



دانشگاه گوارزی و منابع طبیعی گرگان

مجله پژوهش‌های علوم و فناوری چوب و جنگل

جلد شانزدهم، شماره دوم، ۱۳۸۸

www.gau.ac.ir/journals

جداسازی و شناسایی قارچ‌های همراه بذر بلندمازو (*Quercus castaneifolia*) در جنگل شصت کلاته گرگان

*فریدون فریدی^۱، محمدرضا کاوسی^۲، کامران رهنما^۳ و سعید نصرآ...نژاد^۴

^۱دانش آموخته کارشناسی ارشد جنگلداری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، آستادیار گروه جنگلداری،

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، آدانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی

گرگان، آستادیار گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

گونه بلوط (بلندمازو) از گونه‌های مهم صنعتی جنگل‌های شمال کشور می‌باشد که زادآوری طبیعی این گونه با ارزش به دلیل وجود آفات و بیماری‌های متعدد از جمله قارچ‌ها، با مشکلات فراوانی مواجه است. به منظور جداسازی و شناسایی قارچ‌های همراه بذر بلندمازو در سال ۱۳۸۶ از جنگل آموزشی و پژوهشی شصت کلاته گرگان نمونه برداری صورت گرفت. بذره‌های جمع‌آوری شده به دو قسمت بیرونی (پوسته) و درونی (اندوسپرم) تفکیک و با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد ضد عفونی سطحی گردید. هر قسمت (بیرونی و درونی) به صورت جداگانه در چهار تکرار روی محیط کشت غذایی سیب‌زمینی - دکستروز - آگار (PDA) کشت گردید (در هر تکرار ۲۵ بذر). با استفاده از خالص‌سازی و خصوصیات اسپور، اندازه و رنگ آنها، قارچ‌های *Aspergillus flavus*، *Trichothecium*، *Trichoderma harzianum*، *Curvularia affinis*، *A. niger*، *Diplodia* sp. و *Penicillium implicatum*، *Eurotium rubrum*، *roseum* جداسازی و شناسایی شد. قارچ‌های *E. rubrum*، *T. roseum*، *T. harzianum* و *Diplodia* sp. به ترتیب با ۳۵ درصد، ۴۱ درصد، ۷ درصد و ۲۳ درصد فراوانی فقط در بخش بیرونی و قارچ *C.*

* مسئول مکاتبه: feridonfaridi@gmail.com

A. flavus با ۳۹ درصد فراوانی فقط در بخش درونی بذر مشاهده شدند. قارچ‌های *A. niger* و *P. implicatum* نیز در هر دو بخش مشاهده شدند. بیشترین فراوانی قارچ مربوط به قارچ *P. implicatum* در بخش درونی با ۷۴ درصد بود. نتایج پژوهش نشان داد که تنوع و فراوانی قارچ‌های بخش بیرونی بذر بیشتر از بخش درونی است. همچنین در طول چندین بار جداسازی، یک قارچ پوده‌رست همیشه روی سطح بذر بلندمازو یافت می‌شود. این اولین گزارش از قارچ‌های همراه بذر بلندمازو در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: بلندمازو، قارچ‌های همراه، بذر، جنگل شصت‌کلاته

مقدمه

بذرهای درختان جنگلی به‌طور پی‌درپی تحت تأثیر اختلالات فیزیکی و فیزیولوژیکی قرار می‌گیرند که بیشتر این بیماری‌ها به‌وسیله قارچ‌ها به‌وجود می‌آیند. سلامتی و توانایی رشد در نهال‌ها به‌طور قابل توجهی به کیفیت بذر بستگی دارد (میتال و ماتیور، ۱۹۹۸). بیشتر قارچ‌های همراه بذر درختان جنگلی کپک‌ها هستند که بر روی سطح بذر توسعه پیدا کرده و در بعضی مواقع عامل آلودگی داخلی هم هستند (هاوس، ۱۹۵۶). تأثیر کپک بر روی بذرها به‌صورتی است که بذرها ظاهراً سالم به نظر می‌رسند اما در واقع به‌طور قابل ملاحظه‌ای از نظر قوه نامیه تخریب شده‌اند (شئا، ۱۹۵۷). اخیراً مشخص شده که همه بذرهای حامل اسپوره‌های قارچ‌های میکروسکوپی چه بر روی سطح بذر و چه در درون بذر هستند (سینگ و ماتیور، ۱۹۹۳). معمولاً یک قارچ پوده‌رست روی سطح بذر یافت می‌شود زیرا اسپورها به راحتی می‌توانند به سطح بذر بچسبند، از طرف دیگر تعداد اسپوره‌های سطح بذر به‌طور قابل توجهی مختلف هستند به‌طوری‌که از ۵۰ تا ۱۵۰۰۰۰ اسپور در هر یک گرم بذر متغیر می‌باشد (یوروسویک، ۱۹۶۱). در شرایط مناسب، بعضی از اسپوره‌های جوانه زده و پس از توسعه لوله تندش به داخل لپه‌ها نفوذ می‌کنند که از این طریق جنین بذر را مورد تغذیه قرار می‌دهند. قارچ‌های همراه بذر هم به طریق مستقیم و هم به طریق غیرمستقیم می‌توانند سبب ضعف جوانه‌زنی بذر شده و بذر را برای حمله قارچ‌های بیماری‌زای خاکزاد مستعد کنند (گیسون، ۱۹۵۷). بذر سالم در جنگل جهت زادآوری طبیعی یکی از مهم‌ترین موضوع‌هایی است که حیات آینده جنگل به آن بستگی دارد. بذرهای بیمار و صدمه دیده حتی در شرایط مناسب محیطی هم نمی‌توانند یک زادآوری دلخواه و مطلوب را برای بقای جنگل یا یک گونه خاص را به‌وجود

آورند. درختانی که از بذور بیمار و آسیب‌دیده به وجود می‌آیند دارای رشد کم بوده و بذوری را که در آینده تولید می‌کنند دارای قدرت حیاتی پایین می‌باشند (حجازی، ۱۹۹۴).

