

شناسایی و بررسی خصوصیات محرک رشدی و بیوکنترلی قارچ‌های اندوفیت جدا شده از برگ و میوه پسته

حسین کاری دولت آباد، هادی اسدی رحمانی¹ و فرهاد رجالی

استادیار، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ h.kari@areeo.ac.ir
دانشیار، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ asadi_1999@yahoo.com
دانشیار، موسسه تحقیقات خاک و آب، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران؛ frejali@yahoo.com

دریافت: 97/9/11 و پذیرش: 97/12/20

چکیده

قارچ‌های اندوفیت با سازوکارهای مختلف باعث افزایش رشد گیاه و همچنین مقاومت آن به تنش‌های زنده و غیرزنده می‌شوند. به این منظور جهت شناسایی قارچ‌های اندوفیت درخت پسته و ارزیابی ویژگی‌های محرک رشدی و بیوکنترلی آن‌ها، از برگ و میوه درختان سالم پسته شهرستان رفسنجان نمونه‌برداری انجام گرفت. پس از شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی، فاکتورهای محرک رشدی از قبیل تولید اکسین، سیدروفور، حل‌کنندگی فسفات معدنی و فعالیت بیوکنترلی این قارچ‌ها از طریق تولید کیتیناز و سیانید هیدروژن ارزیابی گردید. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان تولید اکسین در سطح صفر و 50 میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان به ترتیب به میزان 19/34 و 32/88 میلی‌گرم در لیتر توسط *Trichoderma atroviride* TA2-2-1 تولید گردید. بیشترین میزان سیدروفور توسط *Quambalaria* *Byssochlamys nivea* BN1-1-1 تنها 2/96 بود. تنها 2/96 نسبت قطر هاله به پرگنه 1/1 بود. بیشترین فعالیت کیتینازی به ترتیب در جدایه *Trichoderma harzianum* TH5-1-2 (2/92 U/mL) و *T. atroviride* TA2-2-1 (2/34 U/mL) مشاهده شد. گونه‌های *T. atroviride* TA2-2-1 و *Clonostachys rosea* CR2-3-1 قادر به تولید به مقدار زیاد سیانید هیدروژن (درجه 5) بودند.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت، سیدروفور، کیتیناز، سیانید هیدروژن

¹ نویسنده مسئول، آدرس: ایران، کرج، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، موسسه تحقیقات خاک و آب

مقدمه

قارچ‌های اندوفیت ریزجاندارانی هستند که در بافت‌های زنده گیاهان مختلف وجود دارند. قارچ‌های اندوفیت واقعی ارتباط دو طرفه با گیاهان دارند و بیماری ایجاد نمی‌کنند. قارچ‌های اندوفیت منبع غنی از متابولیت‌های فعال هستند که پتانسیل استفاده از این متابولیت‌ها در پزشکی، کشاورزی و صنعت وجود دارد (تن و زو، 2001؛ استروبل، 2003؛ ماریا و همکاران، 2005). تولید متابولیت‌های ثانویه از قارچ‌های اندوفیت وابسته به عوامل محیطی است. برهمکنش قارچ‌های اندوفیت با میزبان خود ممکن است بدلیل تولید متابولیت‌های ثانویه باشد (اسکولز و همکاران، 2002).

از طرف دیگر، به دلیل تأثیر مضر مصرف آفت-کش‌ها مانند آلودگی محیط زیست و به خطر افتادن سلامتی انسان، حیوانات و مسئله مقاومت بیمارگرها، اتخاذ راهکارهای مبارزه‌ای مناسب که چنین خطراتی را نداشته باشند، ضروری است. یکی از این روش‌ها استفاده از عوامل آنتاگونیست علیه بیمارگرها و جایگزینی آن با روش‌های کنترل شیمیایی می‌باشد (زوک و همکاران، 2008؛ کاردوسو و همکاران، 2010).

قارچ‌های اندوفیت میزبان خود را از حشرات و بیماری‌ها حفاظت می‌کنند. توانایی قارچ‌های اندوفیت گیاهان علفی که باعث حفاظت آن‌ها از حشرات می‌شد، باعث توجه محققین برای استفاده از قارچ‌های اندوفیت برای سلامتی بیشتر محصولات شد و با تحقیقات بیشتر فعالیت‌های ضد قارچی قارچ‌های اندوفیت به خوبی اثبات شده است (ناریساوا و همکاران، 2002؛ واز و همکاران، 2009؛ لی و همکاران، 2010؛ کومار و همکاران، 2011؛ کومار و کاشیک، 2013). قارچ‌های اندوفیت *Colletotrichum Fusarium Nigrospora oryzae truncatum Alternaria Guignardia camelliae proliferatum destruens* و *Chaetomium sp.* از برگ‌های گیاه *Jatropha curcas* جداسازی شده‌اند و استخراج عصاره میسلیوم این قارچ‌ها نشان داد که عصاره قارچ *C. truncatum* روی *Fusarium oxysporum* و *Sclerotinia sclerotiorum* مؤثر است (کومار و همکاران، 2011).

علاوه بر تولید ترکیبات با فعالیت ضدقارچی، تولید کیتینازها بدلیل توانایی از بین بردن کیتین دیواره سلولی قارچ نقش مهمی در مهار زیستی قارچ‌های بیماریزای گیاهی دارد (گوکل و همکاران، 2000؛ ویترو و همکاران، 2001). کیتین، پلی ساکارید خطی است که از

مونومرهای N-استیل گلوکز آمین تشکیل شده است. کیتین ترکیب اصلی دیواره سلولی قارچ‌ها و حشرات می‌باشد. آنزیم‌های کیتیناز با شکستن پیوند بین واحدهای N-استیل گلوکز آمین می‌توانند کیتین را به الیگوساکاریدهای کیتینی تجزیه کنند (موزارلی و همکاران، 1986). یکی دیگر از روش‌هایی که برای محدود کردن اثر پاتوژن‌های گیاهی به کار می‌رود، سنتز سیانید هیدروژن می‌باشد. سیانید هیدروژن توسط برخی از ریزجانداران ترشح می‌شود و تولید ATP را در زنجیره تنفسی سیتوکروم اکسیداز متوقف می‌کند و بیشتر انرژی به جای فسفوریله کردن ATP به صورت گرما هدر می‌رود. لذا نقش مهمی در حفاظت گیاه علیه پاتوژن‌ها دارد (همتی، 2017).

قارچ‌های اندوفیت با تولید ترکیبات فعال و آنزیم‌ها باعث انتقال بیشتر عناصر کم مصرف و پرمصرف از قبیل فسفر، گوگرد، کلسیم، منیزیم و پتاسیم از خاک به گیاه می‌شوند. در میان ترکیبات، تولید هورمون‌های گیاهی از قبیل اکسین‌ها توسط اندوفیت‌ها گزارش شده است که اکسین‌ها نقش بسیار مهمی در توسعه سیستم ریشه‌ای گیاه و افزایش جذب آب و عناصر و در نهایت افزایش عملکرد گیاه ایفا می‌کنند (واگاس و همکاران، 2012).

از دیگر مکانیسم‌های مؤثر در افزایش رشد گیاه، انحلال فسفات‌های نامحلول است. فسفر یکی از عناصر غذایی پرمصرف مهم می‌باشد که کمبود آن رشد گیاه را محدود می‌کند. قسمت اعظم فسفر در خاک به فرم فسفات‌های نامحلول می‌باشد، بنابراین، آزادسازی فسفر از فرم‌های نامحلول و تثبیت شده موجود در خاک ضرورت پیدا می‌کند. در این میان ریزجانداران‌های حل‌کننده فسفات از قبیل اسپریلوس و پنی‌سیلیوم نقش بسیار مهمی در حلالیت ترکیبات نامحلول فسفر در خاک ایفا می‌کنند (واسیلف و همکاران، 1995).

سیدروفورها ترکیب‌های آلی با وزن مولکولی کم می‌باشند که میل ترکیبی شدید و اختصاصی برای پیوند شدن با آهن را دارا می‌باشند. این مواد توسط ریزجانداران جهت مقابله با تنش کمبود فرم قابل جذب آهن ترشح می‌شود. از طرف دیگر آهن مورد نیاز بیمارگر را در ریزوسفر کاهش می‌دهد و بدین ترتیب رشد، تکثیر و فعالیت عوامل مذکور کاهش می‌یابد (طهماسبی و همکاران، 2014؛ همتی، 2017).

لذا هدف از انجام این پژوهش جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت پسته و برآورد فاکتورهای محرک رشدی و بیوکنترلی قارچ‌های اندوفیت درخت پسته بوده است که تا در تحقیقات آینده امکان تهیه

بسته به جنس، برای شناسایی ریخت‌شناسی جدایه‌های قارچی مورد بررسی در این تحقیق از ویژگی‌های ریخت‌شناسی از قبیل ویژگی‌های پرگنه، خصوصیات رشدی و ساختارهای تکثیری غیرجنسی و جنسی در صورت تشکیل در محیط کشت های سیب زمینی - دکستروز - آگار (PDA)، عصاره مالت - آگار (MEA)، برگ میخک - آگار (CLA) و محیط کشت آرد یولاف - آگار (OA) استفاده شد. تهیه اسلاید از اندام‌های قارچی به این صورت بود که بخشی از پرگنه قارچ به کمک سوزن کشت استریل برداشته شد و در قطره‌ای از کاتن بلو-لاکتوفنل و یا لاکتوفنل روی لام قرار داده و توسط لامل پوشانده شد. در هر مورد بر حسب میزان دسترسی، 25-50 مورد از اندام‌های قارچی در زیر میکروسکوپ نوری المپوس ژاپن اندازه‌گیری و میانگین آن‌ها محاسبه شد.

برای تأیید گونه در بعضی از جدایه‌های قارچی اندوفیت استخراج DNA ژنومی به روش مبتنی بر CTAB انجام گرفت (دویل و دویل، 1987). برای تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA هسته‌ای از ترکیب آغازگرهای ITS1 (5'-TCCGTTAGGTGAACCTGCGG-3') و ITS4 (5'-TCCCTCCGCTTATTGATATGC-3') به ترتیب به عنوان آغازگرهای مستقیم و معکوس استفاده شد (وایت و همکاران، 1990). محصول مربوط به ناحیه تکثیر شده جهت خالص سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی از طریق شرکت تکاپوزیست تهران به شرکت بایونیر¹ کره جنوبی ارسال شد. پس از دریافت توالی‌های نوکلئوتیدی، هر یک از توالی‌ها با استفاده از ابزار جستجوی BLAST با توالی‌های موجود در بانک ژن و با بانک‌های مرتبط با هر جنس مقایسه شدند (آلتشول و همکاران، 1997).

