

شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی قارچ‌های اندوفیت سرشاخه و شاخه‌ی درختان بلوط در جنگل‌های ارسباران

سعید قاسمی اسفهلان^۱، مهدی ارزنلو^۲، اسداله بابای اهری^۲، محسن تربتی^۳ و ابوالفضل نورمانی^۳

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، رشته بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- استاد رشته قارچ‌شناسی و بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳- دانشجوی دوره دکتری، رشته قارچ‌شناسی و بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

نویسنده مسئول: arzanlou@hotmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۲۸

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۵

چکیده

طی دو دهه‌ی اخیر، علاقه‌ی فزاینده‌ای به مطالعه‌ی اندوفیت‌ها، منشاء و تنوع زیستی آنها، اثرات متقابلشان و گیاهان میزبان، نقش آنها در اکولوژی و همچنین خصوصیات شیمیایی و فعالیت‌های زیستی متابولیت‌های ثانویه‌ی تولید شده توسط آنها وجود دارد. در این تحقیق قارچ‌های اندوفیت سرشاخه و شاخه‌ی بلوط در جنگل‌های بلوط مناطق حاتم بیگ و کلیبر استان آذربایجان شرقی جداسازی شد و بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و داده‌های مولکولی شناسایی گردید. بدین منظور در طی ماه‌های تیر و شهریور ۱۳۹۳، از جنگل‌های حاتم بیگ مشگین‌شهر و کلیبر نمونه‌برداری صورت گرفت. هویت قارچ‌های جداسازی شده، پس از خالص‌سازی به روش تک‌اسپور و نوک‌ریسه، با بررسی‌های ریخت‌شناختی و داده‌های توالی ناحیه ITS-rDNA و TUB تعیین گردید. در این بررسی ۲۵ گونه‌ی قارچی شامل *Alternaria alternata* species complex، *Cladosporium*، *Chaetomium globosum*، *Biscogniauxia mediterranea*، *Aspergillus flavus*، *Arthrinium arundinis*، *D. vernicosa*، *D. palmensis*، *Daldinia loculata*، *Curvularia spicifera*، *Clonostachys rosea*، *cladosporioides*، *Nigrospora oryzae*، *F. solani*، *F. proliferatum*، *Fusarium oxysporum*، *Epicoccum nigrum*، *Discula quercina*، *Pyronema*، *P. spinulosum*، *Penicillium commune*، *Paecilomyces formosus*، *Ochrocladosporium elatum*، *Trichothecium roseum* و *S. sibirica*، *Sordaria fimicola*، *domesticum* بلوط در جنگل‌های این منطقه شناسایی شدند. همچنین گونه‌های قارچی شناسایی شده در این تحقیق برای نخستین بار در دنیا از روی بلوط سیاه (*Quercus macranthera*) گزارش می‌شوند و بلوط سیاه به عنوان میزبانی جدید برای این گونه‌ها معرفی می‌گردد. حضور این قارچ‌های اندوفیت در بافت‌های به ظاهر سالم درختان بلوط می‌تواند نشان‌گر این امر باشد که برخی از این گونه‌های قارچی ممکن است بیمارگرهای احتمالی نهفته گیاهی باشند.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، حاتم بیگ و کلیبر، بلوط سیاه، ITS-rDNA، TUB، ارسباران.

مقدمه

(Rezazade, 2003). درختان جنگلی با قارچ‌های اندوفیت

ارتباط همزیستی برقرار می‌کنند. این قارچ‌ها در داخل بافت‌های گیاهی سالم به صورت ریشه‌های غیرفعال زندگی می‌کنند. کلیه درختان جنگلی در نواحی معتدل، میزبان قارچ‌های اندوفیت می‌باشند. قارچ‌های متعلق به این گروه

جنس بلوط *Quercus* متعلق به تیره Fagaceae است که

این تیره دارای هشت جنس و هزار گونه در سراسر دنیا است. این جنس با داشتن بیش از ۶۰۰ گونه بزرگترین جنس تیره مذکور محسوب می‌شود (Masoudinejad and

Diplodia, *Botryosphaeria*, *Biscogniauxia* و *Sphaeropsis* اشاره کرد (Arnold et al., 2003). از قارچ‌های اندوفیتی که از سرشاخه‌ی درختان بلند مازو (*Q. cerris*) در ایتالیا جداسازی شده‌اند می‌توان به *Dicarpella dryina*, *Diplodia mutila*, *Phomopsis quercina* و *Dendrodochium* sp. اشاره کرد (Ragazzi et al., 2003; Gennaro et al., 2003). همچنین گونه‌هایی از جنس‌های *Nodulisporium* و *Phoma* از روی بلوط همیشه سبز (*Q. ilex*) در کشورهای اسپانیا، سوئیس و اوکراین جداسازی شدند (Fisher et al., 1994; Collado et al., 1996). گونه‌های *Colpoma quercina* و *A. errabunda* در استرالیا از روی بلوط سفید (*Q. petraea*) جداسازی شدند (Halmschlager et al., 1993). در ایتالیا از گونه بلوط قرمز اروپایی (*Q. pubescens*) قارچ‌های *A. quercina* و *P. quercina* جداسازی شده‌اند (Ragazzi et al., 2003). در یک بررسی که در اروپا روی میکروارگانیزم‌های کلونیزه کننده‌ی بافت‌های بلوط با علایم زوال صورت گرفت ۲۱۰ گروه قارچی، دو گروه کرومیستا، ۱۴ گروه باکتری، یک فیتوپلازما و یک ویروس شناسایی شدند (Ragazzi et al., 1995). از بین این گروه‌های قارچی می‌توان به گونه‌های *Armillaria A. quercina*, *Amphicytostroma quercinum*, *D. Coryneum quercinum*، *B. mediterranea* spp. و چندین اومیسست از قبیل گونه‌های جنس *Phytophthora* اشاره کرد. قاسمی و همکاران (Ghasemi et al., 2017) با استفاده از معیارهای ریخت شناختی و مولکولی گونه‌های مختلفی از جنس *Trichoderma* را به عنوان اندوفیت از درختان بلوط در جنگل‌های ارسباران ردیابی کردند. همچنین حاجی زاده و همکاران (Hajizadeh et al., 2015) گونه‌های مختلفی از قارچ‌های اندوفیت را از روی درختان بلوط از استان کردستان شناسایی کردند.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی جدایه‌های قارچی

جهت نمونه برداری، بازدیدهایی از جنگل‌های حاتم‌بیگ مشکین شهر و کلیبر استان آذربایجان شرقی طی ماه‌های

همه‌جاری بوده و تنوع زیستی زیادی در میان آنها وجود دارد و امکان دارد که برخی از گونه‌های گیاهی با بیش از صد گونه قارچ اندوفیت در تعامل باشند (Amal et al., 2011). با این وجود، اغلب قارچ‌های اندوفیت از تخصص میزبانی برخوردار بوده و جمعیت تعداد معدودی از گونه‌های قارچی اندوفیت بسته به گیاه میزبان از فراوانی بالایی برخوردار می‌باشد. در نهان‌دانگان، قارچ‌های متعلق به راسته Diaportales غالب می‌باشند، در حالیکه در بازدانگان، اعضاء راسته Helotiales غالب می‌باشند (Thomas, 2007). طبق نظر (Schulz and Boyle, 2005) میزبان ممکن است از طریق القای متابولیت‌های دفاعی، تولید فیتوهورمون‌ها، تأمین مواد غذایی از ریزوسفر و افزایش فعالیت‌های متابولیکی در برابر عوامل بیماری‌زا، از تعامل با اندوفیت‌ها سود ببرد. اندوفیت‌ها در حالت عمومی از جنبه‌های مختلف به میزبان خود سود می‌رسانند. از مزایای اندوفیت‌ها به میزبان گیاهی می‌توان به افزایش تحمل خشکی، افزایش مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی، افزایش میزان رشد و بازدهی گیاه و دفاع از گیاه میزبان در برابر علف‌خوارها اشاره کرد. این ویژگی‌ها همراه با تنوع بیوشیمیایی قابل توجه در متابولیت‌های آنها دانشمندان را برآن داشته که تا از این میکروارگانیزم‌ها به عنوان منابع ارزشمند برای دستیابی به داروهای جدید استفاده نمایند. در برخی موارد گیاهان مرتبط با اندوفیت‌ها، در مقابل بیمارگرهای گیاهی به ویژه قارچ‌ها و نامتدها مقاومت بیشتری نشان می‌دهند (Zabalgoceazcoa, 2008). همچنین اندوفیت‌های درختان می‌توانند با محافظت از آنها در برابر دشمنان‌شان (Saikkonen et al., 1998; Arnold et al 2003; Lorenzi et al., 2006) و در مقابل انواع تنش‌ها (Tan and Zou, 2001) باعث بهبود شادابی درختان شوند. از اندوفیت‌هایی که در سیستم‌های مختلف مانند باغات، گلخانه‌ها، مزارع و جنگل‌ها در همه دنیا مهم‌اند می‌توان به جنس‌های قارچی *Nectria*, *Phoma*, *Apiognomonina*, *Alternaria*, *Discula*, *Fusarium*, *Hypoxylon*، *Lasiodiplodia*