پوتلایکوک (۱۹۵۳) قارچ‌هایی را که سبب کپک‌زدگی و همچنین تغییر رنگ سطح بذرهای بلوط می‌شوند را مشخص کرد که شامل جنس‌های: *Botrytis Trichothecium Rhizopus Mucor* و *Penicillium* بودند و اهمیت ثانویه‌ای در از بین رفتن توانایی جوانه‌زنی بذرهای بلوط داشتند. او همچنین نتیجه‌گیری کرد که ۷۰ درصد از بذرهای بلوط در طول انبارداری به‌خاطر آلودگی‌های قارچی درصد جوانه‌زنی خود را از دست می‌دهند. شتا (۱۹۵۷) گزارش داد که تأثیر کپک‌ها روی بذرهای بلوط می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی سبب تخریب بذر شود هر چند که در ظاهر صدمه‌ای جدی روی آنها مشاهده نشود. یوروسویک (۱۹۶۱) قارچ‌های همراه بذر بلوط را به دو دسته تقسیم کرد: ۱- پارازیت‌ها یا نیمه پارازیت‌ها شامل قارچ‌هایی مانند *Ciboria batschiana* (Zopf) N.F. *Phomopsis .Gloeosporium quercinum* Westend. *Ophiostoma* spp. Buchw. *Botrytis cinerea* Persoon *Cytospora intermedia* Sacc *quercella* (Sacc) Died *Alternaria* ex Fries و *Pestalotia* sp. ۲- گندروها شامل قارچ‌هایی از جنس‌های *Trichoderma* و *Penicillium Fusarium Aspergillus* ساکولوا (۲۰۰۱) نیز قارچ‌های همراه بذر بلوط را به دو دسته کپک‌ها و پوسیدگی‌ها تقسیم‌بندی نمود.

از سوی دیگر بحث بیماری‌شناسی بذر درختان جنگلی در مقایسه با مسایل بذور گیاهان زراعی کمتر در کشور به آن توجه شده است (ارشاد، ۱۹۹۵). در چند سال گذشته بحث قارچ‌های همراه بذر بررسی گردید اما اخیراً بحث حفاظت از بذور درختان جنگلی به‌دلیل مشکلات زیادی که در سطح جهانی برای مدیریت جنگل‌ها به‌وجود آمده، تبدیل به یک موضوع جدی شده است (میتال و ماتیور، ۱۹۹۸). بلندمازو (*Quercus castaneifolia* Browicz & Menitsky) هم به‌عنوان یکی از گونه‌های مهم صنعتی جنگل‌های شمال کشور که ۶/۶ درصد از سطح و ۷ درصد از حجم جنگل‌های شمال را به خود اختصاص می‌دهد از نظر زادآوری طبیعی و همچنین جنگل‌کاری با مشکلات فراوانی مواجه شده است، بنابراین شناخت خصوصیات قارچ‌های همراه بذر بلوط و دستیابی به مناسب‌ترین روش‌های احیا این گونه با ارزش، بسیار مهم و ضروری می‌باشد. هدف از این پژوهش شناسایی قارچ‌های عامل خسارت در دو بخش درونی و بیرونی بذر بلندمازو و مشخص کردن فراوانی آنها از جنگل شصت‌کلاته است.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری: در اواسط پاییز سال ۱۳۸۶ جنگل آموزشی و پژوهشی شصت‌کلاته واقع در جنوب غربی شهرستان گرگان مورد بررسی قرار گرفت و پس از جنگل‌گردشی و مشخص کردن منطقه پراکنش درختان بلندمازو به صورت تصادفی ۱۰۰ بذر در هر منطقه جمع‌آوری شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده در کیسه‌های کاغذی سترون قرار گرفته و پس از درج مشخصات منطقه و تاریخ جمع‌آوری به آزمایشگاه با دما و تهویه مناسب انتقال داده شدند. بدین ترتیب ۴ نمونه ۲۵ تایی از بذرهای منطقه جمع‌آوری شدند.

جدا و خالص‌سازی قارچ‌های بذر: به منظور جداسازی قارچ از بذر ابتدا بذرها به قطعه‌های کوچک‌تر و همچنین به دو بخش برونی (پوسته) و درونی (اندوسپرم) تقسیم شدند (شکل ۱). تفکیک بخش درونی از بخش برونی بذر به دلیل مقایسه قارچ‌های دو بخش نام برده، صورت گرفت. پس از اینکه بذر به قطعات کوچک‌تر تقسیم شد، با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۱-۲ دقیقه ضدعفونی سطحی گردید و سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده و جهت خشک نمودن در لای کاغذ صافی سترون قرار داده شد. آنگاه قطعات بخش برونی و درونی بذر به صورت مجزا و در چهار تکرار بر روی محیط کشت غذایی عصاره سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA)^۱ حاوی اسید لاکتیک کشت گردید و در انکوباتور با دمای 25 ± 1 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از گذشت ۳ روز از قارچ‌های رشد یافته بر روی محیط کشت به روش نوک ریشه‌ای کشت فرعی صورت گرفت و به این ترتیب قارچ‌ها خالص‌سازی شدند.



شکل ۱- تفکیک بذر بلندمازو به دو قسمت بیرونی (پوسته) و درونی (اندوسپرم).

