورت دسته‌های ۲-۳ تایی و فراهم روی کنیدیوفور تشکیل شدند. فیا‌لیدها اکثراً باریک تا سیلندری، خمیده تا مستقیم، به ابعاد $۲/۲-۳/۲ \times ۶/۸-۹/۵$ میکرومتر، ولی فیا‌لیدهای انتهایی طول‌تر و فیا‌لیدهای میانی نیز در این گونه مشاهده شد. کنیدیوم‌ها کشیده تا بیضی، به رنگ سبز روشن بوده و دیواره صاف به ابعاد $۲/۹-۲/۲ \times ۳-۵$ میکرومتر تشکیل شدند. جدایه‌ها با کدهای LT35 و LT103 مربوط به این گونه می‌باشند. این گونه از ریزوسفر درختان بلوط، زالزالک وحشی و گون جداسازی شد.

در این مطالعه از ۵۰۰ تا ۶۰۰ جفت باز متغیر بود. تفاوت در طول و توالی نواحی ITS در تعدادی از جدایه‌ها قابل توجه بود و در تفکیک و شناسایی تعدادی از گونه‌ها کمک فراوانی نمودند. ولی به هر حال تجزیه و تحلیل ترکیبی توالی‌های ITS و *tef1-a* برای شناسایی گونه‌ها سودمندتر است (Hermosa et al. 2004). زیرا که تجزیه و تحلیل توالی منفرد مانند ITS نیز برای شناسایی مولکولی گونه‌های نزدیک به هم کافی نیست (Saba et al. 2020; Inglis et al. 2012). طبق مطالعات قبلی تجزیه و تحلیل مبتنی بر توالی‌های ITS قادر به تشخیص برخی گونه‌های نزدیک در مجموعه گونه‌های *Trichoderma* مانند *T. harzianum* و یا *T. longibrachiatum* نیست (Feitosa et al. 2019). یافته‌های مشابه روی سایر قارچ‌ها ثابت کرد که ITS نشانگر ژنی مناسبی برای تمایز بین اعضای جنس‌های *Aspergillus* Micheli، *Penicillium* Link، *Fusarium* Link، *Cladosporium* Link و *Trichoderma* نیست، زیرا این گونه‌ها دارای اختلاف بارکد کمی در مناطق ITS خود هستند (Schoch et al. 2012; Raja et al. 2017). همچنین گزارش شده که حدود ۲۷ درصد از تمام توالی‌های ITS قارچی از بانک ژن با شناسایی طبقه‌بندی ناکافی ارسال شده‌اند و ۲۰ درصد از توالی‌های قارچی در این پایگاه ممکن است به اشتباه نامگذاری شده باشند (Vilgalys 2003; Bridge et al. 2003).

نتایج پژوهش Jaklitsch et al. (2012) نشان دادند که ناحیه ژنی *tef1-a* وضوح بالایی برای جنس *Trichoderma* ارائه می‌دهد و برتر از سایر نشانگرهای فیلوژنتیک است. این مطالعه تأیید می‌کند که توالی‌یابی *tef1-a* به طور قابل توجهی مفیدتر از ITS برای تعیین گونه‌ها در *Trichoderma* می‌باشد. گزارش شده که ترکیب توالی‌های چند جایگاهی بر اساس تجزیه و تحلیل درختان فیلوژنتیک، توزیع بهتری از گونه‌های *Trichoderma* می‌دهد (Fanelli et al. 2019). تجزیه و تحلیل توالی‌های *ITS+tef1-a* به این محققین اجازه داد تا *T. harzianum* ITEM 908 را به عنوان *T. atrobrunneum*، گونه جدیدی که با *T. afroharzianum* و *T. guizhouense* از مجموعه *T. harzianum* تقسیم می‌شد، مجدداً طبقه‌بندی کنند (Jaklitsch et al. 2012). سایر کارهای قبلی مشاهدات مشابهی را گزارش کردند (Saravanakumar et al. 2020). نتایج این مطالعه نیز نشان داد که آنالیزهای فیلوژنتیکی *tef1-a* و ترکیب *ITS + tef1-a* برای ارائه یک شناسایی قطعی‌تر در کلاد *Longibrachiatum* جایی که اعضای این کلاد از نظر فنوتیپی و ژنوتیپی بسیار مشابه بودند، مناسب بود.



شکل ۲. *Trichoderma longibrachiatum*. فرم غیر جنسی و کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد؛ d. سطح پرگنه، g. پشت پرگنه روی محیط PDA. a-b. کنیدیوفورها و فیالیدها، c-e. کلامیدوسپورها، f. کنیدیومها. شاخص‌ها: ۱۰ میکرومتر.

Figure 2. *Trichoderma longibrachiatum*. Asexual morph and culture at 25 °C. d. Colony surface, g. Colony reverse on PDA media, a-b. Conidiophores and phialides, c-e. Chlamydospores, f. Conidia. Scale bars: 10 µm.

آبی تغییر پیدا می‌کرد، مشاهده شد. کنیدیوفورها نسبتاً بلند، انشعابات معمولاً نامنظم و به ندرت به صورت جفتی و متناوب مشاهده شد. محور اصلی کنیدیوفور تا نوک زایا بوده و فیالیدها تنگی شکل تا آمپولی شکل و به صورت دسته‌های ۲-۳ تایی و یا جفتی و گاهی تکی به صورت یک در میان و حتی نامنظم روی کنیدیوفور مشاهده شد. ابعاد فیالیدها $2/7-3/2 \times 5-8/8$ میکرومتر، کنیدیومها سبز رنگ کشیده تا بیضی نسبتاً منظم و ابعاد آنها $2-2/5 \times 3/5-4/6$ میکرومتر بودند. جدایه‌ها با کدهای LT163، LT190 و LT200 مربوط به این گونه می‌باشند. این گونه از ریزوسفر بلوط جداسازی شد.

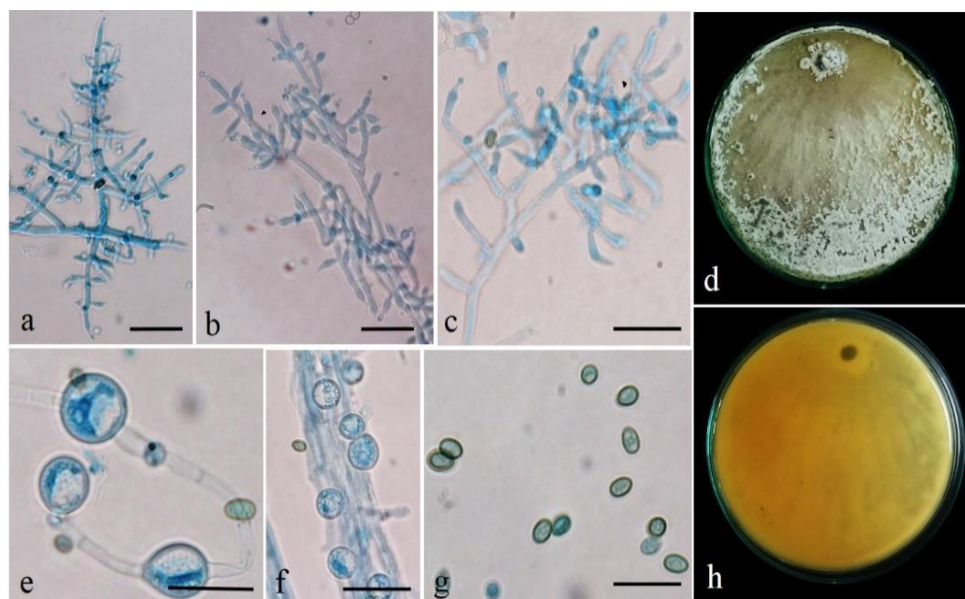
این گونه توسط (Danesh et al. 2000) در ایران از قارچ خوراکی جداسازی و شناسایی شد. همچنین (Zafari 2003) تعداد زیادی از جدایه‌های این گونه را از مناطق مختلف ایران جداسازی و شناسایی نمودند. وجود این گونه در مناطق مختلف بیانگر این است که این گونه با شرایط آب و هوایی مختلف سازگاری دارد. تشخیص این گونه از سایر گونه‌های بخش *Longibrachiatum* با داشتن کنیدیوفورهای دارای شاخه‌های فرعی بیشتر و همچنین دسته‌های سه‌تایی فیالیدها به راحتی امکان‌پذیر است. این گونه در نقاط مختلف دنیا از خاک، چوب و قارچ گزارش شده است (Samuels et al. 2012). این گونه قادر به رشد و اسپورزایی در دمای بدن انسان است (Samuels et al. 2012).