ارزیابی قابلیت تولید کیتیناز

تهیه کیتین کلونیدی

برای تهیه کیتین کلونیدی، به پنج گرم کیتین تهیه شده از پوسته خرچنگ، 60 میلی‌لیتر اسید کلریدریک 10 نرمال بتدریج افزوده و بهم زده شد. پس از 24 ساعت نگهداری در دمای چهار درجه سلسیوس با استفاده از کاغذ واتمن شماره یک، سوسپانسیون مزبور فیلتر شد. کیتین کلونیدی روی فیلتر در آب مقطر سترون معلق و سوسپانسیون به‌دست‌آمده به مدت 10 دقیقه با نیروی 12000×g سانتریفیوژ گردید. جهت شست‌وشوی کامل بقایای اسیدی از کیتین کلونیدی، رسوب حاصله چندین

فرمولاسیون‌های اولیه و مؤثر جهت ارزیابی کارایی آن‌ها در آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای میسر گردد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

به منظور دستیابی و شناسایی جدایه‌های مربوط به قارچ‌های اندوفیت درختان پسته، جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی در طی فصل بهار سال 1393 از نواحی متعلق به منطقه رفسنجان استان کرمان انجام شد. نمونه‌برداری عمدتاً از میوه‌ها و برگ‌های سبز درختان سالم پسته روستاهای شهرستان رفسنجان به صورت تصادفی انجام گرفته و نمونه‌های جمع‌آوری شده درون کیسه‌های پلاستیکی و با ثبت مشخصات نمونه (مکان جمع‌آوری و تاریخ نمونه‌برداری) به آزمایشگاه انتقال داده شدند و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. برای نمونه‌برداری در هر باغ، پنج درخت سالم در بخش‌های مختلف باغ انتخاب و بعد از جمع‌آوری با هم مخلوط و یک نمونه در نظر گرفته شد. در مجموع هشت نمونه میوه و هشت نمونه برگ جمع‌آوری گردید.

جداسازی و شناسایی جدایه‌های قارچی

برای جداسازی قارچ‌های اندوفیت، نمونه‌های گیاهی زیر جریان ملایم آب شیر به مدت 10 دقیقه شسته شدند. سپس نمونه‌ها چهار مرتبه با آب مقطر سترون شست و شو داده شدند. پس از آن، به مدت یک دقیقه در اتانول 70 درصد غوطه‌ور شدند و به دنبال آن به مدت پنج دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم سه درصد غوطه‌ور شدند و در نهایت چهار مرتبه با عبور دادن از آب مقطر سترون، شست و شو داده شدند. سپس نمونه‌ها در زیر هود با کمک پنس سترون به منظور حذف آب سطحی اضافی، مابین کاغذ صافی سترون آگیری شدند. پس از رطوبت-گیری و خشک شدن، هر یک از بخش‌های مختلف نمونه-های گیاهی به قطعات کوچک به ابعاد در حدود $0/5 \times 0/5$ سانتی‌متر برش داده شدند و به روی محیط کشت آب آگار دو درصد منتقل شدند (لیانگ و همکاران، 2012).

تشتک‌های پتری کشت‌شده درون انکوباتور با دمای 25 درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی به مدت 15 الی 30 روز نگهداری شدند. تشتک‌های پتری به صورت مرتب و روزانه بازبینی شدند. قارچ‌های رشد نموده از حاشیه بافت‌های گیاهی به طور جداگانه و توسط سوزن-های سترون برداشته شده و به داخل تشتک‌های پتری جدید حاوی محیط کشت سیب زمینی - دکستروز - آگار (PDA) محتوی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین (0/2 گرم در لیتر) منتقل شدند.

¹ Bioneer

روی محیط کشت قرار داده شد. توانایی تولید سیدروفور از روی تغییر رنگ آبی به نارنجی ارزیابی شد. همچنین نسبت قطر هاله به قطر پرگنه نیز اندازه‌گیری و محاسبه شد. این آزمایش در سه تکرار انجام شد.

ارزیابی قابلیت تولید اکسین

به منظور بررسی توان تولید اکسین جدایه‌ها، سه قرص میسلومی پنج میلی‌متری از جدایه‌های قارچ اندوفیت به 25 میلی‌لیتر محیط کشت Tryptic Soy Broth (TSB) حاوی صفر و 50 میلی‌گرم در لیتر ال-تریپتوفان منتقل گردید. پس از رشد قارچ‌ها در محیط کشت مایع، از توری برای جدا کردن میسلوم و مایع استفاده شد. مایع زیر صافی به‌دست‌آمده به مدت 15 دقیقه با نیروی $10000 \times g$ سانتریفیوژ گردید و یک میلی‌لیتر از محلول بالایی با دو میلی‌لیتر معرف سالکوسکی مخلوط گردید. این مخلوط به مدت 25 دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس با استفاده از اسپکتروفتومتر میزان جذب نور آن در 535 نانومتر قرائت گردید (بنت و همکاران، 2001). مقدار تولید اکسین هر جدایه با مقایسه مقدار جذب نور آن با منحنی استاندارد با غلظت‌های صفر، 5، 10، 15، 20 و 25 میلی‌گرم در لیتر تهیه شده از ایندول استیک اسید محاسبه شد.

ارزیابی قابلیت حل‌کنندگی فسفات معدنی

برای شناسایی قارچ‌های اندوفیت حل‌کننده فسفات معدنی، یک قرص میسلومی پنج میلی‌متری از جدایه‌های قارچ اندوفیت روی محیط اسپربر قرار داده شد. سپس تشتک پتری به مدت هفت روز در انکوباتور با دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس قرار گرفت. برای ارزیابی حل‌کنندگی فسفات معدنی، تشتک پتری در برابر نور گرفته شد. جدایه‌های با توانایی حل‌کنندگی فسفات در اطرافشان هاله ایجاد کردند. نسبت قطر هاله به قطر پرگنه اندازه‌گیری و محاسبه شد. این آزمون در سه تکرار برای هر جدایه قارچی انجام شد (نصرتی و همکاران، 2014). محیط کشت اسپربر شامل 10 گرم در لیتر گلوکز، 0/5 گرم در لیتر عصاره مخمر، 0/1 گرم در لیتر CaCl_2 ، 0/25 گرم در لیتر $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، 2/5 گرم در لیتر $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ و 10 گرم در لیتر آگار می‌باشد که با pH حدود 7/2 تنظیم می‌شود.

ارزیابی قابلیت تولید سیانید هیدروژن (HCN)

برای ارزیابی قابلیت تولید سیانید هیدروژن یک قرص میسلومی به قطر پنج میلی‌متر از کشت هفت روزه جدایه‌های قارچی به تشتک پتری‌های حاوی محیط

بار با آب مقطر سترون شست و شو شد و سپس مورد استفاده قرار گرفت.

سنجش آنزیمی کیتیناز

محیط کشت پایه برای تولید آنزیم کیتیناز شامل پنج گرم کیتین کلونیدی، یک گرم سوکروز، دو گرم NaNO_3 ، یک گرم K_2HPO_4 ، 0/5 گرم KCl ، 0/5 گرم MgSO_4 و 0/01 گرم FeSO_4 در لیتر بود. برای تهیه محیط کشت جامد 15 گرم آگار در لیتر به محیط کشت پایه اضافه شد و یک قرص میسلومی به قطر پنج میلی‌متر از جدایه‌های قارچ اندوفیت روی محیط کشت قرار داده شد. برای تهیه محیط کشت مایع، محیط کشت پایه تهیه و درون اتوکلاو سترون گردید و پس از سرد شدن درون هر فلاسک شیشه‌ای 250 میلی‌لیتری سترون مقدار 100 میلی‌لیتر محیط ریخته شد و پس از مایه‌زنی قارچ‌ها به مدت پنج روز روی دستگاه شیکر در دمای 28 درجه سلسیوس با سرعت 120 دور در دقیقه قرار گرفت.

سنجش آنزیمی به روش رنگ‌سنجی صورت پذیرفت (روچاس - اولیازا و همکاران، 1999). ترکیب سنجش شامل یک میلی‌لیتر از محلول ده درصد کیتین کلونیدی مرطوب در بافر استات 20 میلی‌مولار (6/5) pH و یک میلی‌لیتر عصاره آنزیمی بود که به مدت یک ساعت در دمای 50 درجه سلسیوس نگهداری شد. ترکیب فوق با اضافه کردن یک میلی‌لیتر NaOH یک درصد و پنج دقیقه جوشاندن متوقف شد و ترکیب به مدت 10 دقیقه در $1600 \times g$ سانتریفیوژ شد. سپس یک میلی‌لیتر از مایع رویی و یک میلی‌لیتر $\text{Dinitrosalicylic acid}$ یک درصد ترکیب و به مدت پنج دقیقه در حمام آب جوش نگهداری شدند. بعد از سرد شدن، میزان تولید آنزیم، توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Eppendorf, Biophotometer, Germany) در طول موج 535 سنجیده شد. در این آزمایش از $\text{N-Acetylglucosamine}$ (GlcNAc) جهت رسم منحنی استاندارد استفاده شد. هر واحد فعالیت آنزیمی برابر با مقدار آنزیمی است که برای آزاد شدن یک میکرومول $\text{N-Acetylglucosamine}$ از کیتین در هر ساعت در شرایط آزمایش مورد نیاز است.

ارزیابی قابلیت تولید سیدروفور

آزمون تولید سیدروفور با استفاده از محیط CAS Blue Agar انجام شد (الکساندر و زوبرر، 1991). برای تهیه این محیط چهار محلول شامل محلول معرف Fe-Cas ، محلول بافر PIPES، محلول غذایی و محلول کازآمینواسید به طور مجزا تهیه، سترون و سپس با هم مخلوط و در تشتک پتری پخش شد. سپس یک قرص میسلومی به قطر پنج میلی‌متر از جدایه‌های قارچ اندوفیت

نشان داده نشده‌اند). در مجموع 19 جدایه انتخاب شد که با روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی، 11 گونه *Byssochlamys nivea* *Acremonium sclerotigenum*، *Chaetomium interruptum*، *Chaetomium globosum*، *Fusarium cf. incarnatum*، *Clonostachys rosea*، *Quambalaria cyanescens*، *Fusarium tricinctum* و *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma atroviride* و *Trichoderma longibrachiatum* شناسایی شدند. سهم گونه‌های فوق‌الذکر در میان 614 جدایه قارچی به ترتیب در برگ و میوه 0/98-1/46، 0/98-0، 0/98-0، 0/81-1/30، 0/98-0، 1/30، 0/98-0، 1/14-1/79، 1/46-0/98 درصد بود.