1- Potato Dextrose Agar

شناسایی قارچ‌ها: شناسایی جنس قارچ‌ها، پس از رویش آنها روی قطعات بذر با استفاده از منابع معتبر بارنت و هانتز (۱۹۹۸) و الیس (۱۹۷۶) و طبقه‌بندی آنها براساس طبقه‌بندی اریکسون و همکاران (۲۰۰۶) و الکسوپولس و همکاران (۱۹۹۶) بود. برای شناسایی گونه‌ها محیط کشت PDA مطابق روش دینگرا و سینکلایر (۱۹۹۵) مورد استفاده قرار گرفت. کلیدهای شناسایی پیت (۱۹۸۸) و (۱۹۹۷) برای شناسایی گونه مربوط به جنس‌های *Aspergillus Penicillium* و *Eurotium* توصیف‌های لیت وینوف (۱۹۶۷) و الیس (۱۹۷۶) و (۱۹۷۱) جهت شناسایی گونه مربوط به جنس‌های *Trichoderma Curvularia Trichothecium* و برای شناسایی گونه *harzianum* از کلید شناسایی گیمرز و بیست (۱۹۹۸) و هارمن و کویسک (۱۹۹۸) استفاده شد. شناسایی براساس معیارهای مختلفی مانند وجود یا عدم وجود دیواره عرضی، شکل و اندازه آسک، کنیدیوفور، آسکوسپورها، کنیدیوم‌ها و فیالیدها، نوع آسکوکارپ، تعداد آسکوسپورهای هر آسک، تعداد کنیدیوم‌های قرار گرفته بر روی کنیدیوفور و یا فیالیدها، یک یا چند یاخته‌ای بودن آسکوسپورها و کنیدیوم‌ها، در بعضی از گونه‌ها حضور یا عدم حضور متولاها، رشد قطری پرگنه، رنگ و حالت پرگنه و غیره صورت گرفت.

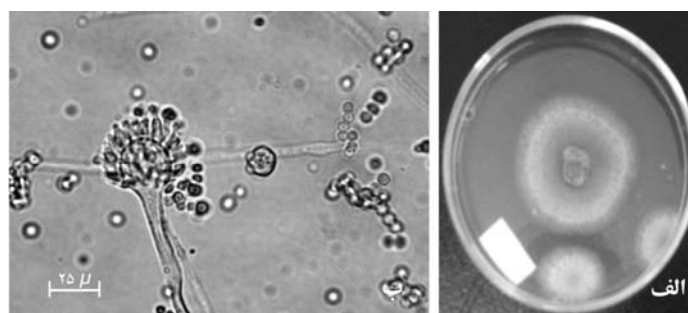
نتایج و بحث

از روی بذرهای بلندمازو قارچ‌های *Aspergillus flavus* Link، *A. niger* Tiegh. nom.، *Trichoderma harzianum* Rifai، *Curvularia affinis* Boedijn. cons.، *Trichothecium Eurotium rubrum* Jos. König et al Bainier & Sartory، *Diplodia* sp. و *Penicillium implicatum* Biourge، *roseum* (Pers.) Link جداسازی و شناسایی شد. درصد فراوانی هر قارچ در جدول ۱ نشان داد که بیشترین درصد فراوانی به ترتیب مربوط به گونه *P. implicatum* با ۷۴ درصد و *C. affinis* با ۳۹ درصد فراوانی از بخش درونی بذر جداسازی شده است. در حالی که کمترین میزان درصد فراوانی از بخش درونی بذر با ۱۱ درصد مربوط به قارچ *A. niger* بود. در بخش پوسته بذر یا بخش بیرونی بیشترین درصد فراوانی به ترتیب مربوط به قارچ‌های *A. flavus* با ۴۶ درصد و *T. roseum* با ۴۱ درصد جداسازی بوده است. کمترین میزان درصد فراوانی (۷ درصد) قارچ جداسازی شده از قسمت بیرونی بذر مربوط به *T. harzianum* بود.

جدول ۱- درصد فراوانی قارچ‌های شناسایی شده از روی بذر بلندمازو.

گونه‌ها	درصد فراوانی بخش برونی (پوسته)	درصد فراوانی بخش درونی (اندوسپرم)
<i>Aspergillus flavus</i>	۴۶	۲۷
<i>A. niger</i>	۱۶	۱۱
<i>Curvularia affinis</i>	–	۳۹
<i>Trichoderma harzianum</i>	۷	–
<i>Diplodia</i> sp.	۲۳	–
<i>Penicillium implicatum</i>	۳۱	۷۴
<i>Eurotium rubrum</i>	۳۵	–
<i>Trichothecium roseum</i>	۴۱	–

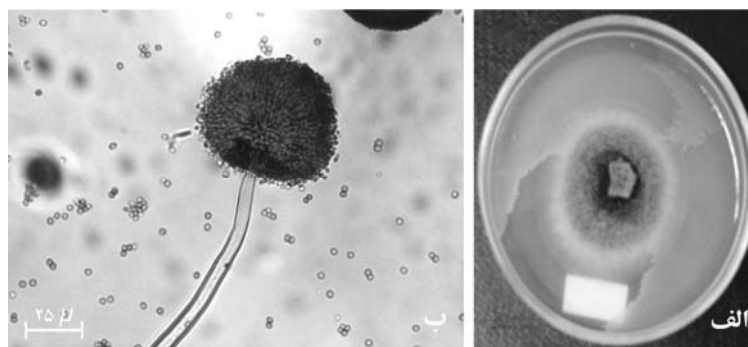
گونه *Aspergillus flavus* پرگنه در محیط PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد زیتونی تا لیمویی سبز که از پشت ظرف کرم رنگ بودند. رشد قطری پرگنه سریع، حدود ۵/۲ سانتی‌متر بعد از سه روز و بافت پشمی تا پنبه‌ای که گاهی دارای دانه‌های ریز یا دانه‌دانه بودند (شکل ۲-الف). هیف دارای دیواره عرضی و روشن، کنیدیوم‌ها به صورت شعاعی تا ستونی با یک ترتیب سنی بر روی سلول حباب مانند یا وزیکل قرار داشتند. کنیدیوفورها درشت و بی‌رنگ با بیش از ۸۰۰ میکرومتر طول و ۲۰-۱۵ میکرومتر عرض. وزیکل‌ها کروی تا نیمه‌کروی (به قطر ۴۰-۲۰ میکرومتر)، فیالیدها (۱۲-۸ × ۴-۳ میکرومتر) تقریباً تمام سطح وزیکل را پوشش دادند. کنیدیوم‌ها به قطر ۶-۳ میکرومتر، صاف و ظریف و کروی تا نیمه‌کروی بودند (شکل ۲-ب).