گونه *T. longibrachiatum* در بین گونه‌های مربوط به این بخش بیشترین فراوانی را داشت. این گونه با داشتن کنیدیوفور تیپیک بخش *Longibrachiatum* از گونه‌های سایر بخش‌ها و با میزان رشد روی محیط کشت PDA در دماهای ۳۰ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد، اندازه کنیدیومها و بی‌رنگ ماندن سطح زیرین پرگنه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد از سایر گونه‌های بخش خود قابل تشخیص است (Inglis et al. 2020; Mirzaei pour et al. 2023b). این گونه از مناطق مختلف ایران گزارش شده است (Zafari 2003; Hosseini pour 2014; Azizi 2015; Ghasemi 2017; Ghasemialitppeh et al. 2018; Younesi 2021).

Trichoderma citrinoviride Bissett, Can. J. Bot. 62: 926. 1984.

(شکل ۳)

جدایه‌های این گونه سریع‌الرشد بوده به طوریکه بعد از ۴۸ ساعت سطح محیط PDA را به طور کامل پوشش دادند. ریشه‌های هوایی کم یا اصلاً تولید نشد. رنگ پرگنه روی این محیط سبز مایل به زرد بود. سطح زیرین پرگنه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد کمی زرد و با افزایش دما زردتر شد. کنیدیومزایی کم و بیش متحدالمرکز یا متمرکز در نزدیکی حاشیه، کنیدیومزایی گاهی به هم پیوسته و تولید بالشتک‌های بزرگی که ابتدا سفید و به مرور به رنگ سبز تیره یا سبز مایل به



شکل ۳. *Trichoderma citrinoviride*. فرم غیر جنسی و کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. **d**. سطح پرگنه، **h**. پشت پرگنه روی محیط PDA، **a-c**. کنیدیوفورها و فیالیدها، **e-f**. کلامیدوسپورها، **g**. کنیدیوم‌ها. شاخص‌ها: ۱۰ میکرومتر.

Figure 3. A, *Trichoderma citrinoviride*. A, Asexual morph and culture at 25 °C. (d) Colony surface, (h) Colony reverse on PDA media, (a-c) Conidiophores, (e and f) Chlamydospores, (g) Conidia. Scale bars: 10μm B, Drawings of *T. citrinoviride*.

متغیر بود. کلامیدوسپور تقریباً به شکل کروی به صورت بین ریشه‌ای و انتهایی به ابعاد $۱۰/۴-۵/۴ \times ۱۳/۹-۵/۵$ میکرومتر تشکیل شد. کد LT20 مربوط به این جدایه می‌باشد.

جدایه LT20 جدایه متفاوتی بود که از این بخش در این مطالعه شناسایی شد. این جدایه از نظر ریخت‌شناختی و مطالعات مولکولی توالی‌های ITS و ژن *tef1-a* بیشترین شباهت را به گونه‌های *T. novae-zelandiae* و *T. saturnisporopsis* داشت. از اولی با داشتن اسپور بزرگ‌تر ($۵/۷-۱۴ \times ۳-۵$ میکرومتر در مقابل $۳/۷-۶ \times ۲/۵-۴/۵$ میکرومتر)، شکل کنیدیوفور و همچنین شکل فیالید که در گونه‌ی مورد مطالعه بیشتر به صورت آمپولی شکل با گردن باریک و بلند و در گونه *T. saturnisporopsis* بیشتر به صورت کوزه‌ای شکل می‌باشد و تعدا زوائد اسپور، که در جدایه مورد بررسی کمتر می‌باشد قابل تفکیک است قابل تفکیک است. از گونه *T. novae-zelandiae* از نظر شکل کنیدیوفور و فیالید و همچنین عدم وجود زوائد بال‌مانند در کنیدیوم گونه *T. novae-zelandiae* متفاوت می‌باشد (Samuels et al. 2012). همچنین این جدایه ارتباط فیلوژنتیکی بسیار قوی (۹۹ درصد) با جدایه استاندارد *Trichoderma* sp. GJS-9917 اخذ شده از بانک ژن داشت که موقعیت تاکسونومیکی آن و همچنین ویژگی‌های ریخت‌سنجی و ریخت‌شناسی آن نامشخص است. لذا با بررسی‌های بیشتر می‌تواند کاندیدای گونه جدیدی برای قارچ‌های جهان باشد. این جدایه از ریزوسفر درخت بلوط از

Trichoderma sp. 2

(شکل ۴)

شعاع پرگنه روی محیط PDA بعد از ۷۲ ساعت در تاریکی در دماهای ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتی‌گراد به ترتیب به ۲۱، ۴۰، ۵۰، ۵۵ و ۳۵ میلی‌متر بود. در این شرایط ریشه هوایی تولید نشد و کنیدیوم‌زایی در شرایط نور به مقدار زیاد در دسته‌های کنیدیومی تولید شد. این دسته‌ها ابتدا سفید و به مرور به رنگ سبز مایل به آبی و سپس سبز تیره تغییر پیدا کردند. کنیدیوم‌زایی روی محیط کشت PDA به صورت یکنواخت و پراکنده در تمام سطح پرگنه و به رنگ سبز تیره ظاهر شد. در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد کنیدیوم‌زایی زیاد بود. در ۲۵ درجه سانتی‌گراد تولید ریشه‌های هوایی پنبه‌ای شکل نمود. سطح زیرین پرگنه به رنگ سبز مایل به زرد کم رنگ مشاهده شد. بوی خاصی از پرگنه متصاعد نشد. کنیدیوفورها بلند، معمولاً خمیده، انشعابات نامنظم و تاحدودی متمایل به سمت نوک کنیدیوفور مشاهده شد. فیالیدها گاهی به صورت متراکم و معمولاً به صورت آمپولی و کوزه‌ای شکل مستقیم تا خمیده با انتهای باریک به ابعاد $۲/۵-۵ \times ۶/۶-۱۵$ میکرومتر، کنیدیوم سیلندری تا مستطیلی، سبز رنگ به ابعاد $۳-۵ \times ۵/۸-۱۴$ میکرومتر، کنیدیوم‌ها دارای زوائد بال‌مانند، این زوائد با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی $۱۰۰ \times$ شیئی (۱۰۰۰ برابر) به وضوح قابل رویت بود. تعداد، اندازه و محل قرار گرفتن زوائد

میکروسکوپ الکترونی وجود زگیل روی کنیدیوم نشان داده شده است (Bissett 1991a). خصوصیات ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی ارائه شده با توصیف سایر محققین مطابقت دارد (Gams & Bissett 2002; Samuels et al. 2009; Zafari 2003; Naeimi et al. 2010). این گونه شباهت زیادی به *T. crassum* دارد. هر دو گونه دارای کنیدیوفورهای پهن و با انشعابات نامنظم می‌باشند. ولی کنیدیوفورها در *T. crassum* انشعابات پیچیده‌تری دارد و اغلب دارای یک طول شدگی انتهایی عقیم (Sterile elongation) می‌باشند که در *T. virens* وجود ندارد (Gams & Bissett 2002). در ایران این گونه ابتدا به نام *Gliocladium virens* در بررسی‌های بیوکنترلی از خاک‌های ایران جداسازی و شناسایی شد (Bazgir et al. 1991). تعداد ۵۷ جدایه از این گونه توسط Zafari (2003) از نمونه خاک‌های مناطق مختلف ایران گزارش شده است. این گونه بعد از *T. harzianum* بیشترین فراوانی را به خود اختصاص داد. *Trichoderma virens* به عنوان یک عامل بیوکنترل در کنترل بسیاری از بیمارگرهای گیاهی موثر می‌باشد. (Howell et al. 2000).