در مورد تعدادی از جدایه‌های قارچی ناحیه ITS-rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز تکثیر گردید. جهت تکثیر ناحیه ITS-rDNA آغازگر رفت ('5TCCGTAGTTGGACCTGCGG3') و برگشت ('5TCCTCCGCTTATTGATATGC3') در جدایه‌ها مورد استفاده قرار گرفت (White et al., 1990). این آغازگرها بخشی از ناحیه ۲ زیر واحد کوچک DNA ریبوزومی (SSU-rDNA)، ناحیه ITS1 و ITS2، ۵/۸S و بخشی از ناحیه ۵ زیر واحد بزرگ DNA ریبوزومی (LSU-rDNA) را تکثیر می‌کنند. این جفت آغازگر قطعه‌ای به طول ۵۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز را تکثیر می‌نمایند. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش (IX PCR buffer)، ۱/۵ میلی‌مول کلریدمنیزیم، ۰/۲ میلی‌مول از هر dNTP، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۰/۵ واحد آنزیم پلی‌مراز (Taq DNA polymerase) و ۱۰ الی ۱۵ نانوگرم از DNA الگو را شامل می‌شد. حجم واکنش با استفاده از آب دیونیزه استریل به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (GenAmp PCR System 9700) و با اعمال حرارت ۹۵ °C به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت‌سازی اولیه و به دنبال آن چرخه شامل ۹۴ °C به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۶ °C به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ °C به مدت ۶۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه ۷۲ °C به مدت هفت دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. دمای دستگاه پس از انجام واکنش روی ۱۰ °C برای مدت نامعلوم (جهت جلوگیری از تجزیه و تخریب محصول PCR) تنظیم گردید. محصولات واکنش PCR از ژل آگاروز یک درصد حاوی اتیدیوم بروماید در بافر 1× TAE (20 mM acetic acid، 1mM EDTA (PH=8)) عبور داده شد و عکس‌برداری با استفاده از دستگاه تصویربرداری از ژل (Gel Documentation) انجام شد. واکنش ترادف‌یابی نوکلئوتیدی بوسیله کیت تجارتي بیگ‌دای BigDye® Terminator V301 Cycle Sequencing kit ساخت کارخانه Applied Biosystems کالیفرنیا آمریکا و مطابق دستورالعمل کارخانه صورت-

مرداد و شهریور سال ۱۳۹۳ بعمل آمد. نمونه‌ها بلافاصله بعد از انتقال به آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفتند. جداسازی اندوفیت‌ها مطابق پروتکل‌های مربوطه رایج (Helander, 2007; Blumenstein, 2010) انجام گرفت. بدین صورت که ابتدا با استفاده از اسکالپل و یا چاقوی تیز استریل قطعاتی به اندازه ۳-۵ سانتی متر از بافت‌های چوب و پوست جداسازی شد. نمونه‌ها به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۵ درصد غوطه‌ور شدند، بعد از آن بلافاصله در هیپوکلریت سدیم چهار درصد (تجاری) به مدت پنج دقیقه قرار داده شده و بعد از این مرحله نمونه‌ها به مدت ۱۵ ثانیه با استفاده از اتانول ۷۵ درصد ضدعفونی شدند. نمونه‌ها سپس با استفاده از آب مقطر استریل سه بار شست‌شو داده شدند و به مدت پنج دقیقه با استفاده از کاغذ صافی استریل خشک آب‌گیری شدند. سپس قطعات در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت عصاره مالت آگار دو درصد (MEA) کشت داده شدند. برای ممانعت از رشد باکتری‌ها به میزان صد میلی‌گرم بر لیتر کلرامفنیکل به محیط کشت اضافه شد. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه ی سانتی‌گراد نگهداری و جدایه‌های قارچی رشد کرده پس از ثبت ویژگی‌های ظاهری خالص‌سازی شدند. خالص‌سازی قارچ‌ها به روش تک اسپور و یا نوک ریشه کردن انجام شد. سپس خصوصیات ریخت شناختی جدایه‌ها مورد مطالعه قرار گرفت.

استخراج DNA

برای این منظور، جدایه‌ها روی محیط کشت عصاره مالت آگار دو درصد (MEA) به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه ی سانتی‌گراد و در تاریکی رشد داده شدند و DNA ژنومی با استفاده از روش مولر و همکاران (Moller et al., 1992) استخراج گردید. پس از اتمام عملیات استخراج، کمیته و کیفیت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری مورد بررسی قرار گرفت.

تکثیر ناحیه ITS-rDNA و آنالیز فیلوژنتیک

xylarioides strain CBS 127883 (GenBank accession MH-864741) نیز به عنوان آرایه خارجی به کار گرفته شد. تجزیه و تحلیل بیژین، منتهی به ۸۹۲ تبارنما گردید. بعد از حذف ۲۵ درصد از تبارنماهای جمع آوری شده برای مرحله burn-in تبارنمای اجمالی و توزیع احتمال پسین خوشه ها از ۶۷۰ تبارنمای باقی مانده محاسبه گردید. بر اساس نتایج به دست آمده، جدایه های مورد مطالعه با اعتبارسنجی بالایی به همراه سایر جدایه های اخذ شده از بانک ژن (شکل ۱) گروه بندی شدند. توصیف گونه های کمتر شناخته شده برای مایکوبیوتای ایران به ترتیب حروف الفبا به قرار زیر می باشد:

تاکسونومی

***Arthrimum arundinis* (Corda) Dyko and B. Sutton. 1979. Mycotaxon. 8 (1): 119.**

پرگنه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه ی سانتی گراد و شرایط تاریکی، مسطح، نمادی، دارای میسلیم های هوایی متراکم، به رنگ خاکستری و قطر آن پس از یک هفته به ۷۰ میلی متر می رسید. میسلیم متشکل از ریشه های هوایی و غوطه ور در آگار، شفاف تا نیمه شفاف، منشعب، دیواره دار و به قطر ۴-۲ میکرومتر بود. کنیدیوفورها مستقیم، دیواره دار، بی رنگ تا قهوه ای کم رنگ، صاف و به سلول های کنیدیوم زا کاهش یافته بودند. سلول های کنیدیوم زا بی رنگ، دارای سطح صاف، به اشکال متنوع (بشکله ای شکل تا گریزی) و در اندازه های ۴-۶ × ۴-۶ میکرومتر بودند. کنیدیوم ها قهوه ای، دارای سطح صاف، از دو طرف مسطح، از سطح فوقانی به شکل گرد تا نیمه گرد، از سطح جانبی عدسی شکل، به قطر ۶-۵ میکرومتر و به ضخامت ۴-۵ میکرومتر بودند. ساختارهای عقیم قهوه ای تا قهوه ای روشن، گریزی شکل کشیده و در اندازه های متفاوت نیز مشاهده شد.

جنس *Arthrimum* از رده Sordariomycetes، راسته *Xylariales* و خانواده *Apiosporaceae* می باشد. اعضای این جنس با مرحله جنسی *Apiospora* Sacc.

گرفت. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از دستگاه ABI 3700® persim انجام شد. توالی نوکلئوتیدی با نرم افزار (Lasergene package, DNASTar, Madison, SeqMan USA) بررسی و ویرایش شد و با استفاده از نرم افزار برخط بلاست (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) با توالی های موجود در بانک ژن مقایسه و توالی های با درصد مشابهت بالا از بانک ژن (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) دریافت گردیدند. رج بندی توالی ها با استفاده از نرم افزار MEGA6 انجام شد (Tamura et al., 2013). ترسیم تبارنما با روش بیژین با استفاده از نرم افزار MrBayes v. 3.2.2 انجام شد (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). آزمون اعتبار سنجی به روش احتمال پسین انجام شد و تعیین مدل ها بر اساس نتایج نرم افزار مستر مدل تست انجام شد (Nylander, 2004).