شکل ۲- *Aspergillus flavus* جداسازی شده از بذر بلندمازو

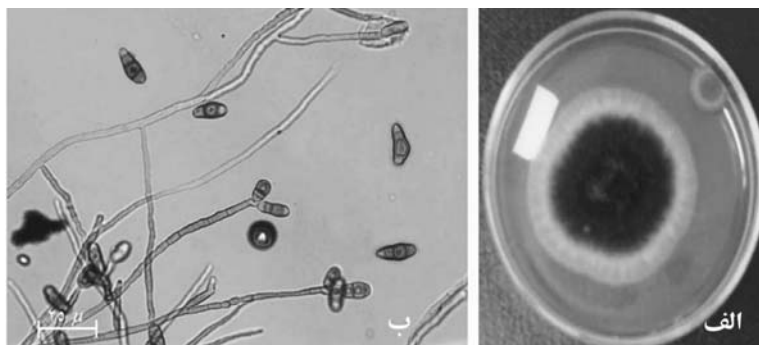
(الف: پرگنه بر روی PDA، ب: کنیدیوفور و کنیدی‌ها).

گونه *Aspergillus niger*: پرگنه بر روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در ابتدا سفید که به سرعت به دلیل تولید کنیدی سیاه رنگ شده و در پشت ظرف زرد کم رنگ یا رنگ پریده که در طی رشد شکاف‌های شعاعی در محیط کشت تولید کرد. رشد قطری پرگنه بعد از سه روز ۴/۳ سانتی‌متر (شکل ۳-الف). هیف دارای دیواره عرضی و شفاف. کنیدیوم‌ها به صورت شعاعی بر روی وزیکل قرار داشتند. این گونه تولید متولا نیز کرد. کنیدیوفورها دراز (۴۰۰ تا ۳۰۰۰ میکرومتر)، صاف و شفاف که در راس تیره بوده، به حباب یا سلول وزیکل‌های کروی (به قطر ۷۵-۳۰ میکرومتر) منتهی شدند. متولاها و فیالیدها تمام سطح وزیکل را پوشانند. کنیدیوم‌ها قهوه‌ای تا سیاه، ناصاف و زگیل‌دار، کروی و اندازه‌ای به قطر ۵-۴ میکرومتر دارا بودند (شکل ۳-ب).



شکل ۳- *Aspergillus niger* جداسازی شده از بذر بلندمازو. (الف: پرگنه بر روی PDA، ب: کنیدیوفور و کنیدی‌ها).

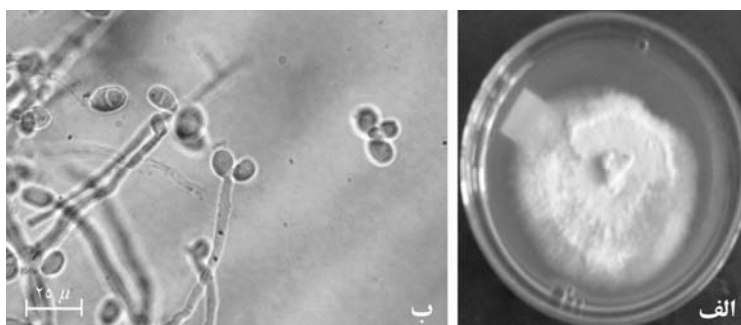
گونه *Curvularia affinis*: پرگنه بر روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به رنگ سیاه تا سیاه مایل به سبز تیره که در حاشیه‌ها سفید بود. بافت پرگنه پنبه‌ای و رشد قطری آن بعد از سه روز ۴/۴ سانتی‌متر بود (شکل ۴-الف). کنیدیوفورها اغلب ساده و حامل اسپوره‌های انتهایی که بر روی آن به صورت دو تایی تشکیل شدند. کنیدیوم‌ها ۲ تا ۴ سلولی، کم و بیش دوکی شکل و خمیده به طوری که یکی از سلول‌های میانی درشت‌تر از بقیه و به رنگ خرمایی روشن که دو سلول موجود در هر دو انتها روشن‌تر به نظر رسید. تحذب سلول مرکزی به نحوی بود که ایجاد یک برآمدگی را نمود. اندازه کنیدیوم‌ها ۱۴-۲۳×۳۳-۲۳ میکرومتر بود (شکل ۴-ب).



شکل ۴- *Curvularia affinis* جداسازی شده از بذر بلندمازو.

(الف: پرگنه بر روی PDA، ب: کنیدیوفور و کنیدی‌ها).