Trichoderma brevicompactum Kraus, Kubicek & Gams, Mycol. Pap. 96(5):1057. 2004.

(شکل ۶)

در جدایه‌های متعلق به این گونه پرگنه روی محیط کشت PDA رشد سریعی داشت به طوری که پس از ۹۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سطح تشک پتری را به طور کامل پوشش دادند. کنیدیوم‌زایی به میزان زیاد، یکنواخت و در دسته‌های جوش مانند معمولاً به صورت بافت متراکم و پرپشت مشاهده شد. رنگ پرگنه از سبز زیتونی تا سبز متمایل به آبی یا خاکستری متمایل به زیتونی متغیر بود. کنیدیوفورها با انشعابات پیرامونی هرمی شکل و در کشت‌های تازه زواید نازا و کوتاه مشخصی قابل مشاهده بود، فیالیدها در دسته‌های ۵-۲ تایی اغلب آمپولی شکل و با گردن باریک کوتاه به ابعاد $4/7-7/7 \times 2/4-3/5$ میکرومتر بودند. وجود فیالیدهای آمپولی شکل کوتاه و همچنین پهن، ظاهر فشرده و متراکمی را به ساختارهای کنیدیوفور می‌دهند. کنیدیوم‌ها نیم‌کروی و یا در برخی از جدایه‌ها بیضی کوتاه، ابعاد آن‌ها $2/4-3/2 \times 2/8-4/7$ میکرومتر با دیواره صاف، به رنگ سبز متمایل به خاکستری روشن مشاهده شدند. جدایه با کد LT134 مربوط به این گونه می‌باشد. این گونه از ریزوسفر بلوط جداسازی شد.

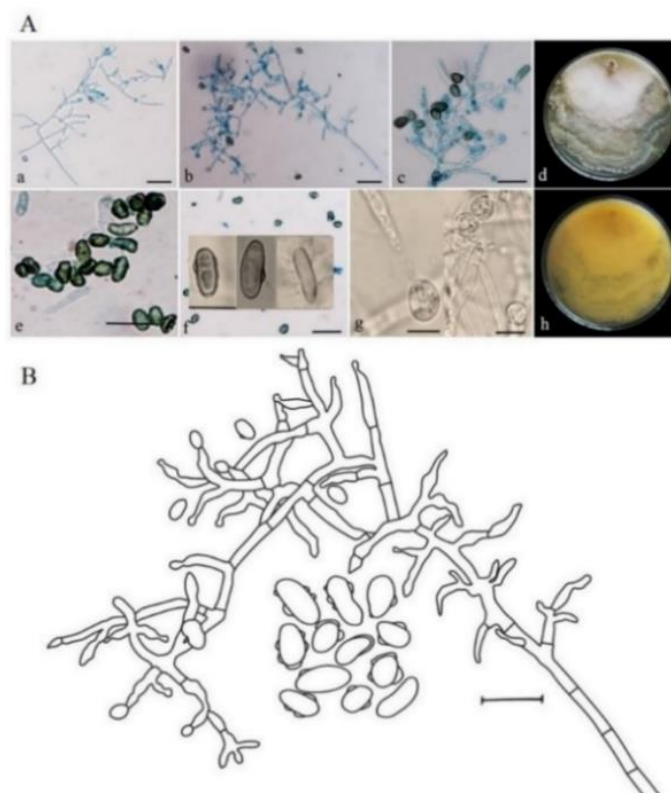
شهرستان خرم‌آباد جداسازی و شناسایی شد. بخش *Pachybasium*: در این مطالعه تعداد دو گونه بر اساس مطالعات ریخت‌شناختی و مولکولی شامل گونه‌های *T. virens* و *T. brevicompactum* از این بخش جدا گردید.

Trichoderma virens (J. Miller, Giddens & Foster) von Arx, Beih. Nova Hedwigia 87:288. 1987.

(شکل ۵)

پرگنه‌ها سریع‌الرشد و پس از ۷۲ ساعت سطح تشک پتری را کاملاً پوشش دادند. رشد میسلیم‌ها به صورت چمنی بوده. کنیدیوم‌زایی به صورت پراکنده در تمام سطح محیط کشت و یا به صورت جوش‌های پراکنده نزدیک حاشیه محیط کشت صورت مشاهده شد. رنگ پرگنه بعد از اسپورزایی ابتدا سبز و به تدریج سبز تیره مشاهده شد. سطح زیرین پرگنه ابتدا زرد و به مرور به زرد کهربایی تغییر رنگ پیدا کرد. کنیدیوفورها معمولاً در قسمت پایه کنیدیوفور نازا و غیر منشعب، اما به طرف نوک کنیدیوفور، شاخه‌ها به طور نامنظم منشعب شده و هر کدام به یک حلقه ۳-۶ تایی از فیالیدها منتهی می‌شوند. انشعابات معمولاً به سمت محور اصلی متمایل و نوک کنیدیوفورها فاقد قسمت نازا بود. فیالیدها به صورت خوشه‌ای همگرا، تنگی شکل تا آمپولی شکل و به ابعاد $2/7-4/7 \times 2/5-11/4$ میکرومتر تشکیل شدند. کنیدیوم‌ها بیضوی شکل تا تخم‌مرغی سبز رنگ به ابعاد $4/9-2/9 \times 3/6-6/4$ میکرومتر، گاهی کنیدیوم‌های حاصل از فیالیدهای همجوار به هم پیوسته و یک توده کروی تشکیل می‌دهند. این گونه با داشتن فیالیدهای همگرا و همچنین کنیدیوم‌های بزرگ و سبز رنگ به راحتی قابل تشخیص می‌باشد. جدایه‌ها با کدهای LT9، LT110 و LT197 مربوط به این گونه می‌باشند. این گونه از ریزوسفر درختان بلوط و زالزالک مناطق مختلف شهرستان خرم‌آباد جداسازی شد.

این گونه از نظر الگوی انشعاب کنیدیوفورها تقریباً شبیه *Gliocladium* هستند. یعنی به صورت همگرا در یک حالت Penicillate قرار دارند. این گونه ابتدا تحت نام *Gliocladium virens* معرفی شد (Miller et al. 1957). ولی علیرغم تفاوت قابل ملاحظه کنیدیوفور و متفاوت بودن آن با سایر گونه‌های *Trichoderma*، بر اساس فرم جنسی آن به جنس *Trichoderma* منتقل شد (Bissett 1991a). در بررسی‌های میکروسکوپی کنیدیوم‌های این گونه زوائد بسیار ریزی مشاهده شد که خیلی واضح نبود. در مطالعه ویژگی‌های این گونه با استفاده از



شکل ۴. *Trichoderma* sp. 2. A. فرم غیر جنسی و کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. d. سطح پرگنه، h. پشت پرگنه روی محیط PDA، a-c. کنیدیوفورها و فیالیدها، e-f. کنیدیوم‌ها، g. کلامیدوسپور. شاخص‌ها: ۱۰ میکرومتر. B. تصاویر ترسیمی *Trichoderma* sp. 2.