نتیجه و بحث

در این تحقیق ۲۵ گونه ی قارچی شناسایی گردید که در بین گونه های قارچی جداسازی شده، *Alternaria alternata* species complex بیشترین فراوانی را داشت. گونه های *Trichothecium roseum* و *Biscogniauxia mediterranea* از نظر فراوانی در رتبه های بعدی واقع شدند. اطلاعات مربوط به جدایه های قارچی در جدول ۱ ذکر شده است.

فیوژنی

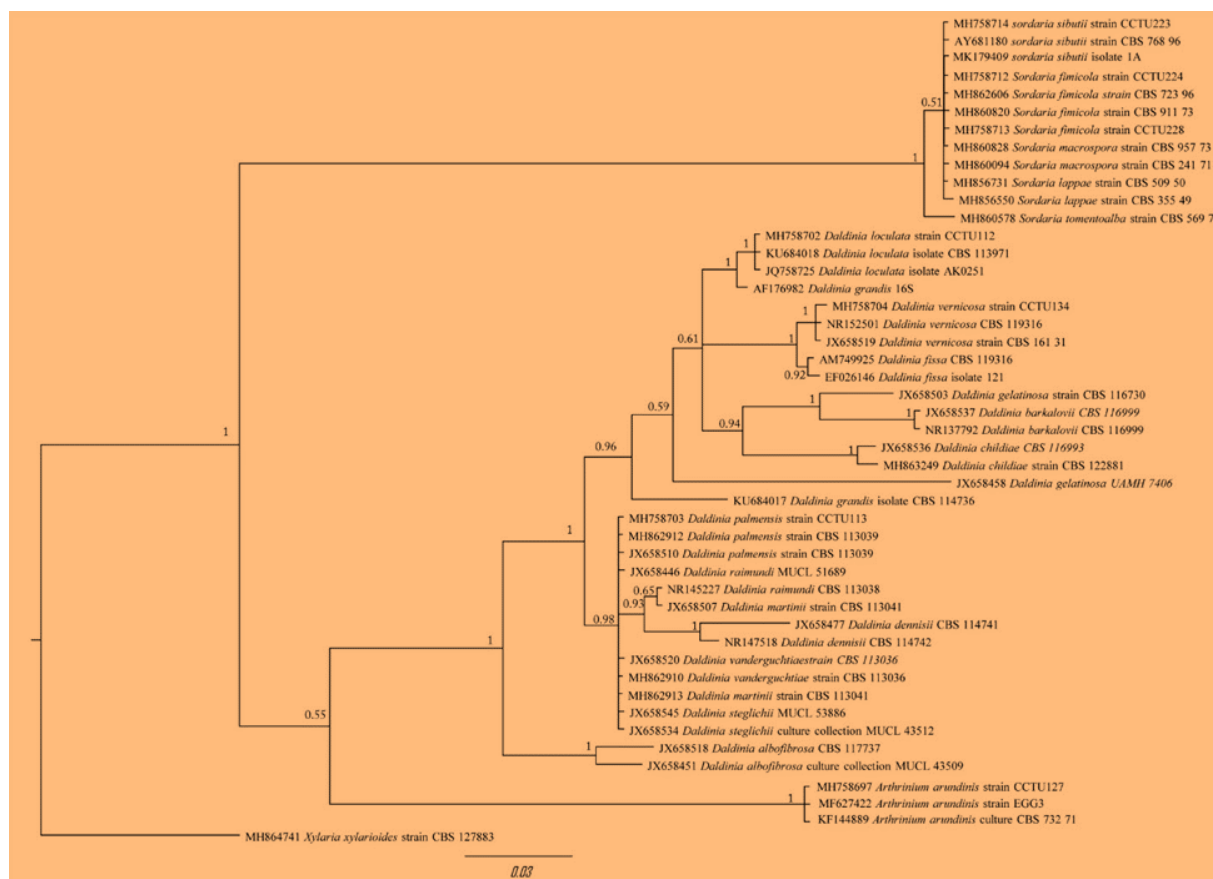
تبارنما با استفاده از نرم افزار بیژین بر مبنای ناحیه ژنی ITS برای جدایه های مورد مطالعه در این تحقیق و جدایه های موجود در بانک ژن ترسیم شد. فایل رج بندی شده نهایی شامل ۴۶ آرایه ی داخلی، ۱۰۰۶ کاراکتر و ۲۵۳ الگوی مکانی منحصر بفرد بود. بر اساس نتایج نرم افزار مدل تست، بهترین مدل جایگزینی SYM+G بود. کلیه ی ژن ها فراوانی dirichlet base داشتند. گونه *Xylaria*

(*Apiosporaceae*) به عنوان اندوفیت، بیمارگر گیاهی یا ساپروفیت شناخته می‌شوند و به طور گسترده در شرایط

جدول ۱- فهرست جدایه‌های قارچ‌های اندوفیت بازیافت شده از درختان بلوط جنگل‌های ارسباران

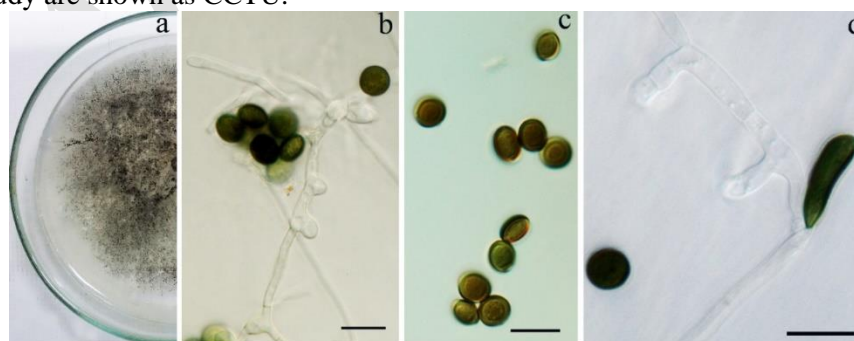
Table 1. List of endophytic fungal isolates recovered from oak trees in Arasbaran forests

Isolates (جدایه‌ها)	Fungal species (گونه‌های قارچی)	GenBank Accession number (راس شمار)	
		ITS	TUB
CCTU136	<i>Alternaria alternata</i>	MH754657	-
CCTU137	<i>A. alternata</i>	MH754658	-
CCTU127	<i>Arthrinium arundinis</i>	MH758697	-
CCTU145	<i>Aspergillus flavus</i>	MH758698	-
CCTU120	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>	KX267747	-
CCTU123	<i>B. mediterranea</i>	KX267750	-
CCTU147	<i>B. mediterranea</i>	MH754668	-
CCTU107	<i>Chaetomium globosum</i>	MH758699	-
CCTU240	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	-
CCTU117	<i>Clonostachys rosea</i>	MH758700	-
CCTU239	<i>Curvularia spicifera</i>	-	-
CCTU112	<i>Daldinia loculata</i>	MH758702	-
CCTU113	<i>D. palmensis</i>	MH758703	-
CCTU134	<i>D. vernicosa</i>	MH758704	-
CCTU104	<i>Discula quercina</i>	MH758705	-
CCTU118	<i>Epicoccum nigrum</i>	MH758719	-
CCTU193	<i>Fusarium oxysporum</i>	-	MH760733
CCTU194	<i>F. proliferatum</i>	-	MH760734
CCTU195	<i>F. proliferatum</i>	-	MH760735
CCTU187	<i>F. solani</i>	-	MH760736
CCTU188	<i>F. solani</i>	-	MH760737
CCTU189	<i>F. solani</i>	-	MH760738
CCTU124	<i>N. oryzae</i>	MH754661	-
CCTU125	<i>N. oryzae</i>	MH754659	-
CCTU133	<i>N. oryzae</i>	MH754660	-
CCTU108	<i>Ochrocladosporium elatum</i>	MH758711	-
CCTU132	<i>O. elatum</i>	MH758710	-
CCTU105	<i>Paecilomyces formosus</i>	MH758716	-
CCTU114	<i>P. formosus</i>	MH758717	-
CCTU140	<i>P. formosus</i>	MH758718	-
CCTU150	<i>Penicillium commune</i>	MH758707	-
CCTU130	<i>P. spinulosum</i>	MK046735	-
CCTU139	<i>Pyronema domesticum</i>	MH758708	-
CCTU143	<i>P. domesticum</i>	MH758709	-
CCTU228	<i>Sordaria fimicola</i>	MH758713	-
CCTU14.1	<i>S. fimicola</i>	MH758712	-
CCTU223	<i>S. sibirica</i>	MH758714	-
CCTU142	<i>Trichothecium roseum</i>	MH758706	-



شکل ۱- تبارنمای اجمالی برآیند ۱۰۰۶ تبارنمای حاصل از استنتاج بیژین رج بندی توالی ناحیه ITS-rDNA. مقیاس، ۰/۰۳ تغییر مورد انتظار در هر مکان را نشان می‌دهد. گونه *Xylaria xylarioides* به عنوان آرایه خارجی در نظر گرفته شده است. گونه های شناسایی شده در این پژوهش با CCTU مشخص شده است.