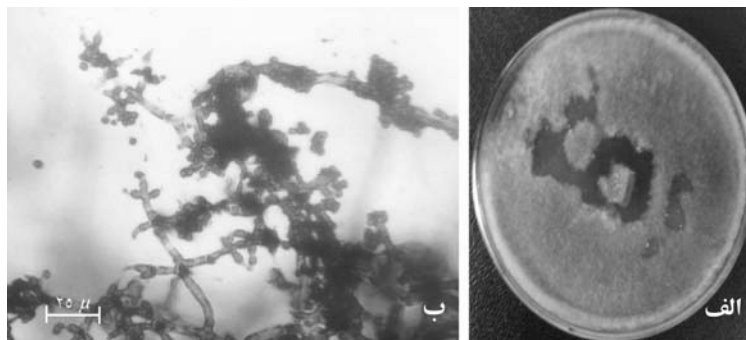
گونه *Trichothecium roseum*: پرگنه تقریباً سریع‌الرشد با رشد قطری ۲/۸ سانتی‌متر بعد از سه روز و بر روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به رنگ صورتی کم‌رنگ مایل به سفید و تا حدودی پودری شکل بود (شکل ۵- الف). کنیدیوفورها تا موقعی که اولین کنیدیوم‌ها تولید نشدند از هیف‌های بخش رویشی قابل تفکیک نبودند. آنها به صورت عمودی، بدون انشعاب و اغلب دارای دیواره عرضی در نزدیکی پایه کنیدیوفور بودند. دو کنیدیوم به‌طور متناوب و بر روی هم در نوک کنیدیوفور تشکیل شدند. کنیدیوم‌ها دو سلولی، بیضوی تا گلابی شکل با محل اتصال به کنیدیوفور مایل، شفاف، صاف تا کمی زبر و با اندازه ۱۰-۷ × ۱۶-۱۱ میکرومتر بودند (شکل ۵- ب).



شکل ۵- *Trichothecium roseum* جداسازی شده از بذر بلندمازو

(الف: پرگنه بر روی PDA، ب: کنیدیوفور و کنیدی‌ها).

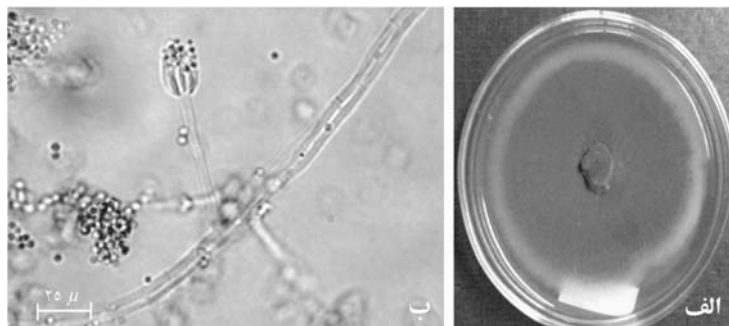
گونه *Trichoderma harzianum*: پرگنه دارای رشد سریع که در ابتدا سفید پنبه‌ای اما بعد از دو روز به رنگ سبز تقریباً روشن در آمد و تمام تشتک پتری را پر کرد (شکل ۶- الف). هیف‌ها دارای دیواره عرضی، منشعب و به قطر ۵/۵-۲/۵ میکرومتر بودند. کلامیدوسپورها در انتها و یا به صورت بین هیفی، بیضوی تا دوکی کشیده با دیواره صاف و به قطر ۷/۵-۵ × ۱۰-۸/۵ میکرومتر. کنیدیوفورها منشعب که به طرف انتهای کنیدیوفور طول این انشعابات کوچک‌تر شدند. فیالیدها کوتاه، میله‌ای شکل، در قاعده باریک‌تر از ناحیه میانی و در نوک مخروطی به ابعاد ۷/۵ × ۲/۵-۳/۵-۵ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها (فیالوسپورها) به صورت منفرد در انتهای فیالیدها مجتمع شده، کروی تا تخم‌مرغی با دیواره صاف و به ابعاد ۳/۴-۲/۵ میکرومتر بودند (شکل ۶- ب).



شکل ۶- *Trichoderma harzianum* جداسازی شده از بذر بلندمازو

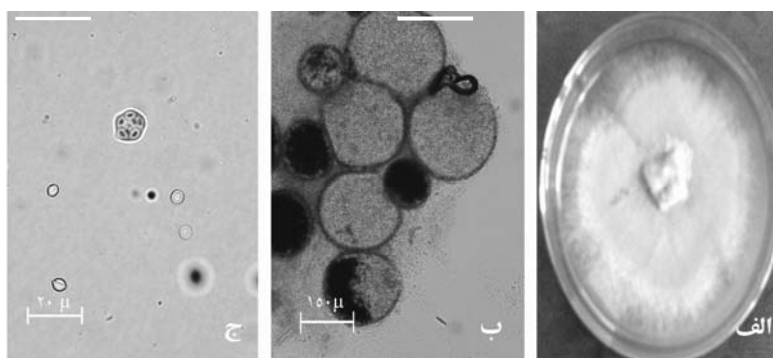
(الف: پرگنه بر روی PDA، ب: کنیدیوفور و کنیدی‌ها).

گونه *Penicillium implicatum*: پرگنه بر روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد ابتدا به رنگ سفید پنبه‌ای که در نهایت به رنگ سبز-آبی پودری شکل بود. رشد قطری پرگنه بعد از سه روز به ۲/۶ سانتی‌متر رسید (شکل ۷- الف). کنیدیوفورها به صورت انفرادی از میسلیم رویشی خارج و در نزدیک به انتها به شکل جارویی منشعب و به فیالیدها ختم شدند. ارتفاع کنیدیوفور ۲۵-۵۰ میکرومتر و طول فیالیدها ۱۰-۸ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها کروی، به رنگ سبز تقریباً تیره، ۲-۳/۵ میکرومتر، یک سلولی، به صورت زنجیره‌هایی که جوان‌ترین کنیدی در قاعده زنجیره قرار داشت، تشکیل شدند (شکل ۷- ب).