Figure 4. *Trichoderma* sp. 2. A. Asexual morph and culture at 25 °C. d. Colony surface, h. colony reverse on PDA media, Cultures after 7 d on PDA, a-c. Conidiophores, e-f. Chlamydospores, g. Conidia. Scale bars: 10µm B. Drawings of *Trichoderma* sp. 2.

Trichoderma sp.1 و *viridescens* جداسازی و شناسایی شد. *Trichoderma atroviride* P.Karsten, Finl. Mögelsvamper p. 21 = Bidr. Känned. Finl. Natur Folk 51:363. 1892.

(شکل ۷)

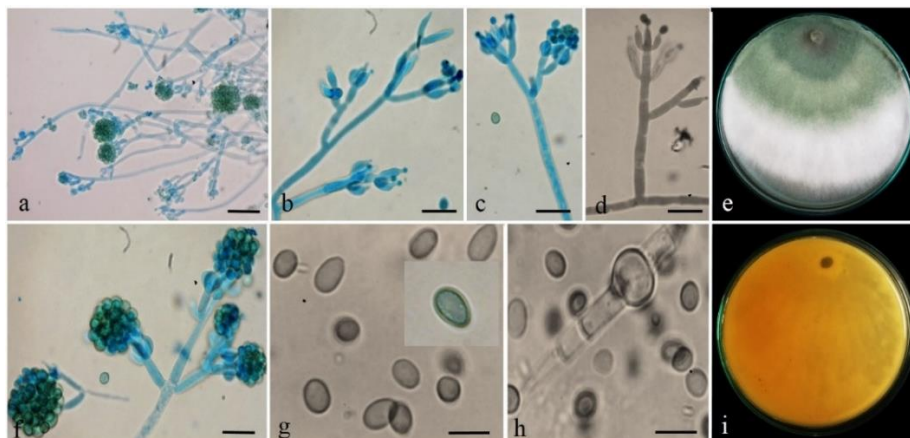
جدایه‌های مربوط به این گونه نسبتاً سریع‌الرشد بودند، به طوریکه ظروف تشک پتری حاوی محیط کشت PDA، CMD و MEA را بعد از ۷۲ ساعت و ظروف تشک پتری حاوی محیط SNA را بعد از ۹۶ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به طور کامل پوشش دادند. در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد رشدی مشاهده نشد. پرگنه به شکل دواير متحدالمرکز و کنیدیوم‌زایی معمولاً به صورت یکنواخت و پیوسته در سطح محیط مشاهده شد. تجمعات حاصل از جوش‌ها ظاهری سفید به این محدوده می‌دهند که به مرور با افزایش سن پرگنه به رنگ سبز تیره و سبز مایل به زرد تغییر پیدا کردند. رنگ پرگنه از پشت تشک پتری بی‌رنگ به تدریج به زرد کم رنگ تغییر پیدا کرد. از پرگنه‌های مربوط به جدایه‌های این گونه به شدت بویی شبیه بوی نارگیل متصاعد می‌شد. کنیدیوفورها درختچه‌ای و قابل انعطاف، زاویه انشعاب شاخه فرعی نسبت به محور اصلی حدود

این گونه تشابه زیادی به *T. arundinaceum* دارد. در کنیدیوفورهای این گونه یک طویل‌شدگی انتهایی عقیم تشکیل می‌شود که در *T. brevicompactum* تشکیل نمی‌شود (Bissett 1991b). در ایران این گونه قبلاً از نقاط مختلف از جمله در همدان از فرا ریشه درختان گردو گزارش شده است (Karimi 2005). این اولین گزارش از وجود این گونه در شهرستان خرم‌آباد می‌باشد. مطالعات و گزارشات علمی نشان می‌دهد که این گونه یکی از گونه‌های موفق در کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی مختلف می‌باشد. بر اساس مطالعات قبلی به نظر می‌رسد که فراوانی این گونه در مناطق غربی ایران بیشتر است و مطالعه اکولوژیکی این گونه در شرایط آب و هوایی ایران موضوع قابل توجهی می‌تواند باشد (Zafari 2003; Karimi 2005).

بخش *Trichoderma*: در این تحقیق براساس مطالعات مورفولوژیکی و مولکولی تعداد هشت گونه شناسایی شد. پنج گونه از کلاد Harzianum که گونه‌های جداسازی شده مربوط به این کلاد در مقاله Mirzaei et al. (2023a) شرح داده شده است و سه گونه متعلق به کلاد Viride شامل *T. atroviride*، *T.*

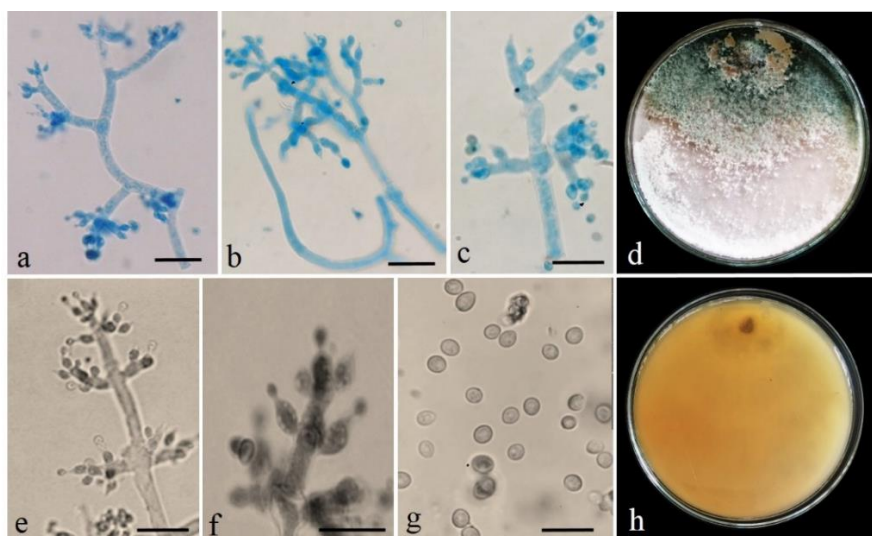
تیره به اندازه $3/3-3/9 \times 3/7-4/6$ میکرومتر بودند. جدایه با کد LT7 مربوط به این گونه می‌باشد. این گونه از ریزوسفر بلوط جداسازی شد.

۹۰ درجه و در قسمت انتهایی کنیدیوفور کمتر از ۹۰ درجه بودند. فیالیدها کم و بیش تنگی شکل مستقیم یا خمیده و غالباً در قسمت نوک قلاب مانند بودند. ابعاد آنها $3/4-3/6 \times 6/2-8/5$ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها کروی شکل، دارای دیواره صاف و سبز



شکل ۵. *Trichoderma virens*. فرم غیر جنسی و کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. e. سطح پرگنه، i. پشت پرگنه روی محیط PDA، a-d. کنیدیوفورها و فیالیدها، f-h. کنیدیوم‌ها. شاخص‌ها: ۱۰ میکرومتر.