Figure 1. Consensus phylogram of 1006 trees resulting from a Bayesian analysis of the ITS-rDNA dataset. The scale bar shows 0.03 expected changes per site. The tree was rooted to *Xylaria xylarioides*. Sequence data generated in this study are shown as CCTU.



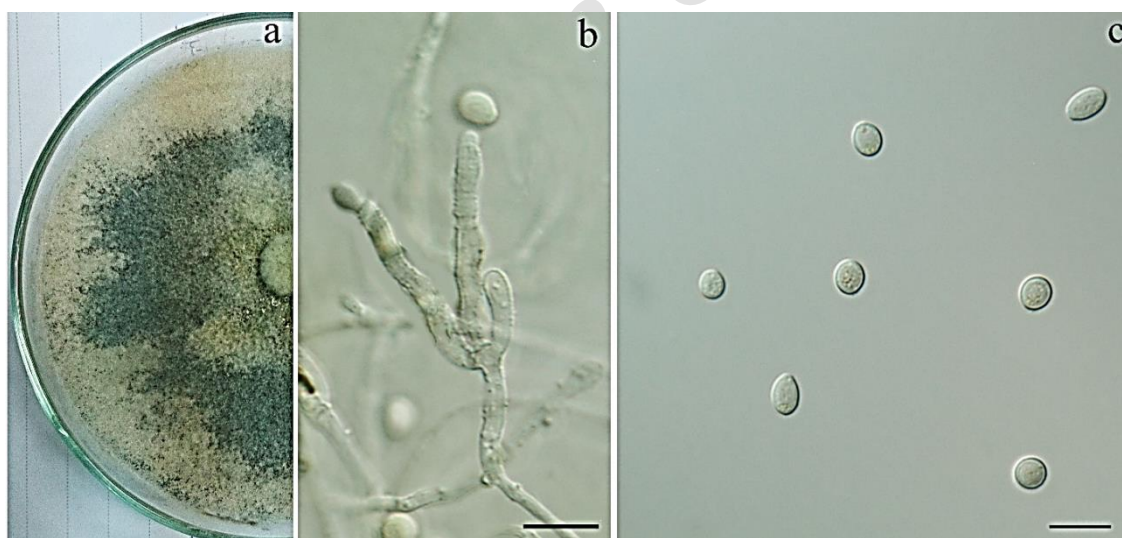
شکل ۲- *Arthrinium arundinis*. a: پرگنه ده روزه روی محیط کشت PDA. b: کنیدیوفورها و کنیدیومها. c: کنیدیومها. d: ساختار عقیم. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

Figure 2. *Arthrinium arundinis*. a: ten-day old colony on PDA. b: conidiophores and conidial cells. c: conidia. d: sterile structure. Scale bars = 10 μ m.

***Daldinia loculata* (Lev.) Sacc. 1882. Sylloge Fungorum. 1: 394.**

پرگنه روی محیط کشت OA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و قرار گرفتن در شرایط تاریکی ابتدا سفید، نمدی، با گذشت زمان به رنگ سبز زیتونی تا خاکستری تغییر می‌یافت و قطر آن پس از هفت روز به ۸۰ میلی‌متر می‌رسید. در روی محیط کشت مرحله‌ی غیرجنسی قارچ توسعه پیدا کرد. کنیدیوفورها حداکثر به طول ۱۰۰ میکرومتر و به عرض ۳/۵-۴ میکرومتر و عمدتاً دارای دو انشعاب، بی‌رنگ، صاف تا زبر، با ۱-۳ سلول کنیدیوم‌زا در انتها بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا، استوانه‌ای شکل، بی‌رنگ، صاف تا زبر، کنیدیوم‌زایی به شیوه آنیلیدیک (دارای حلقه‌هایی در محل آزاد شدن کنیدی‌ها) و در اندازه‌های ۳/۵-۴ × ۲۰-۱۱ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ، صاف، کروی تا نیمه کروی و در اندازه‌های ۴-۵ × ۶-۷ میکرومتر بودند.

محیط متنوعی زندگی می‌کنند (Crous and Groenewald, 2013; Sharma et al., 2014) برخی گونه‌های این جنس بیمارگر انسان هستند (Sharma et al., 2014). همچنین این قارچ‌ها در صنعت داروسازی کاربرد فراوان دارند. در شناسایی گونه‌های این جنس بر پایه صفات ریخت-شناختی، وجود یا عدم وجود ساختارهای عقیم، رنگ، شکل و ابعاد سلول‌های کنیدیوم‌زا و کنیدیوم‌ها مورد استفاده قرار گرفت. بر اساس این صفات گونه‌ی حاضر *A. arundinis* شناسایی شد. این گونه بیشترین تشابه را با گونه *A. sacchari* Ellis. داشت. با این حال، کنیدیوفور-های *A. sacchari* عریض‌تر از *A. arundinis* است، اما این ویژگی در محیط‌های کشت مصنوعی زیاد مشخص نیست و بنابراین تفاوت‌های موجود در ابعاد کنیدیوم و قطر ریشه‌هایی که بر روی آنها سلول‌های کنیدیوم‌زا تشکیل می‌شوند، ملاک تمایز این دو گونه قرار داده می‌شود (Crous and Groenewald, 2013).



شکل ۳- *Daldinia loculata* a: پرگنه چهارده روزه روی محیط کشت OA. b: کنیدیوفور و سلول‌های کنیدی‌زا. c: کنیدی‌ها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

Figure 3. *Daldinia loculata*. a: four-day old colony on OA. b: conidiophores and conidial cells. c: conidia. Scale bars = 10 μ m.

***Daldinia palmensis* M. Stadler, Wollw. & Tichy, Mycological Research 108 (3): 265 (2004)**

نمدی، با گذشت زمان به رنگ قهوه‌ای تا خاکستری تغییر می‌یافت و قطر آن پس از هفت روز به ۸۰ میلی‌متر می‌

پرگنه روی محیط کشت OA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و قرار گرفتن در شرایط تاریکی ابتدا سفید،

رنگ، صاف تا زبر، کنیدی‌زایی پلی بلاستیک، محل کنیدی زایی برآمده و ۳-۴ × ۱۰-۲۵ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ صاف تا زبر، بیضوی و در اندازه‌های ۳-۴ × ۶-۸ میکرومتر بودند.

رسید. در روی محیط کشت مرحله غیر جنسی قارچ توسعه پیدا کرد. کنیدیوفورها حداکثر به طول ۳۰۰ میکرومتر و به عرض ۳-۳/۵ میکرومتر و دارای ۱-۳ انشعاب، بی‌رنگ، صاف تا زبر، با ۲-۴ سلول کنیدیوم‌زا در انتها بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا استوانه‌ای شکل، بی



شکل ۴- *Daldinia palmensis*: a: پرگنه چهارده روزه روی محیط کشت OA. b: کنیدیوفورها و سلول‌های کنیدیوم‌زا. c: کنیدیوم‌ها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

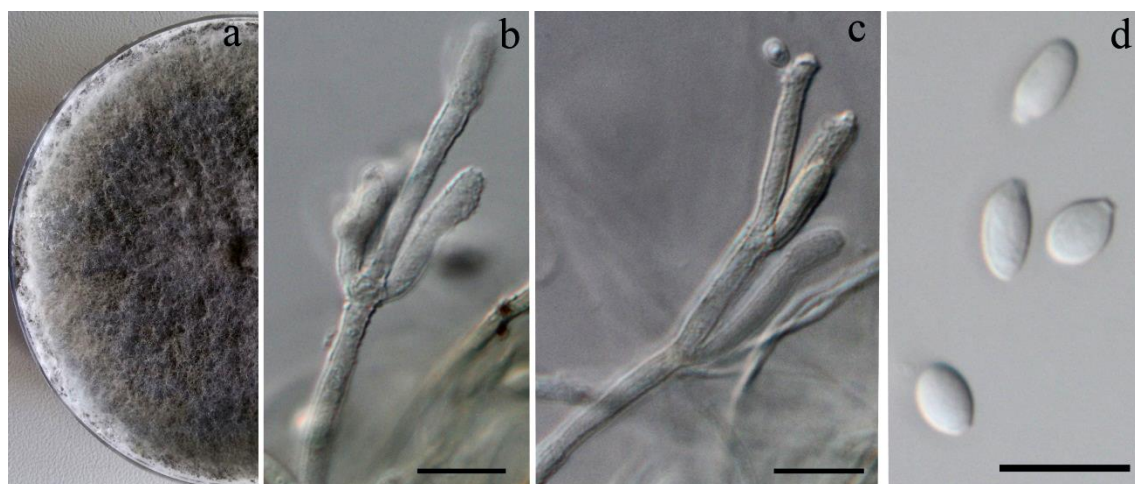
Figure 4. *Daldinia palmensis*. a: four-day old colony on OA. b: conidiophores and conidial cells. c: conidia. Scale bars = 10 μ m.