گونه *Acremonium sclerotigenum*:

قطر پرگنه روی محیط کشت آرد یولاف- آگار پس از 10 روز در دمای 25 درجه سلسیوس برابر 23 میلی‌متر است. پرگنه صورتی کم رنگ تا مایل به سفید و به صورت پنبه‌ای یا کرکدار است. کنیدیوم‌زایی روی محیط کشت فراوان می‌باشد. فیالیدها به طول 30-37 و عرض 1-2/3 میکرومتر در قسمت قاعده، اغلب ساده و به ندرت منشعب روی رشته‌هایی از ریشه‌های به هم بافته شده به وجود می‌آیند. کنیدیوم‌ها دارای اندازه 1/2-1/6 × 4/1-5/2 میکرومتر هستند و به شکل استوانه‌ای یا باریک شونده به سمت نوک و گاهی تا حدی دوکی شکل در سرهای کنیدیومی در انتهای فیالیدها تولید می‌شوند. اسکروت‌ها کروی با دیوار صاف و به ابعاد 20-45 میکرومتر می‌باشند (شکل 1).

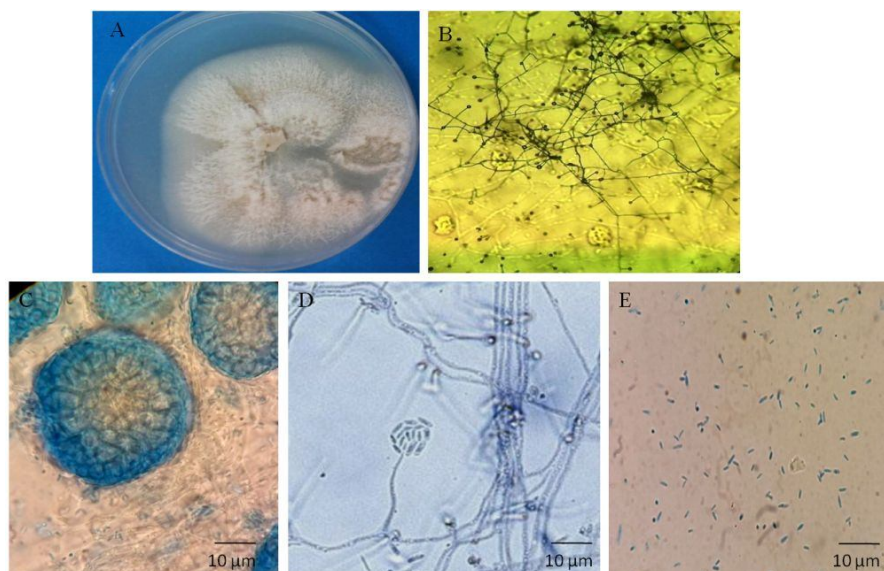
Tryptic Soy Agar (TSA) غنی شده با گلاسیسین (4/4 گرم در لیتر) کشت داده شدند، سپس یک کاغذ صافی آغشته به محلول معرف شامل کربنات سدیم دو درصد و اسید پیکریک 0/5 درصد در داخل در تشتک پتری قرار داده شد. سپس تشتک پتری‌ها برای جلوگیری خروج گاز سیانید هیدروژن با استفاده از پارافیلیم درزبندی شدند، آنگاه هفت روز در انکوباتور با دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. توانایی تولید سیانید هیدروژن براساس تغییر رنگ کاغذ صافی از رنگ زرد اولیه (عدم تولید) به کرم (کم)، نارنجی (نسبتاً کم)، قهوه‌ای روشن (نسبتاً زیاد) و آجری (زیاد) که به ترتیب از 1 تا 5 درجه‌بندی می‌شوند، تعیین شد (دونات-کورا و همکاران، 2004).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS 9.1 انجام شد. همچنین برای مقایسه میانگین داده‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال 5 درصد استفاده گردید.

نتایج

پس از طی مراحل مربوط به جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌های اندوفیت، در نهایت 614 جدایه قارچی شامل 340 جدایه از میوه و 274 جدایه از برگ به‌دست آمد. غربالگری اولیه 614 جدایه قارچ‌های اندوفیت به‌دست‌آمده علیه بیمارگرهای *Aspergillus sclerotiorum* و *Rhizoctonia solani flava* به روش کشت متقابل انجام گرفت و جدایه‌هایی که روی هر سه بیمارگر مؤثر بودند برای مراحل بعد انتخاب شدند (نتایج

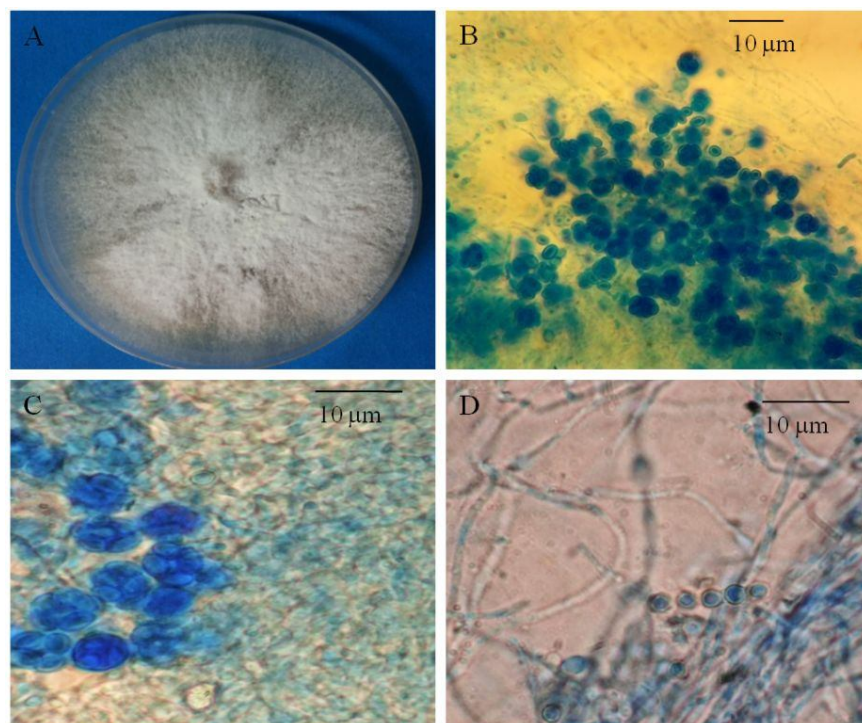


شکل 1- گونه *Acremonium sclerotigenum* (A: پرگنه 14 روزه روی محیط کشت OA، B: سرهای کنیدیومی، C) اسکروت‌ها، (D) کنیدیوفور و کنیدیوم‌ها و (E) کنیدیوم‌ها

گونه *Byssochlamys nivea*:

شکل 11-8 میکرومتر تشکیل می‌شوند. آسکوسپورها به رنگ زرد کم‌رنگ، بیضی شکل $4-5/5 \times 2/5-3/5$ ، صاف با دیواره ضخیم تشکیل می‌شوند. کنیدیوفور به ندرت، صاف و تا 300 میکرومتر طول تشکیل می‌شود. کنیدیوم‌ها کروی تا بیضی، شفاف تا زرد کم‌رنگ در زنجیره روی فیالیدهای تکی $2-3/5 \times 20-$ 12/5 تولید می‌شوند (شکل 2).

قطر پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA بعد از گذشت 10 روز در شرایط تاریکی و دمای 25 درجه سلسیوس برابر 90 میلی‌متر است. رنگ پرگنه سفید کرمی است و هیف‌های رویشی شفاف 5 - 0/5 میکرومتر قطر دارند. هیف‌های درون محیط کشت قطورتر و تا 8 میکرومتر می‌رسد. آسکوکارپ‌ها سفید و تا 340 میکرومتر است. تجمع آسک‌ها توسط شبکه‌های سست و بسیار تنک ریشه‌ها احاطه می‌شود و آسک‌های کروی



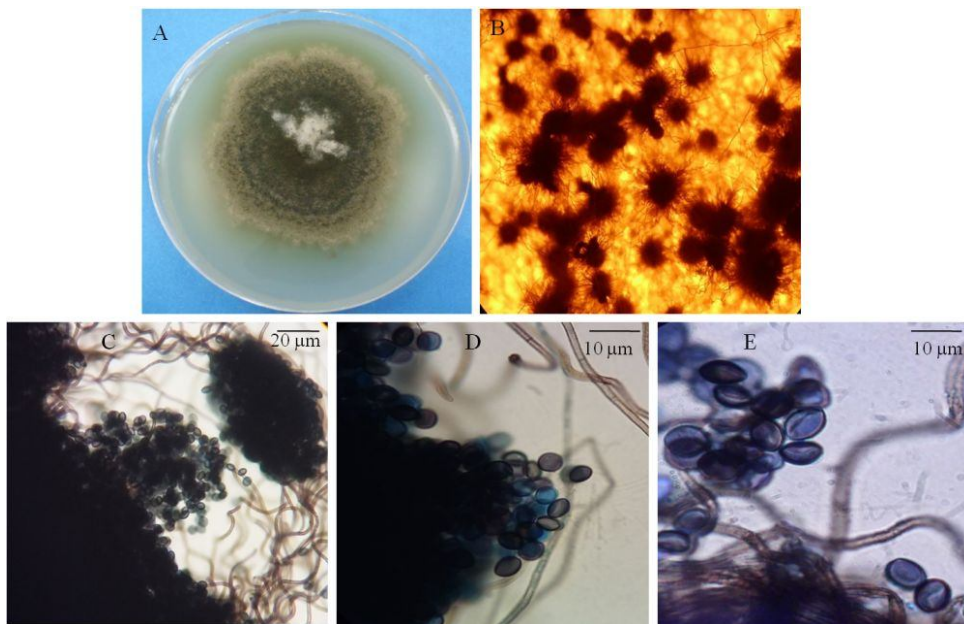
شکل 2- گونه *Byssochlamys nivea*: (A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA، (B-C) آسک و آسکوسپورها و (D) کنیدیوم‌ها

گونه *Chaetomium globosum*:

انتهایی بلندتر و تیره‌تر و موج‌تر بوده و تا 255 میکرومتر طول دارند. خروج آسک‌ها از آسکوماها با فشار و از میان موهای انتهایی صورت می‌گیرد. زواید مویی شکل راسی کوتاه تر بوده و ندرتا دارای جداره عرضی می‌باشند و قطر آنها در قاعده 3/5 میکرومتر است. ابعاد آسکوماتا در حدود 180-310 میکرومتر می‌باشد که به رنگ سیاه بوده و واجد پارافیز می‌باشند. آسک‌ها حاوی آسکوسپور بوده و گریزی شکل هستند و دارای دیواره ناپایدار بوده و فاقد حلقه انتهایی هستند. ابعاد آسک‌ها 62×34 میکرومتر است. آسکوسپورها کروی تا لیمویی شکل بوده و از دو سر کمی کشیده‌ترند

قطر پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA بعد از گذشت هفت روز در شرایط تاریکی و دمای 25 درجه سلسیوس برابر 62 میلی‌متر است. رنگ پرگنه قارچ خاکستری تا زیتونی و با حواشی سفید رنگ و منظم می‌باشد. با توجه به خصوصیت ظاهری و ابعاد آسکوما و اندازه آسکوسپورها گونه *Chaetomium globosum* شناسایی شد. این گونه دارای آسکومای کروی شکل با گردنی مشخص بوده و زواید ریشه مانند به صورت ساده و موجدار به آسکوماتا متصل هستند و در اطراف آن توده قطورتر و تیره‌تری از موهای موج و درهم فشرده را تشکیل می‌دهند که غالباً دارای جداره عرضی هستند و فاقد هرگونه خار و یا اتصالات زگیلی می‌باشند. موهای

و به رنگ زیتونی پررنگ تا قهوه‌ای هستند. ابعاد آسکوسپورها 5-8/5 × 8-11 میکرومتر است (شکل 3).