Figure 5. A, *Trichoderma virens*. Asexual morph and culture at 25 °C. e. Colony surface, i. Colony reverse on PDA media, a-d. Conidiophores and phialides, f-h. Conidia. Scale bars: 10µm

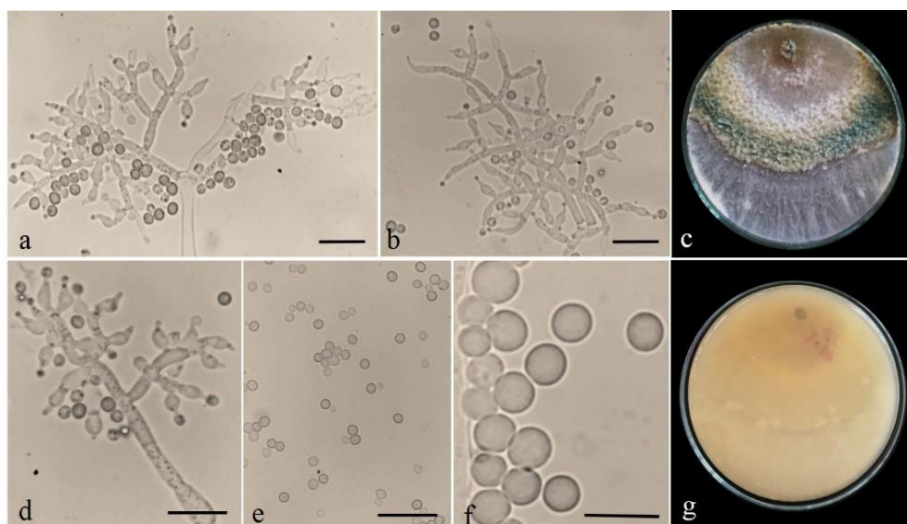


شکل ۶. *Trichoderma brevicompactum*. فرم غیر جنسی و کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. d. سطح پرگنه، h. پشت پرگنه روی محیط PDA، a-c. کنیدیوفورها، e-f. فیالیدها، g. کنیدی‌ها. شاخص‌ها: ۱۰ میکرومتر.

Figure 6. *Trichoderma brevicompactum*. Asexual morph and culture at 25 °C. d. Colony surface, h. Colony reverse on PDA media, a-c. Conidiophores, e-f. Phialides, g. Conidia. Scale bars: 10µm.

T. aggressivum f. و *aggressivum* f. *aggressivum* *europaeum* متمایز می‌نماید (Bissett 1991a). گونه *T. atroviride* توسط Zafari (2003) از ایران گزارش شده است. طبق نتایج پژوهش‌های مختلف *T. atroviride* از نظر کنترل بیولوژیک دارای اهمیت زیادی می‌باشد (Coninck et al. 2020; Speckbacher et al. 2020).

در این گونه سطح اسپور حتی در مشاهده با میکروسکوپ الکترونی هم صاف دیده شده است (Zafari 2003)، که این ویژگی آن را از گونه‌های *T. asperellum* و *T. viride* متمایز می‌نماید. بزرگ‌تر بودن اندازه کنیدیوم‌ها و فیالیدها و رنگ سبز تیره کنیدیوم‌ها و هم‌چنین عدم رشد یا رشد بسیار کم در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد این گونه را از *T. harzianum*، *T.*



شکل ۷. *Trichoderma atroviride*. فرم غیر جنسی و کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. c. سطح پرگنه، g. پشت پرگنه روی محیط PDA. a-b و d. کنیدیوفورها و فیالیدها، e-f. کنیدیوم‌ها. شاخص‌ها: ۱۰ میکرومتر.

Figure 7. *Trichoderma atroviride*. Asexual morph and culture at 25 °C. c. Colony surface, g. Colony reverse on PDA media, a-b and c. Conidiophores, e-f. Conidia. Scale bars: 10μm.

سطح کنیدیوم را در استرین‌های شناسایی شده به عنوان *T. viride* نشان داده. سوبه‌هایی که دارای زگیل کمتری در سطح کنیدیوم هستند و گروهی که سطح کنیدیوم دارای زگیل واضح و بیشتری هست (Jaklitsch et al. 2006).

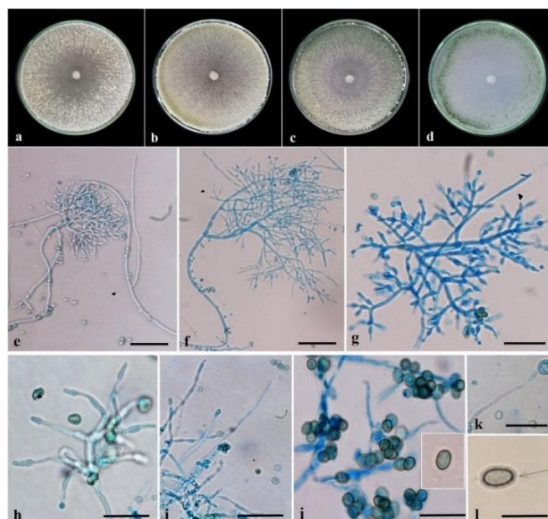
این جدایه بر اساس آنالیز فیلوژنی مشابه تعدادی از گونه‌ها بود که از نظر مورفولوژیکی نیز با گونه‌های نزدیک به آن نیز مورد بررسی قرار گرفت، از جمله: با گونه *T. paraviridesens*، که از نظر شکل کنیدیوم متفاوت می‌باشد به طوری که کنیدیوم در *T. paraviridesens* کروی و به ندرت بیضی شکل هست و دارای خارهای مشخص‌تری نسبت به *T. viridescens* می‌باشد. این گونه با *T. composticola* از نظر شکل کنیدیوفور، شاخه انتهایی و کلامیدوسپور متفاوت می‌باشد. کنیدیوفورها در این گونه به صورت درختچه‌ای با شاخه‌های منظم و یکنواخت و اغلب به صورت جفت تشکیل می‌شوند و شاخه انتهایی که تا پنج سلول به صورت یک زنجیره در زیر فیالیدها تشکیل می‌شود، و کلامیدوسپور هم به صورت بین ریشه و هم انتهایی وجود دارد. و همچنین رنگ پرگنه که به مرور به سبز مایل به خاکستری در مقابل زرد کم رنگ نیز متفاوت می‌باشد. همچنین این گونه با گونه *T. olivascens* از نظر وجود زوائد خار مانند در سطح کنیدیوم، تعداد یک تا دو سلول در زیر فیالید در گونه مورد بررسی در مقابل چهار سلول یا بیشتر در زیر فیالید متمایز می‌شود (Jaklitsch et al. 2013). این اولین گزارش از وجود این گونه در استان لرستان و دومین گزارش از آن در ایران می‌باشد. این گونه از ریزوسفر بلوط جداسازی شد.

Trichoderma viridescens (A.S. Horne & H.S. Will.) Jaklitsch & Samuels, Stud. Mycol. 56: 156, emend.

(شکل ۸)

رشد بهینه این گونه در محدوده دمایی ۲۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد در همه محیط‌ها بود، رشد آهسته و محدود در ۳۰ درجه سانتی‌گراد، بدون رشد در ۳۵ درجه سانتی‌گراد. میسلیم سطح تشنگ پتری را پس از ۶ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کلونیزه نمود. رنگ پرگنه سفید و به مرور به زرد کم رنگ تغییر پیدا کرد. سطح زیرین پرگنه تقریباً بی‌رنگ بود. بوی مشخصی مشابه بوی نارگیل از پرگنه متصاعد شد. محور اصلی کنیدیوفور بلند و شاخه‌های جانبی در انتهای آن به صورت متراکم، کنیدیوفور به صورت درختچه‌ای متراکم و پر شاخه، مستقیم یا خمیده، شاخه‌های کنیدیوفور متمایل به سمت بالا، فیالیدها در تعداد زیاد و متراکم، اغلب باریک، تنگی شکل با گردن باریک و در وسط متورم، تعداد یک تا دو سلول در زیر فیالید (به صورت یک زنجیر چند سلولی که سلول انتهایی آن یک فیالید است) مشاهده شد. ابعاد آن‌ها $3-2/3 \times 13/5-7$ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها اغلب بیضی شکل، سبز رنگ، کنیدیوم خاردار و ابعاد آن‌ها $3/7-2/5 \times 4/8-3/5$ میکرومتر بود. جدایه با کد LT11 مربوط به این گونه می‌باشد.