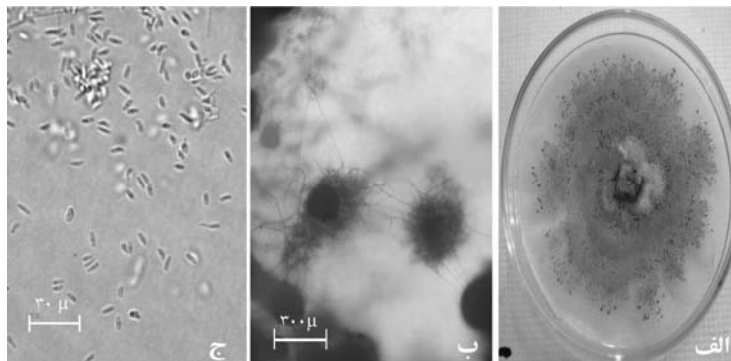
شکل ۷- *Penicillium implicatum* جداسازی شده از بذر بلندمازو (الف: پرگنه بر روی PDA، ب: کنیدیفور و کنیدی‌ها).

گونه *Eurotium rubrum*: پرگنه بر روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به رنگ نارنجی مایل به قرمز که در حاشیه سفید بود. بافت پرگنه پنبه‌ای و رشد قطری آن پس از سه روز به ۳/۵ سانتی‌متر رسید (شکل ۸-الف). آسکوکارپ از نوع کلیستوتس کروی تا تقریباً بیضوی و به رنگ زرد بود (شکل ۸-ب). آسک‌ها تقریباً کروی تا تخم‌مرغی، با اندازه ۱۳-۱۲ میکرومتر و دارای یک دیواره نازک و ناپایا بودند. آسکوسپورها یک سلولی با یک حلقه استوایی، با اندازه ۶/۸-۶/۲ × ۴/۵-۵ میکرومتر، بیضوی، زرد رنگ با حاشیه صاف و به صورت هشت‌تایی در داخل آسک قرار می‌گرفتند (شکل ۸-ج).



شکل ۸- *Eurotium rubrum* جداسازی شده از بذر بلندمازو (الف: پرگنه روی PDA، ب: کلیستوتس‌ها، ج: آسک و آسکوسپورها).

گونه *Diplodia sp.* پرگنه بر روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به رنگ زرد مایل به سفید که در زمینه آن دانه‌های سیاه رنگ مشخص بود (شکل ۹-الف). پیکنیدها سیاه، منفرد، کروی و روزنه‌دار بودند (شکل ۹-ب). کنیدیوفورها ظریف و ساده، کنیدیوم‌ها تیره، دو سلولی، ۵-۷ میکرومتری، بیضوی یا تخم‌مرغی شکل و در بعضی دارای انحنا بودند (شکل ۹-ج).



شکل ۹- *Diplodia sp.* جداسازی شده از بذر بلندمازو

(الف: پرگنه روی PDA، ب: پیکنید، ج: کنیدی‌ها).

قارچ *Penicillium implicatum* بیشترین فراوانی را در بین قارچ‌های نام‌برده داشت و در هر دو بخش بیرونی و درونی بذر مشاهده گردید که عامل عمده تخریب و از بین رفتن بذر بود. از علایم آن بر روی بذر، رنگ قهوه‌ای روشن یا قرمز و نامنظم هندسی است که به تدریج شکل لکه‌ها روی سطح بذر ادغام خواهند شد. میسلیم‌های سبز یا آبی روی این لکه‌ها قرار می‌گیرند و سبب پودری شدن و قهوه‌ای شدن بافت بذر می‌شوند. این قارچ باعث کاهش جوانه‌زنی در بذر شده و در نهایت بذرها را از بین می‌برد. علاوه بر بلوط بر روی بذرها، توس، راش و شاه‌بلوط هم مشاهده شده است (ساکولوا، ۲۰۰۱).

قارچ‌های *A. niger* و *A. flavus* جدایه‌هایی بودند که به ترتیب در هر دو بخش بیرونی (۴۶ و ۱۶ درصد) و درونی بذر (۲۷ و ۱۱ درصد) مشاهده شدند (جدول ۱). *A. flavus* در بخش درونی سبب به وجود آمدن لکه‌های زرد رنگ می‌شد که در نهایت باعث پودری شدن آن می‌گشت. *A. niger* در کنترل بعضی قارچ‌ها و در فرآیندهای صنعتی تولید اسید سیتریک و اسید گلوکانیک

کاربرد زیادی دارد (الکسوپولوس و همکاران، ۱۹۹۶). همچنین اکثر گونه‌های آسپرگیلوس به‌دلیل تولید میکوتوکسین و کاهش قدرت جوانه‌زنی بذور و رشد گیاهچه، مضر هستند. گلزار (۱۹۸۹) در تحقیقات خود نشان داد که عصاره قارچ *A. niger* نسبت به *A. flavus* باعث کاهش مؤثری در قدرت جوانه‌زنی بذور مورد بررسی گردید، در حالی که *A. flavus* در مراحل بعدی رشد گیاهچه، اثر منفی بیشتری دارد (گوش و ناندی، ۱۹۸۶). قارچ *A. flavus* به لحاظ تولید افلاتوکسین‌ها که متابولیت‌های بسیار سمی، جهش‌زا و سرطان‌زا هستند، اهمیت زیادی دارند.

قارچ *T. roseum* باعث کاهش قدرت جوانه‌زنی بذر بلوط می‌شود و به رنگ قهوه‌ای تیره تا تقریباً سیاه رنگ و به‌صورت لکه‌های نامنظم بر روی سطح بذرها، بیمار قرار می‌گیرد و از دسته قارچ‌های عامل کپک می‌باشد. این قارچ علاوه بر بلوط بر روی بذرها، افرا، توس، زبان گنجشک، پیسه‌آ و لاریکس نیز مشاهده شده است (ساکولووا، ۲۰۰۱).