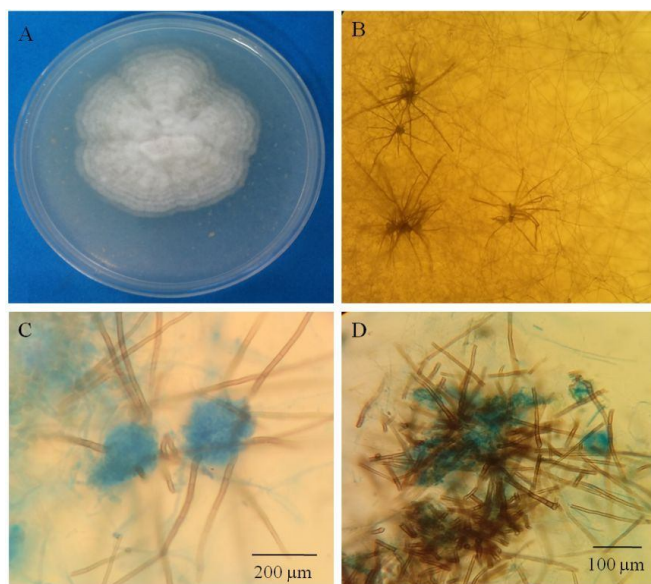


شکل 3- گونه *Chaetomium globosum* (A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت MEA، (B) آسکوکارپ‌ها، (C و D) آسکوکارپ و آسکوسپورها و (E) آسکوسپورها.

گونه *Chaetomium interruptum*:

به ابعاد 250-400 × 250-350 میکرومتر است. بافت دیواره پرتیسوم از نوع *t. angularis* یا *textura intricata* است. زوائد مویی شکل قهوه‌ای تیره و در ابعاد 550-750 × 2/5-3 میکرومتر است. در جدایه مورد بررسی آسک تولید نگردید (شکل 4).

قطر پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA بعد از گذشت هفت روز در شرایط تاریکی و دمای 25 درجه سلسیوس برابر 28 میلی‌متر است. پرگنه قارچ کرکی و به رنگ سفید است. آسکوما زردسبز یا زرد قهوه‌ای، کروی و

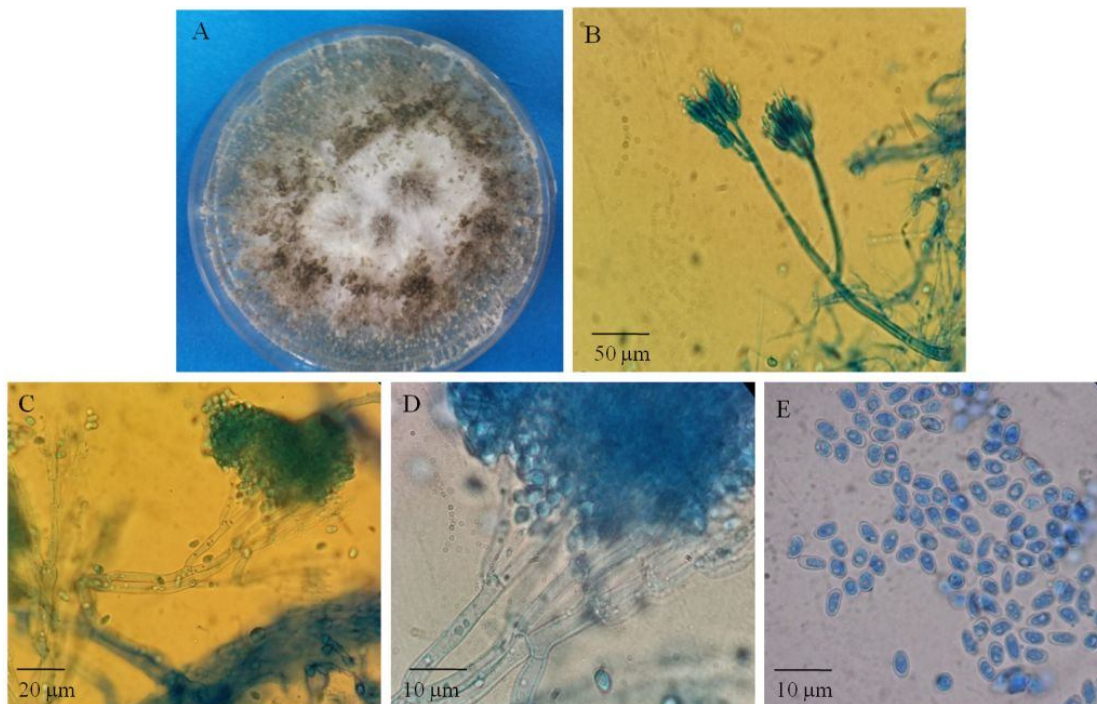


شکل 4- گونه *Chaetomium interruptum* (A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA و (B - D) آسکوکارپ‌ها

گونه *Clonostachys rosea*:

کمرنگ تا بی‌رنگ و به ابعاد $2 \times 10-17$ میکرومتر تولید می‌کنند که در قطره‌هایی به صورت واحد روی فیالدها جمع می‌شوند. کنیدیوفورهای ورتیسلیوم مانند دارای انشعاب‌ها و فیالدهای فراهم ظریف و کشیده با کنیدیوم-های مشابه قبل هستند که در انتهای هر فیالید به صورت انفرادی یا در دسته‌های کوچک تولید می‌شوند (شکل 5).

پرگنه روی محیط کشت مصنوعی به رنگ سفید تا نارنجی می‌باشد. این قارچ دارای دو نوع کنیدیوفور بوده، کنیدیوفورهای گلیوکلادیوم مانند که دارای انشعابات و فیالدهای فراهم و متراکم هستند و همچنین کنیدیوم-های ساده بدون بند، با سطحی صاف، به رنگ زرد



شکل 5- گونه *Clonostachys rosea*: (A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت PDA، (B-D) کنیدیوفورها و (E) کنیدیومها

گاهی دو سلولی و سه سلولی بودند. اندازه میکروکنیدیوم-ها $2/1-3/6 \times 6-18$ میکرومتر بود (شکل 6).

گونه *Fusarium tricinctum*:

میزان رشد جدایه مورد بررسی در محیط PDA سریع بوده و میانگین قطر پرگنه پس از پنج روز در شرایط تاریکی و دمای 25 درجه سلسیوس، 56 میلی‌متر است. در این گونه میسلیم‌های هوایی متراکم و سفید رنگ هستند. اسپورودوکیوم‌ها اغلب به رنگ نارنجی بوده و در محیط کشت برگ میخک-آگار به فراوانی تشکیل شدند.

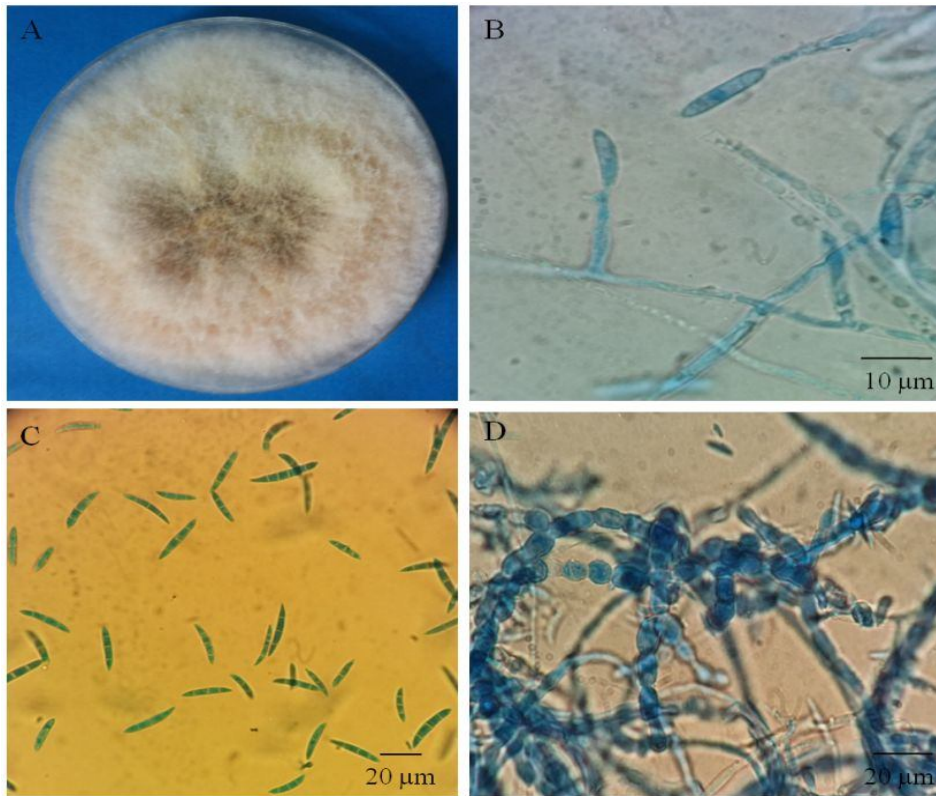
ماکروکنیدیوم‌های تشکیل شده در محیط CLA بصورت داسی شکل بودند. سلول رأسی ماکروکنیدیوم قلابی شکل بوده و سلول قاعده‌ای ماکروکنیدیوم پاشنه مانند بود. ماکروکنیدیوم‌ها اغلب دارای سه دیوار عرضی بوده، ولی چهار و یا پنج دیواره عرضی نیز در ماکروکنیدیوم‌ها دیده شدند. اندازه ماکروکنیدیوم‌ها $2-3 \times 18-36$ میکرومتر بود. میکروکنیدیوم بیضوی شکل و

گونه *Fusarium cf. incarnatum*:

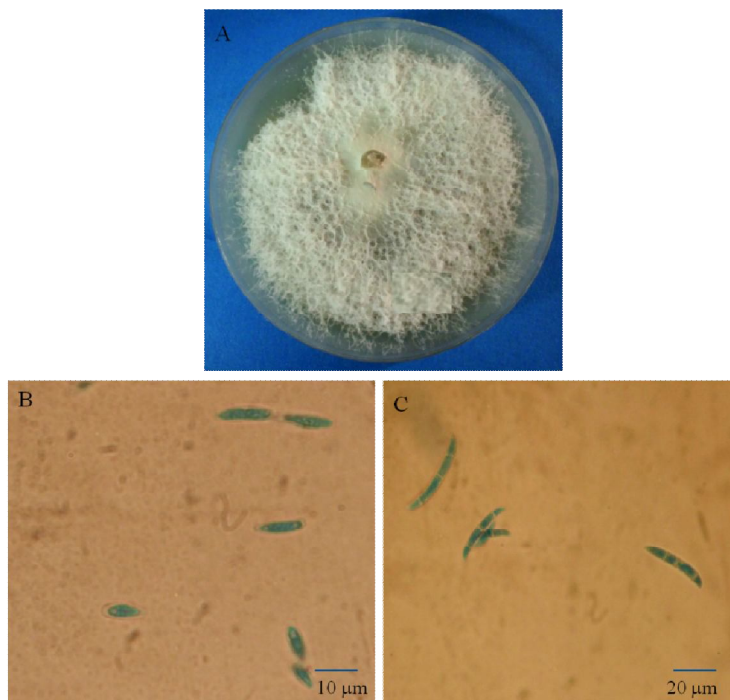
میزان رشد جدایه مورد بررسی در محیط PDA سریع بوده و میانگین قطر پرگنه پس از پنج روز در شرایط تاریکی و دمای 25 درجه سلسیوس 66 میلی‌متر است. در این گونه میسلیم‌های هوایی متراکم و سفید رنگ هستند و با گذشت زمان کلامیدوسپورها تولید می‌شوند که باعث ایجاد رنگ قهوه‌ای کمرنگ در میسلیم می‌شوند. اسپورودوکیوم‌ها اغلب به رنگ نارنجی بوده و در زیر میسلیم و یا روی قطعات برگ میخک تشکیل و ماکروکنیدیوم‌ها با دیواره ضخیم روی آن‌ها تشکیل شد. ماکروکنیدیوم‌های تشکیل شده در محیط CLA کمی بصورت خمیده بودند. سلول رأسی ماکروکنیدیوم کوتاه و نوک‌دار بوده و سلول قاعده‌ای ماکروکنیدیوم پاشنه مانند بود. ماکروکنیدیوم‌ها دارای سه تا پنج دیوار عرضی بود. اندازه ماکروکنیدیوم‌ها $3-4/5 \times 28-38$ میکرومتر بود. میکروکنیدیوم بیضوی شکل و معمولاً تک سلولی و

سلول کنیدی‌زا منوفیالیدیک است. جدایه مورد بررسی فاقد کلامیدوسپور بود (شکل 7).

معمولاً تک سلولی و گاهی دو سلولی بودند. اندازه میکروکنیدیوم‌ها $2/2-3/8 \times 4/2-14$ میکرومتر است و



شکل 6- گونه *Fusarium cf. incarnatum*: (A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت PDA، (B) فیالیدها و میکروکنیدیوم‌ها، (C) ماکروکنیدیوم‌ها و (D) کلامیدوسپورها

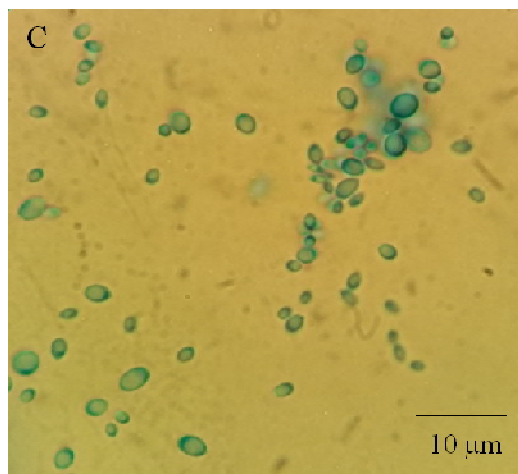
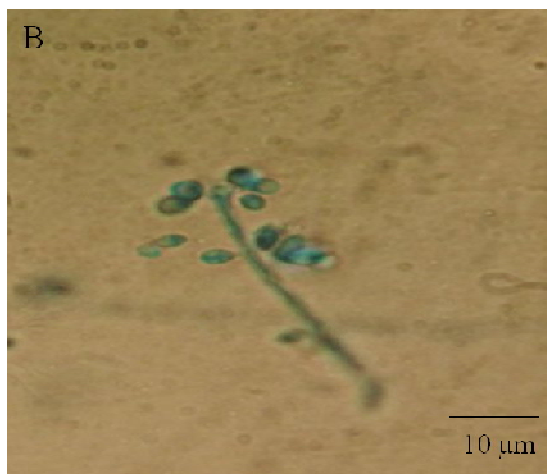
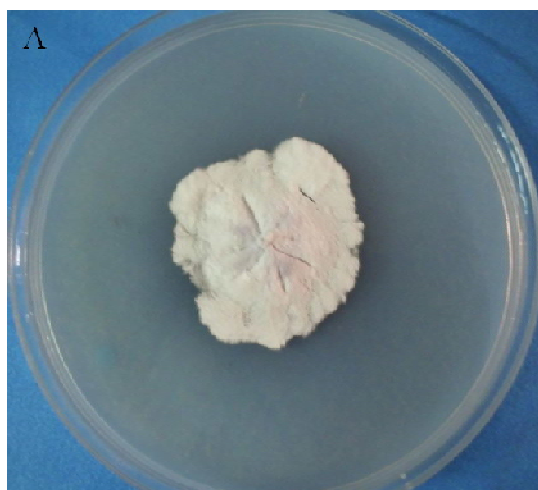


شکل 7- گونه *Fusarium tricinctum*: (A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PDA، (B) میکروکنیدیوم‌ها و (C) ماکروکنیدیوم‌ها

گونه *Quambalaria cyanescens*:

و به عرض 1/5 - 0/4 میکرومتر می‌باشند. کنیدیوم‌ها اغلب به اشکال تخم مرغی و یا گلابی شکل بوده و به رنگ شفاف و یا اندکی رنگدانه‌دار و در اندازه‌های 2/6 - 1/2 × 3/5 - 6/5 میکرومتر می‌باشند. کنیدیوم‌های ثانویه هم تولید می‌شوند (شکل 8).

قطر پرگنه بعد از ده روز نگهداری در محیط کشت PDA در دمای 25 درجه سلسیوس به 2/4 سانتی-متر می‌رسد. رنگ پرگنه سفید و مخملی است. کنیدیوفورها غیر متمایز از هیف‌های رویشی، سلول‌های کنیدیوم‌زا به صورت انتهایی و یا بین ریشه‌های، دنداندار و گسترش به شیوه سیمپودیال، به طول 8-35 میکرومتر

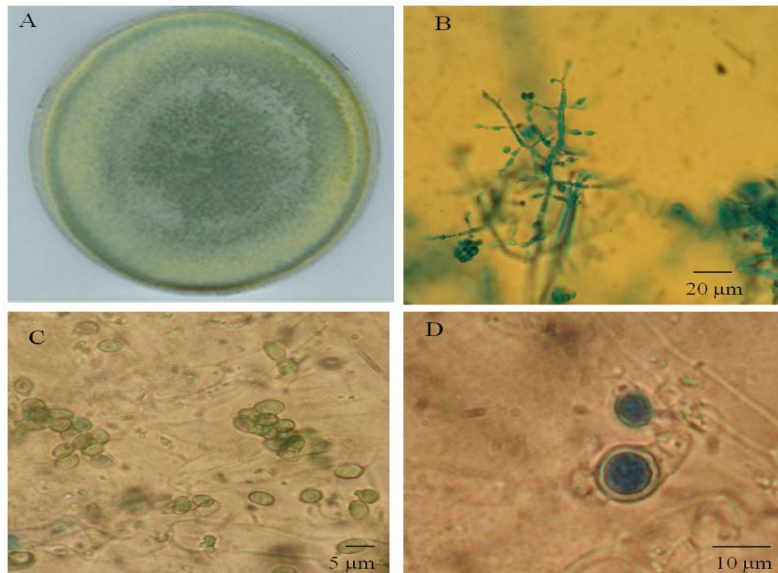


شکل 8- گونه *Quambalaria cyanescens*: (A) پرگنه پنج روزه روی محیط کشت PDA، (B) کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها و (C) کنیدیوم‌ها

گونه *Trichoderma atroviride*:

اندازه فیالیدها، 2/6-3/6 × 5-9 میکرومتر می‌باشد که به صورت منفرد یا در دسته‌های 2-4 تایی وجود می‌آیند. کنیدیوم‌ها با دیواره صاف، نیم کروی تا تخم مرغی و در اندازه 2/9-3/8 × 5/6-8/2 میکرومتر تولید می‌شوند. کلامیدوسپورها انتهایی و میانی کروی به اندازه 6-12 × 6-13 میکرومتر تولید می‌شوند (شکل 9).

قطر پرگنه در محیط کشت MEA پس از سه روز در شرایط تاریکی و دمای 25 درجه سلسیوس، 54 میلی‌متر است. کنیدیوم‌زایی معمولاً به صورت یکنواخت و پیوسته در سطح محیط انجام می‌شود. ریشه‌ها بی‌رنگ و به قطر 10-1/5 میکرومتر با دیوار صاف می‌باشند. کنیدیوفورها درختچه‌ای و شاخه‌های جانبی معمولاً به صورت تکی ایجاد می‌شوند. تعدادی از آنها نیز ممکن است به صورت دوتایی و یا سه تایی منشعب گردند.