این گونه از نظر مورفولوژیکی و فیلوژنتیکی بسیار شبیه به *T. viride* می‌باشد. *T. viridescens* به عنوان یک مجموعه گونه شناخته شده است (Jaklitsch et al. 2013). بررسی‌های میکروسکوپ الکترونی وجود دو الگوی مجزا از تزئینات روی



شکل ۸. *Trichoderma viridescens*. فرم غیر جنسی و کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. a-d. پرگنه روی محیط PDA، CMD، MEA و SNA. e-i. کنیدیوفورها و فیالیدها، j-l. کنیدیوم‌ها. شاخص‌ها: ۱۰ میکرومتر.

Figure 8. *Trichoderma viridescens*. Asexual morph and culture at 25 °C. a-d. Cultures after 7 d on PDA, CMD, MEA and SNA, respectively. e-i. Conidiophores and phialides, j-l. Conidia. Scale bars: 10µm.

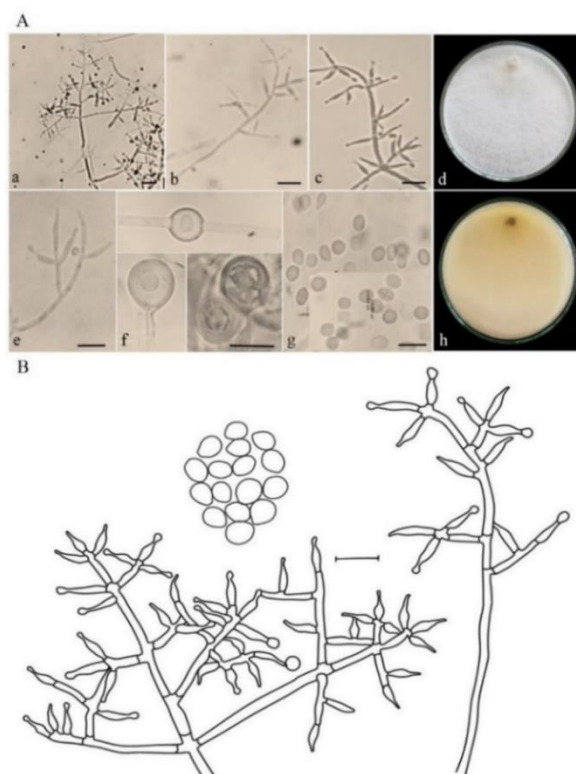
کروی با دیواره صاف به ابعاد $7/6-11/7 \times 7/5-14/5$ میکرومتر به صورت بین ریشه‌ای و انتهایی تشکیل شد. جدایه با کد LT38 مربوط به این گونه می‌باشد.

جدایه LT38 که در این مطالعه با نام *Trichoderma* sp.1 مورد بررسی قرار گرفت. این جدایه از نظر مشخصات ظاهری بیشترین شباهت را با گونه‌های *T. koningii* و *T. pseudokoningii* داشت. که از نظر شکل و اندازه فیالید، شکل کنیدیوم و همچنین بوی پرگنه (بوی نارگیل در مقابل بدون بو) با گونه *T. koningii* تفاوت داشت. از گونه *T. pseudokoningii* از نظر الگوی رشد، ساختار کنیدیوفور و همچنین شکل کنیدیوم متمایز می‌شود. همچنین توالی‌های (ITS و *tef1-a*) به دست آمده از این جدایه بیشترین شباهت را به گونه‌ی *T. samuelsii* نشان داد. با این گونه از نظر سرعت رشد بیشتر روی همه محیط کشت‌ها و همه دماها، الگوی رشد و همچنین شکل کنیدیوم (کروی تا تخم‌مرغی شکل در مقابل بیضوی و یا تا حدودی مستطیلی) تفاوت داشت. کنیدیوم در جدایه مورد بررسی در دماها و محیط‌های مورد بررسی به ندرت و در تعداد کم تشکیل شد. در صورتی که در گونه *T. samuelsii* به میزان فراوان و بعد از ۴۸ ساعت تشکیل می‌شود. همچنین در جدایه مورد بررسی هیچ گونه تغییر رنگی در پرگنه مشاهده نشد در صورتی که در گونه *T. samuelsii* به مرور به سبز تغییر پیدا می‌کند (Jaklitsch et al. 2012) لذا این جدایه نیز با بررسی‌های بیشتر می‌تواند گونه جدیدی برای قارچ‌های جهان باشد. این جدایه از ریزوسفر بلوط جداسازی شد.

Trichoderma sp. 1

(شکل ۹)

این جدایه سریع‌الرشد بود. بالاترین سرعت رشد آن در محدوده‌ی دمایی ۳۰-۲۵ درجه سانتی‌گراد روی سه محیط PDA، CMD و MEA مشاهده شد. به طوریکه بعد از ۷۲ ساعت تشک پتری را به طور کامل کلونیز نمود. در ۳۵ درجه سانتی‌گراد قادر به رشد نبود. روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بعد از ۹۶ ساعت در شرایط نور به میزان زیادی ریشه‌های هوایی تولید شد. پرگنه دایره‌ای، متراکم، هیف‌های هوایی فراوان و پنبه‌ای شکل، کنیدیوم‌زایی بعد از زمان طولانی به میزان کم و یا گاهی اصلاً تشکیل نشد. هیچ گونه رنگ‌دانه‌ای تولید نشد. روی همه‌ی محیط کشت‌ها به شدت بویی شبیه بوی نارگیل متصاعد شد. کنیدیوفورها شل، دارای یک محور اصلی مشخص بلند و مستقیم، هرمی شکل و کم تراکم بودند. انشعابات اولیه مجدداً منشعب، یا این‌که مستقیماً فیالید تولید می‌کردند. انشعابات ثانویه به صورت جفتی تشکیل شدند. همه انشعابات زایا به یک دسته فیالید منتهی بودند. فیالیدها به صورت تکی و یا دسته‌های ۲-۴ تایی و گاهی ۵ تایی روی کنیدیوفور مشاهده شد. فیالیدها استوانه‌ای شکل مستقیم یا خمیده، و یا به صورت تنگی‌شکل باریک یا گاهی در وسط یا بالاتر از وسط متورم و با گردن کوتاه و به ابعاد $2/2-2/8 \times 7/5-13/8$ میکرومتر می‌باشند. کنیدیوم‌ها نیمه کروی تا تخم‌مرغی شکل با یک انتهای باریک شده و دیواره صاف به اندازه $3/3-4/3 \times 3/7-2/4$ میکرومتر بودند. کلامیدسپور بعد از ۵-۶ روز نسبتاً فراوان به شکل کروی تا نیمه



شکل ۹. *Trichoderma* sp. 1. A. فرم غیرجنسی و کشت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد. d. سطح پرگنه، h. پشت پرگنه روی محیط PDA. a-c. کنیدیوفورها، e. فیالیدها، f. کلأمیدوسپورها، g. کنیدیوم‌ها. شاخص‌ها: ۱۰ میکرومتر. B. تصاویر ترسیمی *Trichoderma* sp. 1. **Figure 9.** *Trichoderma* sp. 1. A, Asexual morph and culture at 25 °C. a, Colony surface, b, Colony reverse on PDA media. a-c, Conidiophores, e, Phialides, f, Chlamydospores, g, Conidia. Scale bars: 10µm B, Drawings of *Trichoderma* sp. 1.