× ۱۵۰-۱۰ میکرومتر بودند. کنیدیوم‌ها بی‌رنگ صاف، بیضوی و در اندازه‌های ۳-۴ × ۵-۷ میکرومتر بودند.

جنس *Daldinia* از رده Sordariomycetes، راسته Xylariales و خانواده Xylariaceae می‌باشد. شناسایی گونه‌های این جنس براساس ویژگی‌های مرحله جنسی صورت می‌پذیرد. در تحقیق حاضر این قارچ‌ها از بافت‌های سالم میزبان به‌عنوان اندوفیت جداسازی شدند. لذا مرحله-ی جنسی آنها نه در شرایط طبیعی و نه در شرایط آزمایشگاهی مشاهده نگردید. بر اساس ژو و راجرز (Ju and Rogers, 1996) مرحله‌ی غیرجنسی *Daldinia* عموماً *Nodulisporium* می‌باشد. با این اوصاف مرحله‌ی غیرجنسی *Daldinia* در گذشته جنس‌های مختلف معرفی شده است. بر اساس ژو و راجرز (Ju and Rogers, 1996) مرحله‌ی غیرجنسی *Daldinia* *Sporothrix*-like، *Virgariella*-like

Daldinia vernicosa Ces. & De Not., *Commentario della Società Crittogamologica Italiana* 1 (4): 198 (1863).

پرگنه روی محیط کشت OA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و قرار گرفتن در شرایط تاریکی ابتدا سفید، نمدی، با گذشت زمان به رنگ سبز زیتونی تا خاکستری تغییر می‌یافت و قطر آن پس از هفت روز به ۸۰ میلی‌متر می‌رسید. در روی محیط کشت مرحله‌ی غیرجنسی قارچ توسعه پیدا کرد. کنیدیوفورها حداکثر به طول ۱۵۰ میکرومتر و به عرض ۳-۴ میکرومتر و عمدتاً دارای ۱-۳ انشعاب، بی‌رنگ، صاف تا زبر، با ۱-۳ سلول کنیدیوم‌زا در انتها بودند. سلول‌های کنیدیوم‌زا بصورت پلی بلاستیک، استوانه‌ای شکل، بی‌رنگ، صاف تا زبر، دارای خمیدگی-های زانویی شکل در محل کنیدی‌زایی و در اندازه‌های ۳-۴



شکل ۵- *Daldinia vernicosa*: a: پرگنه چهارده روزه روی محیط کشت OA. b-c: کنیدیوفور و سلول‌های کنیدیوم‌زا. d: کنیدیوم‌ها. مقیاس = ۱۰ میکرومتر.

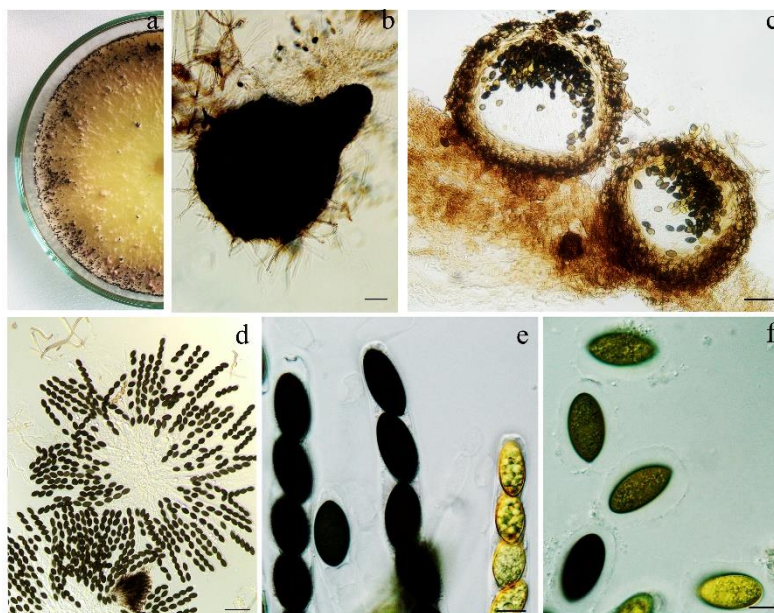
Figure 5. *Daldinia vernicosa*. a: four-day old colony on OA. b: conidiophores and conidial cells. c: conidia. Scale bars = 10 μm.

پس از هفت روز به ۹۰ میلی متر می‌رسید. آسکوکارپ از نوع پریتسیوم، بصورت انفرادی و بعد از هفت روز روی محیط کشت تشکیل آنها شروع شده و قابل مشاهده بودند. پریتسیوم‌ها در سطح محیط کشت و اندکی فرورفته در محیط تشکیل می‌شدند. شکل پریتسیوم از تخم مرغی تا گلابی شکل متفاوت بود. رهاسازی آسکوسپورها از تک مجرای استیولی واحد صورت می‌پذیرفت و در اندازه‌های حداکثر به طول ۶۰۰ میکرومتر و به عرض حداکثر ۳۵۰ میکرومتر بودند. آسک‌ها حاوی هشت عدد آسکوسپور، استوانه‌ای شکل و در اندازه‌های (۴۳-۳۸-۳۴-۲۵) × (۲۵۰-۲۳۱-۲۱۷-۱۷۰) میکرومتر بودند. آسکوسپورها تاریک، تک سلولی، بیضی شکل، نزدیک به متساوی الاضلاع با دو انتهای گرد شده، صاف، دارای غلاف ژلاتینی و در اندازه‌های (۱۳-۱۲-۱۱-۱۰) × (۲۲-۲۵-۲۱-۱۸) میکرومتر بودند.

Periconiella- Annelosporium Nodulisporium-like می‌باشد. براساس صفات ریخت‌شناختی مرحله‌ی غیرجنسی گونه *D. loculata* *Annelosporium* و مرحله‌ی غیرجنسی دو گونه *D. palmensis* و *D. Vernicosa*، *Nodulisporium-like* تشخیص داده شدند که با منابع موجود (Ju and Rogers, 1996) مطابقت داشت. با وجود این، به دلیل عدم دسترسی به صفات مورفولوژیک مرحله‌ی جنسی برای تشخیص دقیق گونه‌ها، نام این گونه‌ها بر اساس بیشترین تشابهی که (۱۰۰ درصد یا کمی کمتر) توالی‌های این گونه‌ها با توالی‌های مرجع و معتبر در بانک ژن داشتند، انتخاب شدند.

***Sordaria fimicola* (Roberge ex Desm.) Ces. and De Not. 1863.**

پرگنه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و شرایط تاریکی، به رنگ سفید مایل به خاکستری، دارای ریشه‌های هوایی، سریع‌الرشد و قطر آن



شکل ۶- *Sordaria fimicola*: a: پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA. b: آسوکارپ از نوع پریسیوم. c: برش عرضی آسوکارپ. d-e: آسکها. f: آسکوسپورهای دارای غلاف. مقیاس: b-d = ۵۰ میکرومتر؛ e-f = ۱۰ میکرومتر.