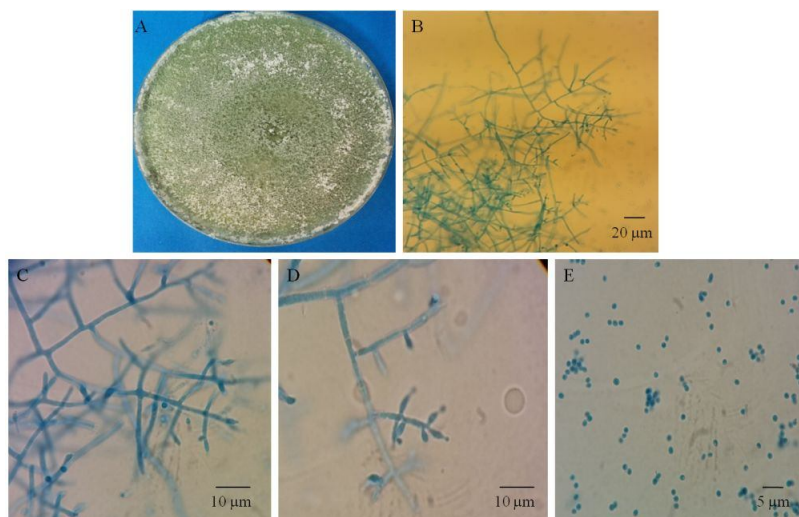


شکل 9- گونه *Trichoderma atroviride*: (A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت MEA، (B) کنیدیوفورها، (C) کنیدیومها و (D) کلامیدوسپورها

گونه *Trichoderma harzianum*:

صلیبی شکل منظم بوده و تشکیل یک ساختمان هرمی شکل را می‌دهند. طول شاخه‌ها در قسمت‌های قدیمی کنیدیوفور کوتاه بوده ولی در قسمت خلفی بلندتر می‌باشد. اندازه شاخه‌ها 15-32 میکرومتر بوده و رنگ آن‌ها از بی‌رنگ تا به رنگ سبز روشن متغیر است. در انتهای هر شاخه سه الی پنج فیالید متورم با ابعاد 3/5-2/5 × 4-7 میکرومتر وجود دارند. کنیدیومها تقریباً گرد بوده و به رنگ سبز روشن دیده می‌شوند. اندازه کنیدیومها 2-2/5 × 2/5-3 میکرومتر بوده و دیواره آن‌ها صاف می‌باشد (شکل 10).

قطر پرگنه در محیط کشت MEA پس از سه روز در شرایط تاریکی و دمای 25 درجه سلسیوس، 58 میلی‌متر است. پرگنه قارچ دارای رشد سریعی بوده و در ابتدا سفید رنگ بوده که بتدریج به رنگ سبز متمایل به زرد تا سبز تیره دیده می‌شود. رنگ پرگنه از پشت پتری زرد می‌باشد. پس از مدتی دانه‌های پودری شکلی که حاوی کنیدیومهای فراوان به همراه میسلیم‌های عقیم سفید رنگ است در سطح محیط کشت نمایان می‌شوند. هیفها شفاف و به پهنای 12-1/5 میکرومتر می‌باشند. کنیدیوفورها دارای انشعابات با زاویه راست و به حالت

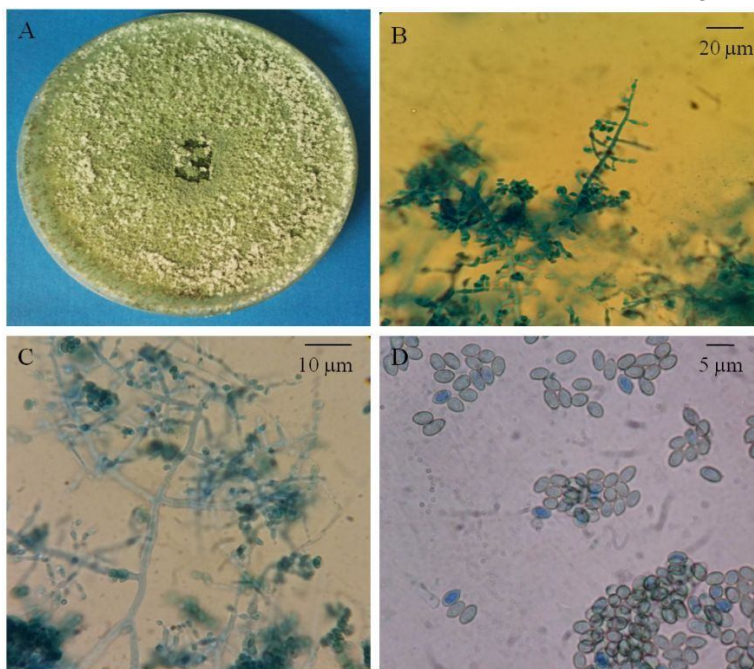


شکل 10- گونه *Trichoderma harzianum*: (A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت MEA، (B-D) کنیدیوفورها و (E) کنیدیومها

گونه *Trichoderma longibrachiatum*:

پرگنه بسیار سریع‌الرشد بوده و قطر رشدی آن بعد از گذشت سه روز روی محیط کشت MEA، در شرایط اتاق برابر 64 میلی‌متر است. رنگ پرگنه سبز تیره و در حاشیه سبز مایل به خاکستری با بافت مخملی و مسطح است. میسلیم‌ها اغلب در داخل محیط کشت رشد کرده و میسلیم‌های هوایی سفید رنگ معمولاً محدود به حاشیه پرگنه می‌باشند. اسپورزایی به میزان بسیار زیاد و سریع، ابتدا در قالب جوش‌های کوچک صورت گرفته و سپس این جوش‌ها به هم می‌رسند و از مرکز به سمت حاشیه، کل سطح پرگنه را می‌پوشانند. رنگ پرگنه از پشت تشتک پتری سبز مایل به زرد بوده و ترشحات تولید نمی‌کند. ریشه‌ها بی‌رنگ، دارای دیواره عرضی، منشعب، با سطح صاف و به قطر 2-10 میکرومتر می‌باشند. کنیدیوفورها بی‌رنگ، دارای دیواره عرضی، با سطح صاف و شاخه‌های اصلی طولانی و تقریباً مستقیم می‌باشند. قطر کنیدیوفورها در بخش پایه 4-5 میکرومتر بوده، به تدریج به سمت نوک از قطر آن‌ها کاسته می‌شود و به دو میکرومتر نیز می‌رسد. انشعابات جانبی کنیدیوفور با زاویه قائمه بوده و گاهی به سمت نوک کنیدیوفور متمایل می‌شوند. خود انشعابات

کنیدیوفور نیز به ندرت منشعب می‌شوند. انتهای انشعابات کنیدیوفور یک فیالید منفرد وجود دارد. سلول کنیدیوم‌ها از نوع فیالید است که اغلب به صورت منفرد و گاهی به صورت فراهم در گروه‌های 2-3 دوتایی تشکیل می‌شوند. فیالیدها بی‌رنگ و فلاسکی شکل هستند که در بخش قاعده‌ای کمی تنگ‌شدگی دارند. ابعاد فیالیدها برابر 3-2/5 × 6-12 میکرومتر است و در ناحیه گردن به صورت ناگهانی باریک شده و اغلب دارای انحنا می‌باشند. فیالیدهای انتهایی کشیده و فلاسکی شکل بوده و حالت تنگ‌شدگی در بخش قاعده آن‌ها دیده نمی‌شود و طول آن‌ها به 15 میکرومتر نیز می‌رسد. کنیدیوم‌ها یک سلولی، به رنگ سبز روشن، با سطح صاف، تخم مرغی وارونه تا بیضی شکل، با نوک گرد و قاعده تخت و به ابعاد 2-3 × 3/5-7 میکرومتر است که در سرهای کنیدیومی در نوک فیالیدها تشکیل می‌شوند. کلامیدوسپورها کروی تا بیضی شکل، با دیواره ضخیم، بی‌رنگ، انتهایی یا بین ریشه‌ای و به قطر 4-10 میکرومتر هم روی ریشه‌های هوایی و هم در ریشه‌های غوطه‌ور و نزدیک به سطح محیط کشت تشکیل می‌شوند (شکل 11).



شکل 11- گونه *Trichoderma longibrachiatum*: (A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت MEA، (B-C) کنیدیوفورها و (D) کنیدیوم‌ها.

زنجیره‌ای پلیمرز و باند موجود در ژل، تکثیر بخشی از ژنوم به طول تقریبی 600 جفت باز را در جدایه‌های مورد بررسی نشان داد (جدول 1).

جهت شناسایی مولکولی استخراج DNA به روش CTAB به عنوان روش مطلوب و مناسب جهت استخراج NA جدایه‌ها ارزیابی شد. ارزیابی محصولات حاصل از تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 در واکنش

جدول 1- شناسایی قارچ‌های اندوفیت پسته با روش‌های ریخت‌شناسی و توالی ناحیه ITS1-5.8S-ITS2

Endophytic fungi	Selected isolates	ITS GenBank accession No.	Identity (%)
<i>Acremonium sclerotigenum</i>	AS13-2-1	KP641158	99 %
<i>Byssosclamyces nivea</i>	BN1-1-1	KP641160	99 %
<i>Chaetomium globosum</i>	CG6-2-1	KP641141	99 %
<i>Chaetomium interruptum</i>	CI8-1-1	KP641156	99 %
	CI8-2-1		
	CI9-1-1		
<i>Clonostachys rosea</i>	CR2-3-1	KP641134	99 %
<i>Fusarium cf. incarnatum</i>	FC13-2-1	KP641161	99 %
<i>Fusarium tricinctum</i>	FT6-3-1	KP641142	99 %
	FT6-4-2		
<i>Quambalaria cyanescens</i>	QC11-3-2	KP641151	99 %
	QC11-3-4		
<i>Trichoderma atroviride</i>	TA2-2-1	KT351796	99 %
	TH4-1-2		
<i>Trichoderma harzianum</i>	TH5-1-2	KT351797	99 %
	TH10-2-2		
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	TL10-3-1	KT351799	100%
	TL11-2-1		
	TL11-3-1		

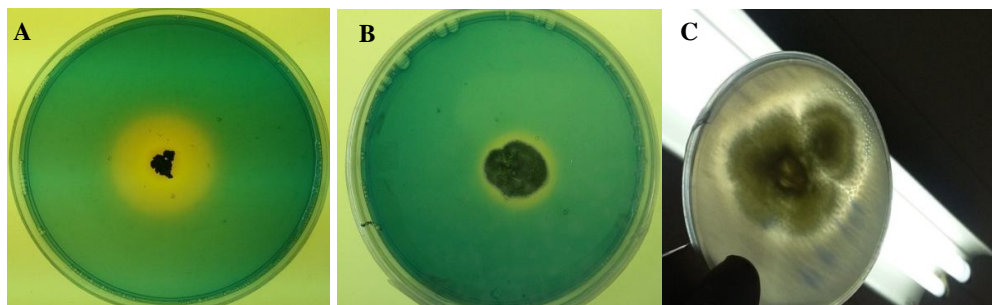
F. و *F. cf. incarnatum*، *C. rosea*، *C. globosum* و *tricinctum* قادر به تولید سیدروفور نبودند (جدول 2).

حل‌کنندگی فسفات معدنی

برای ارزیابی تولید حل‌کنندگی فسفات معدنی از محیط اسپربر استفاده شد که در بین جدایه‌ها تنها گونه *B. nivea* قابلیت تولید هاله را داشت و نسبت قطر هاله به قطر پرگنه 1/1 اندازه‌گیری شد (شکل 12).