References

- Atanasova L, Druzhinina IS, Jaklitsch WM, Mukherjee P, Horwitz *et al.*, 2013. Two hundred *Trichoderma* species recognized on the basis of molecular phylogeny. In: Mukherjee P, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M, Schmoll M (eds). *Trichoderma: biology & applications*, CABI. Pp.10-42.
- Azizi H, 2015. Identification of *Trichoderma* species isolated from walnut orchards in East Azarbaijan province and investigation of biological control effect of effective isolates on walnut anthracnose. Master thesis, Plant Pathology, Vali Asr University, The Rafsanjan.
- Bazgir E, Rouhani H, Okhovat M, 1991. Investigating the effect of *Trichoderma* antagonist on *Rhizoctonia solani*, which causes bean damping and seed rot. *Proceedings of 10th Iranian Plant Protection Congress*, September 1-5, Kerman, Iran. p. 108. (in Persian with English abstract).
- Bissett J, 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect, nov. *Canadian Journal of Botany* 62: 924-931.
- Bissett J, 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. *Canadian Journal of Botany* 69: 2357-2372.
- Bissett J, 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany* 69: 2373-2417.
- Bissett J, 1991c. A revision of the genus *Trichoderma*. IV. Additional notes on section *Longibrachiatum*. *Canadian Journal of Botany* 69: 2418-2420.
- Bridge PD, Roberts PJ, Spooner BM, Panchal G, 2003. On the unreliability of published DNA sequences. *New Phytologist* 160(1): 43-48.
- Cai F, Druzhinina IS, 2021. In honor of John Bissett: authoritative guidelines on molecular identification of *Trichoderma*. *Fungal Diversity* 107: 1-69.
- Cao ZJ, Qin WT, Zhao J, Liu Y, Wang SX *et al.*, 2022. Three new *Trichoderma* species in harzianum clade associated with the contaminated substrates of edible fungi. *Journal of Fungi* 8(11): 1154.
- Chaverri P, Samuels GJ, 2003. *Hypocrea/Trichoderma* (Ascomycota, Hypocreales, Hypocreaceae): Species with green ascospores. *Studies in Mycology* 48(48): 1-116.

- Coninck E, Scauflaire J, Gollier M, Liénard C, Foucart G, et al, 2020. *Trichoderma atroviride* as a promising biocontrol agent in seed coating for reducing *Fusarium* damping-off on maize. *Journal of Applied Microbiology* 129(3): 637–651.
- Contreras-Cornejo H A, Mac'ias-Rodríguez L, del-Val E, Larsen J, 2016. Mini review ecological functions of *Trichoderma* spp. and their secondary metabolites in the rhizosphere: interactions with plants. *FEMS Microbiology Ecology* 92(4): 1–17.
- Danesh YR., Mohammadi Goltapesh E, 2001. Identification of *Trichoderma* species causing green mould in button mushroom farms, distribution and their relative abundance. *Iranian Journal of Plant Pathology* 69: 83–87. (In Persian with English abstract).
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada, D, 2012. jModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772.
- Davet P, 1979. A technique for analyzing soil population of *Trichoderma* spp. And *Gliocladium virens*. *Annual Review of phytopathology* 11: 529–534.
- Doyle JJ, 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13–5.
- Elad Y, Chet I, 1983. Improved selective media for isolation of *Trichoderma* spp. or *Fusarium* spp. *Phytoparasitica* 11(1): 55–58.
- Fanelli F, Liuzzi VC, Logrieco AF, Altomare C, 2018. Genomic characterization of *Trichoderma atroviride* (T. harzianum species complex) ITEM 908: Insight into the genetic endowment of a multi target biocontrol strain. *BMC Genomic* 19(662): 1–18.
- Feitosa YB, Cruz-Magalhães V, Argolo-Filho RC, De Souza JT, Loguerio L.L, 2019. Characterization of genetic diversity on tropical *Trichoderma* germplasm by sequencing of rRNA internal transcribed spacers. *BMC Research Notes* 12(663): 1–6.
- Gams W, Bissett J, 1998. Morphological and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, CP, Harman, GE, (eds). “*Trichoderma and Gliocladium*”. Taylor and Francis London, UK. Pp. 3–34.
- Gams W, Bissett J, 2002. Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE, (eds). *Trichoderma and Gliocladium: Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. Taylor & Francis Ltd, London. Pp 3–31.
- Ghasemi Esfahlan S, Arzanlou M, Babaei Ahari A, 2017. Identification of endophytic *Trichoderma* species from oak trees in Arasbaran forests using morphological and molecular characteristics. *Journal of Applied Research in Plant Protection* 6(3): 53–66. (In Persian with English abstract)
- Ghasemialitappeh M, Sadravi M, Mirabadi A, 2018. Isolation and identification of *Trichoderma* species and investigating their seed treatment effect on rapeseed (*Brassica napus* L.) germination. *Cercetări Agronomice în Moldova* 3(175): 43–50.
- Hermosa MR, Keck E, Chamorro I, Rubio B, Sanz L, et al., 2004. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol strains. *Mycological Research* 108(8): 897–906.
- Hosseini Iour A, 2014. Identification and frequency determination of *Trichoderma* species in sunflower rhizosphere in West Azarbaijan province. Master thesis, Plant Pathology, Urmia University, The Urmia.
- Howell CR, 2003. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87(1): 4–10.
- Howell CR, Hanson LE, Stipanovic RD, Puckhaber LS, 2003. Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90(3): 248–252.
- Inglis PW, Mello SCM, Martins I, Silva JBT, Macêdo K, et al., 2020. *Trichoderma* from Brazilian garlic and onion crop soils and description of two new species: *Trichoderma azevedoi* and *Trichoderma peberdyi*. *PLOS ONE* 15(3): e0228485.
- Jaklitsch WM, Komon M, Kubicek CP, Druzhinina IS, 2005. *Hypocrea voglmayrii* sp. nov. from the Austrian Alps represents a new phylogenetic clade in *Hypocrea/ Trichoderma*. *Mycologia* 97(6): 1365–1378.
- Jaklitsch WM, Samuels GJ, Dodd SL, Lu BS, Druzhinina IS, 2006. *Hypocrea rufa / Trichoderma viride*: a reassessment and description of five closely related species with and without warted conidia. *Studies in Mycology* 56(1): 135–177.
- Jaklitsch WM, Stadler M, Voglmayr H, 2012. Blue pigment in *Hypocrea caerulea* sp. nov. and two additional new species in sect. *Trichoderma*. *Mycologia* 104(4): 925–41.
- Jaklitsch WM, Voglmayr H, 2015. Biodiversity of *Trichoderma* (Hypocreaceae) in Southern Europe and Macaronesia. *Studies in Mycology* 80(80): 1–87.