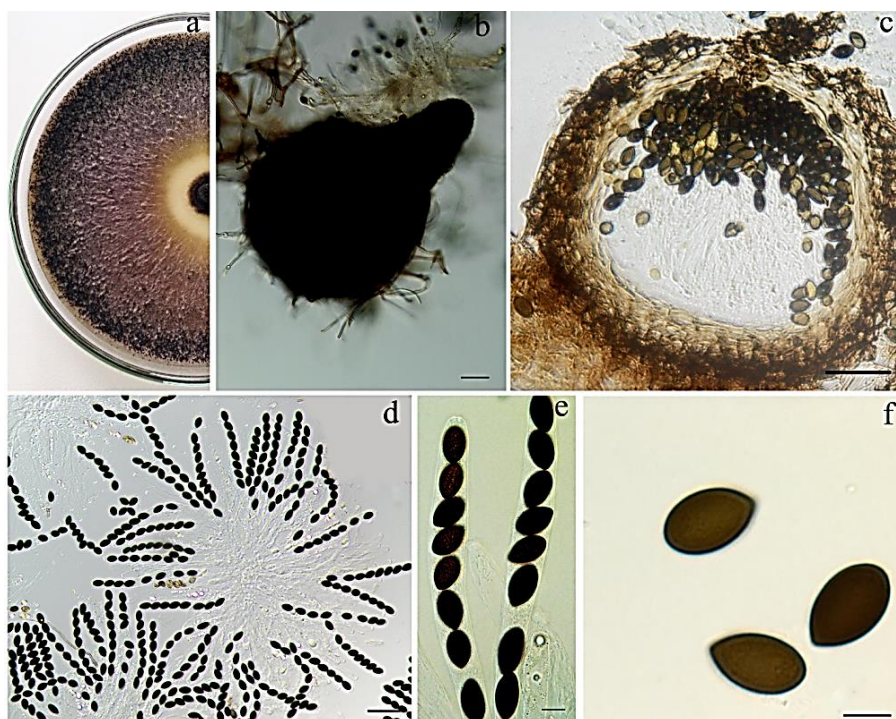
Figure 6. *Sordaria fimicola*. a: seven-day old colony on PDA. b: ascocarp (perithecium). c: ascocarp. d-e: ascus. f: ascospores. Scale bars: b-d = 50 μ m, e-f = 10 μ m.

شکل، نزدیک به متساوی الاضلاع با دو انتهای گردشده، صاف، فاقد غلاف ژلاتینی و در اندازه‌های (۱۳-۱۲-۱۱) × (۹-۲۲) × (۲۰-۱۹-۱۶) میکرومتر بودند.

گونه *S. sibirii* با *S. fimicola* از لحاظ مولکولی و بر اساس توالی ITS در دو نوکلئوتید با هم تفاوت دارند و بسیار به هم نزدیک هستند. از لحاظ ویژگی‌های ریخت شناختی بر اساس اندازه و شکل آسکوسپورها به این دو گونه مشابهت بالایی دارند اما وجود آسکوسپورهای با دیواره صاف و فاقد غلاف ژلاتینی در *S. sibirii* آن را از *S. fimicola* تفکیک می‌کند. همچنین سرعت رشد بیشتر *S. sibirii* روی محیط غذایی PDA آن را از گونه *S. fimicola* تفکیک می‌کند (هاندورف و همکاران ۲۰۰۴، کی و همکاران ۲۰۰۶) (Huhndorf et al., 2004; Cai et al., 2006). همچنین در این تحقیق گونه‌های *Alternaria alternata* species complex *Biscogniauxia* *Aspergillus flavus* *Chaetomium* *Curvularia specifera mediterranea*

Sordaria sibirii (Cailleux) Arx & Guarro. 1987. *Persoonia*. 13 (3): 268.

پرگنه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه ی سانتی گراد و شرایط تاریکی، به رنگ سفید مایل به تیره، دارای ریشه‌های هوایی، سریع‌الرشد و قطر آن پس از هفت روز به ۹۰ میلی متر می رسید. آسوکارپ از نوع پریسیوم، بصورت انفرادی و بعد از هفت روز روی محیط کشت تشکیل آنها شروع شده و قابل مشاهده بودند. پریسیوم‌ها در سطح محیط کشت و اندکی فرورفته در محیط تشکیل می‌شدند. شکل پریسیوم از تخم مرغی تا گلابی شکل متفاوت بود. آسوکارپ دارای گردن بود، رهاسازی آسکوسپورها از تک مجرای استیولی واحد صورت می‌پذیرفت و در اندازه‌های حداکثر به طول ۶۲۵ میکرومتر و به عرض حداکثر ۳۵۰ میکرومتر بودند. آسک-ها حاوی هشت عدد آسکوسپور، استوانه‌ای شکل و در اندازه‌های (۴۳-۳۸-۳۵) × (۲۵-۲۶۰-۲۱۰-۱۸۵-۱۰۵) میکرومتر بودند. آسکوسپورها تاریک، تک سلولی، بیضی



شکل ۷- *Sordaria sicutii*: a: پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA. b: آسکوکارپ از نوع پریسیوم. c: برش عرضی آسکوکارپ. d-e: آسکها. f: آسکوسپورهای بدون غلاف. مقیاس: b-d = ۵۰ میکرومتر؛ e-f = ۱۰ میکرومتر.

Figure 7. *Sordaria sicutii*. a: seven-day old colony on PDA. b: ascocarp (perithecium). c: ascocarp. d-e: ascospores. f: ascospores. Scale bars: b-d = 50 μm, e-f = 10 μm.

قارچی شناسایی شده در این تحقیق مانند *Biscogniauxia mediterranea* به عنوان اندوفیت-بیمارگر مطرح می باشند و زمانیکه میزبان تحت تنش واقع می شود وارد فاز بیماری زایی می شود (Ghasemi et al., 2016). بر اساس جیمز و همکاران (James et al., 2006) و سولتیس و سولتیس (Soltis and Soltis, 2000) گیاهان خانواده *Betulaceae*, *Oleaceae*, *Fagaceae*, *Aceraceae*, *Tiliaceae*, *Salicaceae* میزبان گروه های قارچی *Xylariales* و *Sordariales*, *Hypocreales*, *Diaporthales* از اندوفیت ها می باشند. در ایران از روی بلوط سیاه گونه های قارچی زیر گزارش شده اند: *Ch. Armillaria mellea*, *F. anthophilum*, *Ch. funiculum*, *crispatum*, *G. intermdia*, *Giberella acuminata*, *semitectum*, *Ph. Phyllactinia roboris*, *G. moniliformis*, *intricans*

Clonosta, *Cladosporium cladosporioides*, *globosum*, *F. Epicoccum nigrum*, *Discula quercina*, *chys rosea*, *Nigrospora*, *F. solani*, *F. proliferatum*, *oxysporum*, *Paecilomyces*, *Ochrocladosporium elatum*, *oryzae*, *Penicillium*, *Penicillium commune*, *formosus*, *Trichothecium* و *Pyronema domesticum*, *spinulosum* *roseum* شناسایی شده اند که مشخصات و ویژگی های آنها در جدول ۲ آورده شده است. که در بین آنها گونه های *Al. alternata* species complex با ۱۵ درصد، *Trichothecium roseum* با ۱۳ درصد و *Biscogniauxia mediterranea* با ۱۱ درصد به عنوان گونه های غالب در مناطق مورد بررسی شناسایی شدند. گونه های قارچی شناسایی شده در این تحقیق برای اولین بار از روی بلوط سیاه در دنیا گزارش می شوند. برخی از گونه های

سیاه و از راسته‌های Hypocreales, Pleosporales, Sordariales و Xylariales می‌باشند که تقریباً مشابه اندوفیت‌های جداسازی شده در سایر نقاط دنیا می‌باشند.