تولید سیدروفور

بررسی تجزیه واریانس نشان داد که بین جدایه‌ها از لحاظ تولید سیدروفور اختلاف معنی‌دار آماری وجود دارد. بیشترین میزان سیدروفور تولیدی توسط *Q. cyanescens* تولید شد که نسبت قطر هاله به پرگنه 2/96 بود (جدول 2). گونه‌های *A. sclerotigenum*، *B. nivea*



شکل 12 - A: تولید سیدروفور در قارچ اندوفیت *Quambalaria cyanescens*؛ B: تولید سیدروفور در قارچ اندوفیت *Trichoderma longibrachiatum*؛ C: حل‌کنندگی فسفات معدنی و ایجاد هاله توسط قارچ اندوفیت *Byssosclamyces nivea* در محیط اسپربر.

تولید اکسین

در سطح 50 تولید گردید. کمترین میزان تولید اکسین در *B. nivea* مشاهده گردید (جدول 2).

تولید کیتیناز

پس از کشت قارچ‌های اندوفیت روی محیط حاوی کیتین کلونیدی مشخص شد که گونه‌های *B. nivea*

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین میزان توان تولید اکسین در سطح صفر و 50 میلی‌گرم در لیتر تریپتوفان توسط *T. atroviride* با میانگین 19/34 میلی‌گرم در لیتر در سطح صفر و 32/88 میلی‌گرم در لیتر

فعالیت آنزیمی (U/ml) به ترتیب در جدایه TH 5-1-2 (2/34) *T. atroviride* و (2/92) *T. harzianum* مشاهده شد (جدول 2).
F. tricinctum، *F. cf. incarnatum*، *C. interruptum*، و *Q. cyanescens* قادر به تولید کیتیناز نمی‌باشند. گونه‌هایی که قادر به تولید آنزیم کیتیناز بودند به روش رنگ‌سنجی مورد ارزیابی قرار گرفتند که بیشترین

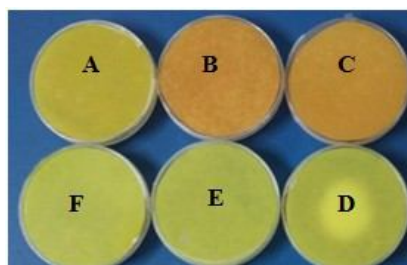
جدول 2- تولید کیتیناز، سیدروفور و اکسین قارچ‌های اندوفیت جدا شده از پسته (*Pistacia vera* L.)

Endophytic fungi	Auxin production		Siderophore production	Chitinase activity
	0 mg/l Tryptophan	50 mg/l Tryptophan	halo zone diameter /colony diameter	U/ml
<i>Acremonium sclerotigenum</i> AS13-2-1	1.56 p	6.91 n	0	0.74g
<i>Byssochlamys nivea</i> BN 1-1-1	1.15 q	3.78 p	0	0
<i>Chaetomium globosum</i> CG 6-2-1	1.15 q	8.65 k	0	1.16 e
<i>Chaetomium interruptum</i> CI 8-1-1	2.11 m	8.15 l	1.38 e	0
<i>Chaetomium interruptum</i> CI 8-2-1	4.4 g	12.6 g	1.82 d	0
<i>Chaetomium interruptum</i> CI 9-1-1	11.54 b	19.8 d	1.90 c	0
<i>Clonostachys rosea</i> CR 2-3-1	1.92 n	12.11 h	0	1.75 d
<i>Fusarium cf. incarnatum</i> FC 13-2-1	2.92 j	5.4 o	0	0
<i>Fusarium tricinctum</i> FT 6-3-1	2.11 m	3.56 q	0	0
<i>Fusarium tricinctum</i> FT 6-4-2	1.68 o	3.84 p	0	0
<i>Quambalaria cyanescens</i> QC 11-3-2	2.3 l	7.5 m	2.96 a	0
<i>Quambalaria cyanescens</i> QC 11-3-4	9.8 c	28.6 b	2.12 b	0
<i>Trichoderma atroviride</i> TA 2-2-1	19.34 a	32.88 a	1.1 f	2.34 b
<i>Trichoderma harzianum</i> TH 4-1-2	4.8 f	10.58 i	1.03 gh	2.00 c
<i>Trichoderma harzianum</i> TH 5-1-2	3.34 i	12.5 g	1.04 h	2.92 a
<i>Trichoderma harzianum</i> TH 10-2-2	2.69 k	22.3 c	1.1 fg	2.29 b
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> TL10-3-1	6.92 d	18.26 e	1.03 h	0.79 g
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> TL11-2-1	6.54 e	15.19 f	1.06 fgh	1.00 f
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> TL11-3-1	3.4 h	9.6 j	1.91 c	0.5 h

حروف مشابه در مقابل میانگین‌ها در هر ستون بیانگر عدم اختلاف معنی‌دار بین آنها در سطح پنج درصد و بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن می‌باشد.

تولید HCN

در بین جدایه‌ها، جدایه‌های *C. rosea* و *T. atroviride* قادر به تولید مقدار کمی HCN (رنگ کرم؛ درجه 2) بود (شکل 13).



شکل 13- بررسی تولید HCN در قارچ‌های اندوفیت A: *Chaetomium interruptum*، B: *Trichoderma atroviride*، C: *Clonostachys rosea*، D: *Fusarium tricinctum*، E: *Chaetomium globosum* و F: Control

که گونه *T. harzianum* گونه غالب شالیزار و فراوانترین گونه جدا شده از اندام‌های هوایی بود (نعیمی و همکاران، 2008). این گونه به عنوان قارچ اندوفیت از گیاه برنج گزارش شده است (نایک و همکاران، 2009؛ یوان و همکاران، 2011؛ سلیمانی، 2014). گونه *T. longibrachiatum* اولین بار در سال 1993 از پنبه آمریکایی در ایران گزارش شده است. علاوه بر این از گردو، زیتون، جو، خاک و غیره در سال‌های بعد گزارش شده است (ارشاد، 2009). این گونه به عنوان قارچ اندوفیت از درخت مو جداسازی شده است (هرقلی، 2013).

بیشترین فعالیت آنزیمی کیتیناز به ترتیب در جدایه *T. atroviride* TA2- و *T. harzianum* TH 5-1-2-1-2 مشاهده شد. قارچ‌های *Trichoderma* به هیف میزبان می‌چسبند و تشکیل قلاب یا اندام آپرسوریوم مانند می‌کنند و با تولید آنزیم‌های هیدرولیز کننده از قبیل کیتیناز، بتا گلوکاناز و پروتئیناز به میزبان وارد می‌شوند. گزارش شده است که در بین 20 جدایه متعلق به گونه-های *Trichoderma*، *T. harzianum* بیشترین میزان تولید کیتیناز و بتا 1، 3 گلوکاناز را داشت و قادر به 61/8 درصد بازدارنده رشد در *S. rolfisii* شد (الکتاتی و همکاران، 2000). از بین 162 جدایه قارچ اندوفیت جدا شده از برگ‌های جنگلی درختان هند، 31 جدایه قادر به تولید کیتیناز و یا ایزوفرمی از آن می‌باشند (راجولو و همکاران، 2011). از طرفی *T. atroviride* و *C. rosea* قادر به تولید سیانید هیدروژن بودند. تولید سیانید هیدروژن یکی از مکانیسم‌های بسیار مهم کنترل بیولوژیکی پاتوژن‌های گیاهی است (نادین و همکاران، 2010).

اثرات مفید *Trichoderma* بر گیاهان شامل توانایی آنتاگونیستی عوامل بیماری‌گر گیاهان با ترکیبی از مکانیسم‌های میکوپارازیتسم، تجزیه آنزیمی، ترشح آنتی‌بیوتیک‌ها و رقابت بر سر جا و مواد غذایی می‌باشد (هاول، 2003؛ هارمان، 2006). بعلاوه در سال‌های اخیر مشخص شده است که برخی از سویه-های بیوکنترل *Trichoderma* ارتباط سودمندی با ریشه گیاهان برقرار کرده و با کلنیزه کردن لایه‌های خارجی اپیدرم ریشه گیاهان به عنوان همزیست غیر بیماریزا و موفق عمل می‌کنند و با مکانیسم‌های مختلف بیوکنترلی بیماری‌گرها و همچنین محلول کردن مواد غذایی و افزایش قابلیت جذب آن‌ها و افزایش توسعه ریشه‌ها باعث بهبود رشد گیاهان می‌شوند (شورس و همکاران، 1999؛ مونت، 2001).

پسته (*Pistacia vera*) در طول دوره کشت و مراحل مختلف فراآوری، مورد حمله قارچ‌های گوناگون قرار می‌گیرد. اثرات مضر مصرف آفت‌کش‌ها مثل به خطر افتادن سلامتی انسان، حیوانات، آلودگی محیط زیست و مسئله مقاومت بیمارگرها باعث ایجاد راهکارهای مبارزه-ای مناسب که چنین خطراتی را نداشته باشند، شده است. یکی از این روش‌ها استفاده از عوامل آنتاگونیست از قبیل قارچ‌های اندوفیت علیه بیمارگرها و جایگزینی آن با روش‌های کنترل شیمیایی می‌باشد. برای این منظور نمونه-برداری از میوه‌ها و برگ‌های سبز درختان سالم پسته روستاهای شهرستان رفسنجان به صورت تصادفی انجام گرفت. جنس و گونه‌های یافت شده در این تحقیق برای اولین بار به عنوان قارچ اندوفیت از درخت پسته در دنیا گزارش می‌شود. گونه *A. sclerotigenum* دارای پراکنش وسیع بوده و برای اولین بار در ایران از گیاه جو در استان آذربایجان شرقی جداسازی شده است. گونه *C. globosum* به عنوان قارچ اندوفیت از گیاه برنج گزارش گردیده است (نیک و همکاران، 2009). این گونه در ایران به عنوان قارچ اندوفیت برنج گزارش شده است (سوزا و همکاران، 2011). گونه *C. interruptum* برای اولین بار از ایران از روی گرامینه جداسازی و گزارش شده است (عسگری و زارع، 2011). گونه *C. rosea* به عنوان یک قارچ متداول خاک و کلنیزه کردن بقایای گیاهی در اغلب نقاط جهان گزارش شده است. در ایران به عنوان قارچ چوب‌زی از استان گلستان گزارش شده است (قاری زاده و همکاران، 2004).