قارچ *T. harzianum* از قارچ‌هایی بود که از روی سطح بذر جداسازی شد. این قارچ از قارچ‌های میکوپارازیت خاک‌زی بوده و روی چوب و بذرها هم رایج است (رهنما، ۲۰۰۱؛ الکسوپولوس و همکاران، ۱۹۹۶). قارچ *T. harzianum* به‌دلیل نامساعد کردن شرایط رویشی روی سایر بیمارگرها، از نظر مبارزه بیولوژیک اهمیت خاصی دارد. هارمن و کویبیسک (۱۹۹۸) طی تحقیقی که به عمل آوردند، از چند جدایه گونه‌های تریکودرما از جمله گونه ذکر شده جهت مبارزه بیولوژیک با بیمارگر عامل بوته‌میری به نام *Pythium spp.* استفاده نمودند و به نتایج قابل‌قبولی دست پیدا کردند. در ایران بر روی عوامل بیماری‌زا درختان جنگلی مانند نارون و بر علیه قارچ‌های خاک‌زی بیماری‌زای گیاهان زراعی با قارچ *T. harzianum* مطالعات زیادی انجام شده است (عراقی و همکاران، ۲۰۰۷؛ رهنما و همکاران، ۲۰۰۵).

تمامی قارچ‌های جداسازی شده در این تحقیق به‌جز قارچ *C. affinis* از روی پوسته بذر جدا گردیدند و این به‌دلیل تماس مستقیم بذر بعد از افتادن از درخت، با خاک است. یکی از مشکلات عمده عدم موفقیت نهال‌کاری‌های صورت گرفته در منطقه و همچنین قدرت جوانه‌زنی کم بذور، می‌تواند به‌دلیل جمع‌آوری آنها بعد از افتادن بر روی سطح خاک باشد. استیون (۱۹۹۲) طی تحقیقی نشان داد که اگر از تورهای معلق بر روی کف جنگل جهت جمع‌آوری بذرها، بلوط استفاده شود، میزان آلودگی تا حد قابل‌توجهی کاهش می‌یابد.

در این پژوهش قارچ *Penicillium* فراوانی بیشتری در بخش درونی داشت و قارچ *Trichoderma* فقط از روی پوسته بذر جداسازی شد که با مطالعات وینستون (۱۹۵۶) و داون (۲۰۰۳) مطابقت دارد. دورسی و همکاران (۱۹۶۲) قارچ *Penicillium* را از روی بذر گونه‌های بلوط سیاه و بلوط قرمز و نواک آگابا و گرادخی (۲۰۰۵) قارچ *Trichothecium roseum* از روی بذر *Q. pubescens* جداسازی نمودند که این قارچ‌ها در مطالعه ما نیز مشاهده شدند. همچنین تمامی گونه‌های به‌دست آمده در این تحقیق به‌جز قارچ‌های *Curvularia affinis* و *Eurotium rubrum*، در تحقیقات سانتوز و همکاران (۲۰۰۵) از بذرهای *Quercus suber* جداسازی شد.

نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که همه بذرهای بلندمازو جمع‌آوری شده کم و بیش به یک یا چند گونه از قارچ‌های جداسازی شده، آلوده بودند که اغلب آنها جزو شاخه قارچ‌های ناقص و یا آسکومیکوتا می‌باشند. از آنجایی که طول مدت خواب بذور بلوط و فرآیند فیزیولوژیک آنها بسیار زمان‌بر می‌باشد لذا این قبیل قارچ‌های فرصت طلب می‌توانند با توجه به تماس بذر با سطح زمین به آسانی به پوسته و یا داخل بذر راه یابند و بدین شکل مانع از قدرت جوانه‌زنی شوند. از سوی دیگر بذور بلندمازو از لحاظ مواد غذایی بسیار غنی‌تر از سایر بذور گیاهی هستند، به‌طوری‌که اندازه بزرگ بذر و سطح تماس زیاد آن نیز موضوع دیگری است که فرصت مناسبی را برای قارچ‌های پوده‌رست و پارازیت‌های اختیاری بیشتر فراهم نماید. همچنین تمامی قارچ‌های ذکر شده از روی بذر بلندمازو برای اولین بار در ایران گزارش می‌شود.

منابع

1. Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology 4 th Ed. John Willy and Sons, Inc. 869p.
2. Barnett, H.L., and Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4th Ed. ASP Press, St. Paul, Minnesota, USA, 218p.
3. Dawn, M.W. 2003. Fungi Associated with Northern red oak (*Quercus rubra*) acorns. The Davis College of Agriculture, Forestry, and Consumer Sciences at West Virginia University, 118p.
4. Dingra, O.D., and Sinclair, J.B. 1995. Basic Plant Pathology Methods. CRC Press, 434p.