T. harzianum, *Pythium aphanidermatum*, *cryptogea* (ارشاد ۲۰۰۹) که عمدتاً از راسته *Hypocreales* می‌باشند. اکثر گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق از روی بلوط

جدول ۲- ویژگی‌های ریخت‌شناختی گونه‌های رایج اندوفیت بازیافت شده از درختان بلوط جنگل‌های ارسباران

Table 2. Morphological characters of common endophytic fungal species recovered from oak trees in the Arasbaran regions

Characteristics of conidia/ascospores (مشخصات کنیدیوم/آسکوسپور)	Characteristics of conidiophores/ascocarp and asci (مشخصات کنیدیوفور/آسکوکارپ و آسک)	Cultural characteristics (مشخصات پرگنه)	Fugal isolate (نام جدایه قارچی)
رنگ کنیدیوم‌ها قهوه‌ای تیره یا روشن، دارای ۱-۵ دیواره عرضی، فاقد و یا دارای ۴-۱ دیواره طولی نوک کنیدیوم‌ها نیمه شفاف و بدون انشعاب کنیدیوفورهای ثانویه در انتهای کنیدیوم‌ها قهوه‌ای تا بی رنگ دارای دیواره عرضی	کنیدیوفورها ساده و یا با یک انشعاب و یا دارای یک یا چند خمیدگی زانوماند، دارای سطح صاف و ماکرونماتوس	سریع‌الرشد، خاکستری مایل به زیتونی، دارای ۴-۵ دایره متحد‌المرکز و تولید ریشه‌های هوایی	<i>Alternaria alternata</i>
کنیدیوفورها شفاف تا رنگی، منشعب، دارای ۲-۱ انشعاب با ۲-۵ سلول کنیدی‌زا در انتها، سلول‌های کنیدی‌زا بصورت پلی بلاستیک، استوانه‌ای شکل، شفاف، صاف تا زبر و دارای خمیدگی‌های زانویی شکل در محل کنیدی‌زایی	بلوغ آسکوکارپ‌ها بعد از دو هفته، آسکوکارپ‌ها گرد، مودار آسکوکارپ دارای دو نوع زواید مو مانند موهای غیر منشعب، دیواره‌دار و دارای زگیل، موهای جانبی قهوه‌ای و اکثراً راست، موج‌دار بودن انتهای برخی از آنها، موهای انتهایی قهوه‌ای رنگ، در قاعده مستقیم و در انتها موج‌دار، آسک‌ها گریزی شکل، پایه‌دار و حاوی ۸ آسکوسپور	سفید و خاکستری رنگ، سریع‌الرشد، میسلیم متشکل از ریشه‌های هوایی، شفاف تا قهوه‌ای رنگ، منشعب، دیواره‌دار	<i>Biscogniauxia mediterranea</i>
آسکوسپورهای بالغ به رنگ زیتونی، لیمویی شکل		به رنگ صورتی تا قهوه‌ای کم‌رنگ، تشکیل پرگنه از میسلیم‌های هوایی سفید و آسکوکارپ‌های تیره و در کل سطح پرگنه	<i>Chaetomium globosum</i>

کنیدیومها در زنجیره‌های منشعب و در چهار شکل راموکنیدی اولیه، راموکنیدی ثانویه، کنیدی‌های بین زنجیره‌ای و کنیدی‌های کوچک (به ترتیب از پایین به بالا)، راموکنیدی‌های اولیه استوانه‌ای-مستطیلی راست تا خمیده، قهوه‌ای کم رنگ، تشکیل راموکنیدی‌های ثانویه در سطح راموکنیدی‌های اولیه و به شکل بیضوی، استوانه‌ای-مستطیلی

کنیدیوفورها بصورت راست و در مواردی در نیمه پایانی دارای حالت موج دار، عموماً قابل تمایز از ریشه و در مواردی مشابه ریشه‌های رویشی، کنیدیوفورها قهوه‌ای، استوانه‌ای باریک تا استوانه‌ای-مستطیلی، فاقد گره، دارای دیواره ضخیم

به رنگ زیتونی، دارای بافت مخملی، رشد ریشه‌ها در داخل محیط کشت، و به رنگ قهوه‌ای کم رنگ، سطح ریشه‌ها صاف و گاهی نسبتاً ناصاف بوده و دارای بندهای عرضی

Cladosporium cladosporioides

کنیدیومها به اشکال گرد و بیضی بوده

کنیدیوفورها به دو نوع
Verticillium-like
و
Penicillate

به رنگ زرد لیمویی

Clonostachys rosea

کنیدیوفورها منفرد، با سطح صاف، فاقد انشعاب، دیواره دار، در بخش عقیم راست و در نواحی کنیدی‌زا دارای خمیدگی‌های زانو مانند

خاکستری رنگ، در محیط کشت (Straw+TWA) ریشه‌ها صاف نیمه شفاف تا قهوه‌ای کم رنگ

Curvularia spicifera

کنیدی‌ها استوانه‌ای شکل، قهوه‌ای رنگ، دارای سه دیواره عرضی کاذب

اسپورودوکیومها پودری، قهوه‌ای تیره تا سیاه، پراکنده روی محیط کشت. کنیدیوفورها کاهش یافته و تبدیل شدن آنها به سلول‌های کنیدی‌زا. سلول‌های کنیدی‌زا بی‌رنگ، چماقی شکل، دارای ۲-۰ دیواره عرضی، دارای سطح صاف

به رنگ قهوه‌ای مایل به قرمز و سبز زیتونی، مسطح، دارای میسلیم‌های هوایی فراوان

Epicoccum nigrum

ماکروکنیدی‌های ۳ بندی فراوان با طول کوتاه تا متوسط، راست تا کمی خمیده، نسبتاً باریک و با دیواره نازک روی اسپورودوکیوم یا میسلیمها تولید می‌شدند که در آنها سلول پایه پاشنه‌ای شکل و سلول انتهایی نوک تیز و انحنادار میکروکنیدی‌ها تخم مرغی، بیضوی یا قلوه‌ای شکل و معمولاً یک سلولی روی سرهای دروغین با منوفالیدهای کوتاه کلامیدوسپورها به صورت انفرادی یا دوتایی و گاهی زنجیری یا خوشه ای در میسلیم‌های هوایی یا سطح آگار

اسپورودوکیوم‌های بنفش کم رنگ در محیط کشت

سفید تا بنفش پررنگ با میسلیم‌های هوایی به دلیل تولید رنگدانه در محیط کشت، رنگ پرگنه از پشت تشک پتری بنفش تیره

Fusarium oxysporum

ماکروکنیدی‌ها باریک، خمیده تا نسبتاً راست و معمولاً ۵-۳ بندی و با سلول پایه کمتر توسعه یافته و سلول انتهایی خمیده، میکروکنیدی‌ها چماقی شکل با پایه تخت یا گلابی شکل و به صورت زنجیری و گاهی در سرهای کاذب

تولید اسپورودوکیوم در برخی از جدایه‌ها

سفید تا نارنجی رنگ با میسلیم‌های هوایی فراوان بود. به دلیل تولید رنگدانه در محیط کشت، رنگ پرگنه از پشت تشک پتری نارنجی تا قهوه‌ای

Fusarium proliferatum

روی منوفیالیدها و پلی‌فیالیدها، پلی‌فیالیدها معمولاً منشعب، بدون کلامیدوسپور

ماکروکنیدی‌ها نسبتاً کلفت، راست تا کمی خمیده، ۷-۳ بندی، با سلول پایه پاشنه‌ای شکل و سلول انتهایی گرد و میکروکنیدی‌ها تخم مرغی، سوسیزی یا قلوه‌ای شکل، یک یا دو سلولی در منوفیالیدهای بلند، کلامیدوسپورهای کروی تا تخم مرغی با دیواره صاف یا زبر

کنیدیوم‌ها قهوه‌ای تیره تا سیاه، از دو طرف مسطح، از سطح فوقانی به شکل گرد، از سطح جانبی بیضوی

کنیدیوم‌ها تک سلولی و در زنجیرهای طولانی

کنیدیوم‌ها پودری، شفاف، دارای سطح صاف، بیضی شکل تا پیری فرم، دوسلولی، سلول بالایی کمی بزرگتر، دارای هیلوم مشخص

اسپورودوکیموم‌های کرم رنگ و گاهی آبی یا سبز رنگ

سلول‌های کنیدیوم‌ها بی‌رنگ دارای سطح صاف، آمپولی شکل

کنیدیوفورها به صورت منشعب و فیالیدیک، فیالیدها منفرد، ورتیسلیت و در قسمت پایه سیلندری شکل و یا فلاسکی شکل و در قسمت نوک باریک و بلند

سلول‌های کنیدی‌ها به صورت منفرد بر روی میسلیوم و بی‌رنگ، کنیدیوفورها منفرد، چندسلولی، صاف، فاقد انشعاب، استوانه‌ای، راست یا اندکی خمیده، بی‌رنگ

سفید تا کرم رنگ با میسلیوم‌های هوایی کم است. به دلیل تولید رنگدانه در محیط کشت، رنگ پرگنه از پشت تشک پتری زرد تا قهوه‌ای

سفید مایل به خاکستری، دارای میسلیوم هوایی، میسلیوم متشکل از ریشه‌های سطحی و غوطه ور در آگار، منشعب، دیواره‌دار

به رنگ سبز طلایی، پودری شکل، نسبتاً سریع‌الرشد، میسلیوم متشکل از ریشه‌های سطحی و غوطه ور در آگار، منشعب، دیواره‌دار ک

مسطح، لایه‌ای، مایل به صورتی، سریع‌الرشد، میسلیوم متشکل از ریشه‌های هوایی، شفاف تا نیمه شفاف، منشعب، دیواره دار

Fusarium solani

Nigrospora oryzae

Paecilomyces formosus

Trichothecium roseum

منابع

- Amal HA, Debbab A and Proksch P, 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90: 1820-1845.
- Arnold AE, Mejia LC, Kyllö D, Rojas EI, Maynard Z, Robbins N and Herre EA, 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 100: 15649-15654.
- Blumenstein K, 2010. Characterization of endophytic fungi in the genus *Ulmus*: putative agents for the biocontrol of Dutch elm disease (DED). Diploma thesis, University of Kassel, Germany.
- Cai L, Jeewon R and Hyde KD. 2006. Phylogenetic investigations of *Sordariaceae* based on multiple gene sequences and morphology. *Mycological Research*. 110(2): 137-150.
- Collado J, Platas G and Pelaez F, 1996. Fungal endophytes in leaves, twigs and bark of *Quercus ilex* from central Spain. *Nova Hedwigia* 63: 347-360.
- Crous PW and Groenewald jz, 2013. A phylogenetic re-evaluation of *Arthrinium*. *IMA Fungus*. 4 (1): 133-145.
- Ershad D, 2009. *Fungi of Iran*. 3rd edition, Iranian Research Institution of Plant Protection, 531 p.