- Jaklitsch WM, Samuels GJ, Ismaiel A, Voglmayr H, 2013. Disentangling the *Trichoderma viridescens* complex. *Persoonia* 31(1): 112–146.
- Karimi S, 2005. Assisting in identifying *Trichoderma* and *Endomycorrhizae* species as useful fungi on the roots of walnut in Hamadan province. Master thesis, Plant pathology, Buali Sina University, The Hamedan.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD, 2019. MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20: 1160–1166.
- Khalili I, Sadraei M, Naeimi Sh, Khosravi V, 2012. Biological control of Rice brown spot eight native isolates of three *Trichoderma* species. *Brazilian Journal of Microbiology* 43(1): 297–305.
- Kullnig-Gradinger CM, Szakacs G, Kubicek, CP, 2002. Phylogeny and evolution of the genus *Trichoderma*: a multigene approach. *Mycological Research* 106(7): 757–767.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology Evolution* 35(6): 1547–9.
- López-Bucio J, Pelagio-Flores R, Herrera-Estrella A, 2015. *Trichoderma* as biostimulant: exploiting the multilevel properties of a plant beneficial fungus. *Scientia Horticulturae* 30(196): 109–123.
- Maliszewska I, Aniszkiewicz Ł, Sadowski Z, 2009. Biological Synthesis of Gold Nanostructures Using the Extract of *Trichoderma koningii*. *Acta Physica, Polonica* 116: 163–165.
- Mazrou YSA, Makhlof AH, Elseehy MM, Awad MFA, Hassan MM, 2020. Antagonistic activity and molecular characterization of biological control agent *Trichoderma harzianum* from Saudi Arabia. *Egyptian Journal of Pest Control* 30(1): 1–8.
- Mehrabi Koushki M, Zafari D, Nazmi Roudsari F, 2008. To help Identification of *Trichoderma* Fungus Species in Plants Rhizosphere of Urban Greenspace in Markazi Province. *The 3th national conference of green space and urban landscape*, February 23, Hormozgan, Iran. P. 226.
- Mendoza-Mendoza A, Nogueira-López G, Arizmendi FP, Cripps-Guazzone N, Nieto-Jacobo M, et al., 2017. Mechanisms of Growth Promotion by Members of the Rhizosphere Fungal Genus *Trichoderma*. In: *Advances in PGPR research* CABI. 1–15 Pp.
- Miller GH, Giddens JH, Foster AA, 1957. A survey of the fungi of forest and cultivated soil of Georgia. *Mycologia* 49(6): 779–808.
- Mirzaei-pour Z, Bazgir E, Zafari D, Darvishnia M, 2023a. Isolation and identification of Harzianum clade species of *Trichoderma* from Khorramabad County. *Mycologia Iranica* 10(2): 67–78.
- Mirzaei-pour Z, Bazgir E, Zafari D, Darvishnia M, 2023b. Effect of temperature and culture medium on the growth and sporulation of eight *Trichoderma* species. *Plant Pathology Science* 12(2): 105–116.
- Mukherjee PK, Horwitz BA, Herrera-Estrella A, Schmoll M, Kenerley C M, 2013. *Trichoderma* research in the genome era. *Annual Review of Phytopathology* 51(1): 105–129.
- Nazmi Roudsari F, Zafari D, KhodaParast A, Rouhani H, 2007. Introducing some new species of *Trichoderma* for Iran. *Rostaniha* 8(1): 67–83. (In Persian with English abstract).
- Park MS, Bae KS, Yu SH, 2006. Two new species of *Trichoderma* associated with green mold of oyster mushroom cultivation in Korea. *Mycobiology* 34(3): 111–113.
- Persoon CH, 1794. Dispositio methodica fungorum. *Neues Magazin für die Botanik* 1: 81–128.
- Qin WT, Zhuang WY, 2016. Four new species of *Trichoderma* with hyaline ascospores from central China. *Mycological Progress* 15(8): 811–825.
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH, 2017. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. *Journal of Nature Products* 80(3): 756–770.
- Rifai MA, 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers* 116: 1–56.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Roughanian M, Amini J, Zafari D, Abdolazadeh J, 2013. A record of endophytic *Trichoderma* species in Kurdistan. *Plant Protection Journal* 5(1): 115–124. (In Persian with English abstract).
- Saba H, Vibhash D, Manisha M, Prashant KS, Farhan H, 2012. *Trichoderma* – a promising plant growth stimulator and biocontrol agent. *Mycosphere* 3(4): 524–531.
- Samuels GJ, Ismaiel A, Mulaw TB, Szakacs G, Druzhinina IS, 2012. The Longibrachiatum Clade of *Trichoderma*: a revision with new species. *Fungal diversity* 55(1): 77–108.

- Samuels GJ, Chaverri P, Farr DF, McCray, E B, 2009. *Trichoderma* online. Systematic mycology and microbiology laboratory. ARS, USDA. Available at <http://nt.arsgrin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm> [Accessed 11 June 2023].
- Sandoval-Denis M, Sutton DA, Cano-Lira JF, Gené J, Fothergill AW, 2014. Phylogeny of the Clinically Relevant Species of the Emerging Fungus *Trichoderma* and Their Antifungal Susceptibilities. *Journal of Clinical Microbiology* 52(6): 2112–2125.
- Saravanakumar K, Wang MH, 2020. Isolation and molecular identification of *Trichoderma* species from wetland soil and their antagonistic activity against phytopathogens. *Physiological & Molecular Plant Pathology* 109: 101458.
- Savín-Molina J, Hernández-Montiel LG, Ceiro-Catasú W, 2021. Morphological characterization and biocontrol potential of *Trichoderma* species isolated from semi-arid soils. *Mexican Journal of Phytopathology* 39(3): 435–451.
- Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(16): 6241–6246.
- Silva Lisboa D, Santos C, Barbos RN, Magalhães O, et al., 2017. Requalification of a Brazilian *Trichoderma* collection and screening of its capability to decolourise real textile effluent. *International Journal of Environmental Research & Public Health* 14(4): 373.
- Speckbacher V, Ruzsanyi V, Martinez-Medina A, Hinterdobler W, Doppler M, et al, 2020. The Lipoxygenase Lox1 Is Involved in Light-and Injury-Response, Conidiation, and Volatile Organic Compound Biosynthesis in the Mycoparasitic Fungus *Trichoderma atroviride*. *Frontiers in Microbiology* 11: 2004.
- Tulasne LR, Tulasne C. 1863. *Selecta fungorum carpologia II. IX Fumago, Imperiali Typograph, Paris* 279–285.
- Vahabi K, Mansoori G, Karimi S, 2011. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Fungus *Trichoderma reesei* (A Route for Large-Scale Production of AgNPs). *Insciences Journal* 1(1): 65–79.
- Vilgalys R, 2003. Taxonomic misidentification in public DNA databases. *New Phytologist* 160(1): 4–5.
- Waghunde RR, Shelake RM, Sabalpara AN, 2016. Review *Trichoderma*: A significant fungus for agriculture and environment. *African Journal of Agricultural Research* 11(22): 1952–1965.
- White TJ, Bruns T, Lee SJWT, Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols. A Guide to Methods & Applications* 18(1): 315–322.
- Younesi H, 2021. Study on biological controlling of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceri*, causal agent of chickpea fusarium wilt, using indigenous *Trichoderma* spp. isolates of Kermanshah province and development of *Trichoderma* sp. Based formulations. PhD thesis, Plant Pathology, Lorestan University, The Lorestan.
- Zafari D, 2003. Taxonomic study of the genus *Trichoderma* in Iran, PhD thesis, Plant Pathology, Tarbiat Modares University. The Tehran.
- Zafari D, Sharifnabi B, Olia M, Karimi C, 2004. Collection and identification of *Trichoderma* species from the root zone of suspected nematode plants in Chaharmahal Bakhtiari province. *Proceedings of 16th Iranian Plant Protection Congress*, August 28, Tabriz, Iran. p. 108. (In Persian with English abstract).
- Zanfaño L, Carro-Huerga G, Rodríguez-González Á, Mayo-Prieto S, Cardoza, RE, Gutierrez S, Casquero PA, 2024. *Trichoderma carraovejensis*: a new species from vineyard ecosystem with biocontrol abilities against grapevine trunk disease pathogens and ecological adaptation. *Frontiers in Plant Science* 15:1388841.
- Zhao R, Chen KY, Mao LJ, Zhang CL, 2025. Eleven new species of *Trichoderma* (Hypocreaceae, Hypocreales) from China. *Mycology* 16(1): 180–209.
- Zheng H, Qiao M, Lv YF, Du X, Zhang KQ, et al., 2021. New species of *Trichoderma* isolated as endophytes and saprobes from southwest China. *Journal of Fungi* 7(6): e467.
- Zhu ZX, Zhuang WY, 2014. *Trichoderma* (*Hypocrea*) species with green ascospores from China. *Persoonia* 34(1): 113–129.