5. Dorsey, C.K., Tryon, E.H., and Carvell, K.L. 1962. Insect damage to acorns in West Virginia and control studies using granular systematic insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 55: 885-888.
6. Ellis, M.B. 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. C.A.B International Mycological Institute, Kew, 608p.
7. Ellis, M.B. 1976. *More dematiaceous Hyphomycetes*. C.A.B International Mycological Institute, Kew, 507p.
8. Eriksson, D., Baral, H., Curren, R., Hansen, K., Kurtzman, G., and Laessle, T. 2006. *Outline of Ascomycota*. MycoNet, 109p.
9. Ershad, J. 1995. *Fungi of Iran*. Agricultural Research, Education and Extension Organization, 874p. (In Persian).
10. Games, W., and Bisst, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma* In: Kubicek, C.P., and Harman, G.E. *Trichoderma and Gliocladium, Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics*, Taylor & Francis, London, 278p.
11. Ghosh, J., and Nandi, B. 1986. Deteriorative abilities of some common storage fungi of wheat, *Seed Science and Technology*, 14: 141-149.
12. Gibson, I.A.S. 1957. Saprophytic fungi as destroyers of germinating pine seeds. *The East African Agricultural Journal*, 22: 203-206.
13. Golzar, H. 1989. Investigation the effect of several species of storage fungus on talent ability and seed wheat growth. *Plant Pathology*, 25: 1-9
14. Harman, G.E., and Kubicek, C.P. 1998. *Trichoderma* spp., including *T. harzianum*, *T. viride*, *T. koningii*, *T. hamatum* and other spp. Deuteromycetes, Moniliales (asexual classification system), *Biological Control and Commercial Applications*, 278p.
15. Hejazi, A. 1994. *Seed technology*. Tehran University Press, 442p. (Translated In Persian).
16. Huss, E. 1956. *Research into damage to tree seeds by dewinging*, Stockholm: Skogsforskinings-Institute, 39p.
17. Iraqi, M.M., Rahnema, K., Zafari, D., and Taghinasab, M. 2007. Investigating biological control of *Ophiostoma novo-ulmi*, causal agent of Dutch Elm Disease by *Trichoderma harzianum* and *T. virens* in vitro. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 14: 5. 178-191. (In Persian).
18. Litvinov, A.M. 1967. *Identify microscopic soil-born fungus*. Leningrad Science Press, 303p.
19. Mittal, R.K., and Mathur, S.B. 1998. *Seed Pathology*, Indian Council of Agricultural Research, New Delhi, India, and Danish Government Institute of Seed Pathology, Denmark, Pp: 177-190.
20. Novak Agbaba, S., and Gradecki, M. 2005. Health condition of common oak acorn (*Quercus pubescens*) and protection measures in Croatia. *Seed Health Symposium*, 58p.

21. Pitt, J.L. 1988. A laboratory guide to common *Penicillium* species (3rd ed.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization Division of Food Processing, 188p.
22. Pitt, J.L., and Hoching, A.D. 1997. Fungi and Food Spoilage, Blackie Academic & Professional, 593p.
23. Potlaichuk, V.I. 1953. Harmful microflora of acorns and its development in relation to the conditions of growth and storage, Bot. Z. 38: 135-142.
24. Rahnama, K. 2001. Importance of mycoparasite in order to control soilborn plant disease and introduction new composition of biologic. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 2: 111-121. (In Persian).
25. Rahnama, K., Mohammadzadeh, A., and Razavi, S.A. 2005. Investigation effect of PH and temperature on *Trichoderma koningii* growth and comparison with causal agent wheat spike fusariuz and antagonist activity against this pathogens. Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources, 12: 127-136.
26. Santos, M.N., Bragança, M.H., and Casimiro, P.P. 2005. Cork oak associated microorganisms throughout cork manufacture process. EFN, Lisboa, Portugal. 13: 1. 75-93.
27. Shea, K.R. 1957. Problem analysis: Molds of forest tree seed. [Place of publication unknown]: Weyerhaeuser Timber Company, Forestry Research Centre, 14p.
28. Singh, P., and Mathur, S.B. 1993. Disease problems of forest tree seeds: diagnosis and management, International Union of Forest Research Organizations Symposium of Project Group, Pp: 309-324.
29. Sokolova, E.P. 2001. Common fungal disease of Russian forest, USDA (United State Department of Agriculture Forest Service Northeastern Research Station), Pp: 6-11.
30. Steven, W. 1992. Insect and disease affecting oak regeneration success, USDA Forest Service, Pp: 105-110.
31. Urosevic, B. 1961. The influence of saprophytic and semi parasitic fungi on the germination of Norway spruce and scots pine seeds, International Seed Testing Association, 26: 3. 537-556.
32. Winston, P.W. 1956. The acorn microsphere, with special reference to arthropods. Ecology, 37: 120-132.



Gorgan University of Agricultural
Sciences and Natural Resources

J. of Wood & Forest Science and Technology, Vol. 16(2), 2009
www.gau.ac.ir/journals

Isolation and Identification of Fungi Associated with Chestnut-Leaved Oak (*Quercus castaneifolia*) Seed in Shast-Kalate Forest of Gorgan

*F. Faridi¹, M.R. Kavosi², K. Rahnama³ and S. Nasrolahnejad⁴

¹M.Sc. Student of Forestry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ²Assistant Prof., Dept. of Forestry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ³Associate Prof., Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ⁴Assistant Prof., Dept. of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Abstract

Chestnut-leaved Oak (*Quercus castaneifolia*) is one of the most important industrial species of the northern forests of Iran. Regeneration of this valuable species is limited due to several problems such as pests and the fungal diseases. In order to isolate and identify the fungi associated with Oak seed, sampling was carried out during 2007 in Shast-kalate forest at Gorgan. Collected seeds were separated into two sections: outer section of seed (crust) and inside seed section (endosperm) and then their surface was sterilized with 0.5% sodium hypochlorite. Each section of seed was separately tissue cultured on potato dextrose agar media in 4 replicates. After sub-culture and providing fungi pure cultures, various species isolated and identified by spore characteristics, their size and colour, including: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Curvularia affinis*, *Trichoderma harzianum*, *Trichothecium roseum*, *Eurotium rubrum*, *Penicillium implicatum*, and *Diplodia* sp. The fungi, *E. rubrum*, *T. roseum*, *T. harzianum*, and *Diplodia* sp. were observed only in the outer seed section by 35%, 41%, 7% and 23% frequency, respectively. The fungus *C. affinis* observed only inside seed section by 39 percent frequency. The fungi, *A. flavus*, *A. niger*, and *P. implicatum* were observed in the both sections of the seeds. The highest frequency of fungus related to *P. implicatum* by 74 percent frequency within seed section. The result indicates higher frequency and diversity of the fungi in the outer section of the seeds than within the seeds. Moreover, there is always a saprophyte fungus on the acorn seeds, during several isolations. This is the first report on fungi associated with Oak seed in Iran.

Keywords: Chestnut-leaved Oak, Fungi associated, Acorn, Shast-kalate forest

* Corresponding Author; Email: feridonfaridi@gmail.com