- Fisher PJ, Petrini O, Petrini LE and Sutton BC, 1994. Fungal endophytes from the leaves and twigs of *Quercus ilex* L. from England, Majorca and Switzerland. *New Phytologist* 127: 133-137.
- Gennaro M, Gonthier P and Nicolotti G, 2003. Fungal endophytic communities in healthy and declining *Quercus robur* L. and *Q. cerris* L. trees in northern Italy. *Journal of Phytopathology* 151: 529-534.
- Ghasemi Esfahlan S, Arzanlou M and Babai Ahari A, 2017. Identification of endophytic *Trichoderma* species from oak trees in Arasbaran forests using morphological and molecular characteristics. *Applied Research in Plant Protection*. 6 (3): 53-66.
- Ghasemi Esfahlan S, Arzanlou M, Khoadei S, Tavakoli M and Babai Ahari A, 2016. Molecular diagnostics of *Biscogniauxia mediterranea*, the causal agent of charcoal rot disease on oak using species-specific primers. *Applied Research in Plant Protection*. 5 (2): 175-186.
- Hajizadeh A, Amini J and Abdollahzadeh J, 2015. New records of endophytic fungi isolated from oak trees in Kurdistan province (Iran). *Rostaniha*. 16 (1):109-122.
- Halmschlager E, Butin H and Donaubaue E, 1993. Endophytic fungi in leaves and twigs of *Quercus petraea*. *European Journal of Forest Pathology* 23: 51-63.
- Helander M, Ahlholm J, Sieber TN, Hinneri S and Saikkonen K, 2007. Fragmented environment affects birch leaf endophytes. *New Phytologist* 175: 547-553.
- Huhndorf SM, Miller AN and Fernandez FA, 2004. Molecular systematics of the *Sordariales*: the order and the family *Lasiosphaeriaceae* redefined. *Mycologia*. 96(2): 368-387.
- James TY, Kauff F, Schoch CL, Matheny PB, Hofstetter V, Cox CJ, Celio G, Gueidan C, Fraker E, Miadlikowska J, Lumbsch HT, Rauhut A, Reeb V, Arnold AE, Amtoft A, Stajich JE, Hosaka K, Sung GH, Johnson D, O'Rourke B, Crockett M, Binder M, Curtis JM, Slot JC, Wang Z, Wilson AW, Schussler A, Longcore JE, O'Donnell K, Mozley-Standridge S, Porter D, Letcher PM, Powell MJ, Taylor JW, White MM, Griffith GW, Davies DR, Humber RA, Morton JB, Sugiyama J, Rossman AY, Rogers JD, Pfister DH, Hewitt D, Hansen K, Hambleton S, Shoemaker RA, Kohlmeyer J, Volkman-Kohlmeyer B, Spotts RA, Serdani M, Crous PW, Hughes KW, Matsuura K, Langer E, Langer G, Untereiner WA, Lucking R, Budel B, Geiser DM, Aptroot A, Diederich P, Schmitt I, Schultz M, Yahr R, Hibbett DS, Lutzoni F, McLaughlin DJ, Spatafora JW and Vilgalys R, 2006. Reconstructing the early evolution of fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443: 818-822.
- Ju YM and Rogers JD, 1996. A revision of the genus *Hypoxylon*. *Mycologia Memoir*. 20: 1-365
- Lorenzi E, Lorando E and Picco AM, 2006. Microfunghi endofitici ed epifitici di *Picea abies* (L.) Karst. in ambiente naturale ed antropizzato in Lombardia. *Forest Pathology*. 3: 426-436.
- Masoudinejad M R and Rezazade M, 2003. Comparison of four methods extraction from the fruits of oak species in Iran. *Hakim* 1: 81-91.
- Moller E M, Bahnweg G, Sanderman H and Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* 20: 6115-6116.
- Nylander JAA, 2004. MrModeltest v. 2.0. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala, Sweden.
- Ragazzi A, Moricca S, Capretti P, Dellavalle I and Turco E, 2003. Differences in composition of endophytic mycobiota in twigs and leaves of healthy and declining *Quercus* species in Italy. *Forest Pathology* 33: 31-38.
- Ragazzi A, Vagniluca S and Moricca S, 1995, European expansion of oak decline: involved microorganisms and methodological approaches. *Phytopathologia Mediterranea*. 34: 207-226.

- Ronquist F and Huelsenbeck JP, 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Saikkonen K, Faeth SH, Helander M and Sullivan TJ, 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 319-343.
- Schulz B and Boyle C, 2005. Review: The endophytic continuum. *Mycological Research* 109: 661-686.
- Sharma R, Kulkarni G, Sonawane MS and Shouche YS, 2014. A new endophytic species of *Arthrinium* (Apiosporaceae) from *Jatropha podagrica*. *Mycoscience*. 55 (2): 118-123.
- Soltis PS and Soltis DE. 2000. The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97: 7051-7057.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A and Kumar S, 2013. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tan RX and Zou WX, 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 18: 448-459.
- Thomas N, 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal biology reviews* 75- 89.
- Zabalgoeazcoa I, 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 6: 138-146.

Archive of SID

Morphological and Molecular Characterization of Endophytic Fungi from Oak Trees in Arasbaran Forests

S Ghasemi Esfahlan¹, M Arzanlou^{2*}, A Babai-Ahari², M Torbati³ and A Narmani³

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

²Professor of Plant Pathology and Mycology Respectively, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

³PhD Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

*Corresponding author: arzanlou@hotmail.com

Received: 6 December 2018

Accepted: 19 March 2019

Abstract

Over the past two decades, there has been an increasing interest in the study of endophytes, their origin, biodiversity, the interactions between endophytes and host plants, the role of endophytes in ecology, as well as the chemical properties and biological activity of secondary metabolites produced by them. In this research endophytic fungi from twigs and branches of oak in Hatam-baig and Kalibar regions were identified based on molecular and morphological characteristics. Towards this aim, samples were collected from twigs and branches of oak trees in above-mentioned regions during June and September 2014. Pure cultures were established using a single spore or hyphal tip techniques. The identity of fungal isolates was determined based on morphological characteristics and sequence data from ITS-rDNA and *Tub* region. In this study 25 fungal species including *Alternaria alternata* species complex, *Arthrimum arundinis*, *Aspergillus flavus*, *Bipolaris spicifera*, *Biscogniauxia mediterranea*, *Chaetomium globosum*, *Clonostachys rosea*, *Cladosporium cladosporioides*, *Daldinia vernicosa*, *Daldinia palmensis*, *Daldinia loculata*, *Discula quercina*, *Epicoccum nigrum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium solani*, *Nigrospora oryzae*, *Ochrocladosporium elatum*, *Paecilomyces formosus*, *Penicillium commune*, *Penicillium spinulosum*, *Pyronema domesticum*, *Sordaria fimicola*, *Sordaria sicutii* and *Trichothecium roseum* were identified as endophytic fungi inhabiting twigs and branches of oak trees in Hatam-baig and Kalibar region. The majority of the species that were identified in this study, are reported for the first time from *Quercus macranthera*. The assemblage of endophytic fungi in healthy tissues of oak trees might indicate that some of the fungi as possible latent pathogens of oak.

Keywords: Endophyte, Hatam-baig and Kalibar, Black oak, ITS-rDNA, *TUB*, Arasbaran.