گونه *F. tricinctum* را به عنوان عامل تولید کننده تریسینونیک اسید و تریسیندیول از گیاه *Rumex hymenosepalus* کشور برزیل جداسازی کرده‌اند (سوزا و همکاران، 2011). این گونه به عنوان قارچ اندوفیت از درخت سرخدار معمولی در دنیا گزارش شده است (جمع اشکذری، 2013). گونه‌های جنس *Quambalaria* عامل ایجاد شانکر و بلایت ساقه، شکوفه و برگ در گیاهان تیره میرتاسه شامل اوکالیپتوس و کوریمبیا می‌باشند (زو و همکاران، 2007؛ پرز و همکاران، 2008). گونه *T. atroviride* برای اولین بار از ایران از خاک‌های مزارع گندم، شوراب، خرم آباد لرستان جمع‌آوری شده بود و از گونه‌هایی است که از نظر کنترل بیولوژیکی اهمیت زیادی دارد (ظفری و همکاران، 2004). شش گونه *Trichoderma* از اندام‌های هوایی برنج و خاک شالیزارهای مازندران جداسازی و شناسایی شده است

و *T. atroviride* بیشترین فعالیت بیوکترلی را در کشت متقابل و تولید کیتیناز نشان دادند. بنظر می‌رسد تولید کیتیناز نقش مهمی در فعالیت بیوکترلی و مایکوپارازیتسم دارد. هر چند که تولید متابولیت‌های ثانویه نیز نقش در خاصیت بیوکترلی دارد. گونه *T. harzianum* قابلیت تولید سیانید هیدروژن را نشان نداد ولی گونه *T. atroviride* قابلیت تولید سیانید هیدروژن را داشت و همچنین قادر به تولید بیشترین میزان اکسین بود. هر چند که این دو گونه در تولید سیدروفور گونه‌های برتر نبودند ولی این قابلیت را نشان دادند. تنها گونه *B. nivea* قابلیت حل‌کنندگی فسفات را نشان داد. با توجه به نتایج، بدلیل وجود ویژگی‌های افزایش‌دهندگی رشد و ویژگی‌های بیوکترلی امکان استفاده از این قارچ‌های اندوفیت در جهت تهیه فرمولاسیون‌های اولیه جهت ارزیابی کارایی آن‌ها در آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای میسر می‌گردد.

بیشترین میزان سیدروفور توسط *Q. cyanescens* تولید شد. سیدروفورها ترکیبات کلرات آهن با وزن مولکولی کم هستند که به وسیله باکتری‌ها و قارچ‌ها و برای مقابله با کمبود آهن تولید می‌شوند و قابلیت دسترسی آهن در ریزوسفر گیاه را افزایش می‌دهند (بوپاسی و راثو، 1999). قارچ اندوفیت چچم *Epichloe festucae* قادر به تولید سیدروفور نوع ferricrocin و fusarinine-C بود (جانسون و همکاران، 2013). گزارش شده است قارچ اندوفیت *A. sclerotigenum* از گیاه *Terminalia bellerica* نیز قادر به تولید سیدروفور می‌باشد (پراتیوشا و همکاران، 2015).

در مجموع، بر اساس مقایسه نتایج کشت متقابل، تولید کیتیناز، تولید سیانید هیدروژن، تولید اکسین، تولید سیدروفور و قابلیت حل‌کنندگی فسفات، گونه‌های تریکودرما گونه‌های برتر بودند. گونه‌های *T. harzianum*

فهرست منابع:

- Alexander, D.B. and Zuberer, D.A. 1991. Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* 12(1): 39-45.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. and Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25(17): 3389-3402.
- Asgari, B. and Zare, R. 2011. The genus *Chaetomium* in Iran, a phylogenetic study including six new species. *Mycologia* 103(4): 863-882.
- Bent, E., Tvizun, S., Chanway, C.P. and Enebak, S. 2001. Alterations in plant growth and root hormone levels of lodge pole pines inoculated with rhizobacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 47: 793-800.
- Boopathi, E. and Rao, K.S. 1999. A siderophore from *Pseudomonas putida* type A1: structural and biological characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1435(1): 30-40.
- Cardoso, R.A., Pires, L.T.A., Zucchi, T.D., Zucchi, F.D. and Zucchi, T.M.A.D. 2010. Mitotic crossing-over induced by two commercial herbicides in diploid strains of the fungus *Aspergillus nidulans*. *Genetics and Molecular Research* 9(1): 231-238.
- Donate-Correa, J., Leon-Barrios, M. and Perez-Galdona, R. 2004. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage treeshrub legume endemic to the Canary Island. *Plant Soil* 266: 261-272.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19: 11-15.
- El-Katatny, M.H., Somitsch, W., Robra, K.H., El-Katatny, M.S. and Gübitz, G.M. 2000. Production of chitinase and β -1, 3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*. *Food Technology and Biotechnology* 38(3): 173-180.
- Ershad, D. 2009. *Fungi of Iran*. Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, pp.531.

11. Gharizadeh, K.H., Khodaparast, S.A., Elahinia, S.A. and Abbasi, M. 2004. A study on the identification of wood inhabiting Hyphomycetes in Guilan province, Iran (2). Rostaniha 5(2): 123-145. (in Persian with English abstract).
12. Gokul, B., Lee, J.H., Rhee, S.K. and Panda, T. 2000. Characterization and applications of chitinases from *Trichoderma harzianum*-A review. Bioprocess Engineering 23: 691-694.
13. Harman, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology 96(2): 190-194.
14. Hemmati, V. 2017. Identification, characterization and evaluation of PGP traits in some bacterial strains isolated from rhizosphere of wheat . M.Sc. Thesis, Islamic Azad University, Karaj, Iran.
15. Hergheili, N. 2013. Isolation and identification of endophytic fungi in grapevine trees (*Vitis vinifera* L.) in West Azerbaijan province. M.Sc. Thesis, Tehran University, Tehran, Iran.
16. Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87(1): 4-10.
17. Jam Ashkezari, S. 2013. Identification of endophytic fungi of common yew (*Taxus baccata*). M.Sc. Thesis, Tehran University, Tehran, Iran.
18. Johnson, L.J., Koulman, A., Christensen, M., Lane, G.A., Fraser, K., Forester, N., Johnson, R.D., Bryan, G.T. and Rasmussen, S. 2013. An extracellular siderophore is required to maintain the mutualistic interaction of *Epichloë festucae* with *Lolium perenne*. PLOS Pathogens 9(5), p.e1003332.
19. Kumar, S. and Kaushik, N. 2013. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. PloS one 8(2), p.e56202.
20. Kumar, S., Kaushik, N., Edrada-Ebel, R., Ebel, R. and Proksch, P. 2011. Isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophora indica*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 27(3): 571-577.
21. Li, H.Y., Zhao, C.A., Liu, C.J. and Xu, X.F. 2010. Endophytic fungi diversity of aquatic/riparian plants and their antifungal activity in vitro. The Journal of Microbiology 48(1): 1-6.
22. Liang, H., Xing, Y., Chen, J., Zhang, D., Guo, S. and Wang, C. 2012. Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). BMC Complementary and Alternative Medicine 12(1), p. 238.
23. Maria, G.L. Sridhar, K.R. and Raviraja, N.S. 2005. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. Journal of Agricultural Technology 1(1): 67-80.
24. Monte, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. International Microbiology 4(1): 1-4.
25. Muzzarelli, R., Jeuniaux, C. and Gooday, G.W. 1986. Chitin in nature and technology. New York: Plenum Press 435-442.
26. Nadine, J., Coste, D.V., Gadkar, J. and Filion, M. 2010. *Verticillium dahliae* alters *Pseudomonas* spp. populations and HCN gene expression in the rhizosphere of strawberry. The Journal of Microbiology 56 (11): 906-915.
27. Naeimi, S., Okhovvat, S.M., Javan-Nikkhah, M., Kredics, L. and Khosravi, V. 2008. Introducing *Trichoderma* spp. Isolated from rice fields in Mazanderan Province, Iran. Proceedings of the 18th Iranian Plant protection Congress, Vol II, 24-24 Aug., Hamedan, Iran. p.626.
28. Naik, B.S. Shashikala, J. and Krishnamurthy, Y.L. 2009. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities in vitro. Microbiological Research 164(3): 290-296.

29. Narisawa, K., Kawamata, H., Currah, R.S. and Hashiba, T. 2002. Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *European Journal of Plant Pathology* 108(2): 103-109.
30. Nosrati, R., Owlia, P., Sadari, H., Rasooli, I. and Malboobi, M.A. 2014. Phosphate solubilization characteristics of efficient nitrogen fixing soil *Azotobacter* strains. *Iranian Journal of Microbiology* 6(4): 285-295.
31. Pérez, C.A., De Beer, Z.W., Altier, N.A., Wingfield, M.J. and Blanchette, R.A. 2008. Discovery of the eucalypt pathogen *Quambalaria eucalypti* infecting a non-Eucalyptus host in Uruguay. *Australasian Plant Pathology* 37(6): 600-604.
32. Prathyusha, P., Rajitha Sri, A.B., Ashokvardhan, T. and Satya Prasad, K. 2015. Antimicrobial and siderophore activity of the endophytic fungus *Acremonium sclerotigenum* inhabiting *Terminalia bellerica* Roxb. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 30(1): 84-87.
33. Rajulu, M.B.G., Thirunavukkarasu, N., Suryanarayanan, T.S., Ravishankar, J.P., El Gueddari, N.E. and Moerschbacher, B.M. 2011. Chitinolytic enzymes from endophytic fungi. *Fungal Diversity* 47(1): 43-53.
34. Rojas-Avelizapa L.I., Cruz-Camarillo R., Guerrero M.I., Rodríguez-Vázquez R. and Ibarra J.E. 1999. Selection and characterization of a proteo-chitinolytic strain of *Bacillus thuringiensis*, able to grow in shrimp waste media. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 15(2): 299-308.
35. Schroers, H.J., Samuels, G.J., Seifert, K.A. and Gams, W. 1999. Classification of the mycoparasite *Gliocladium roseum* in *Clonostachys* as *C. rosea*, its relationship to *Bionectria ochroleuca*, and notes on other *Gliocladium*-like fungi. *Mycologia* 365-385.
36. Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.K. and Krohn, K. 2002. Endophytic fungi: a source of novel biologically active secondary metabolites. *Mycological Research* 106(09): 996-1004.
37. Soleimani, N. 2014. Identification of some endophytic fungi in rice (*Oryza sativa* L.). M.Sc. Thesis, Tehran University, Tehran, Iran.
38. Souza, J.J.D., Vieira, I.J.C., Rodrigues-Filho, E. and Braz-Filho, R. 2011. Terpenoids from endophytic fungi. *Molecules* 16(12): 10604-10618.
39. Strobel, G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and infection* 5(6): 535-544.
40. Tahmasebi, F., Lakzian, A., Khavazi, K., Pakdin Parizi, A. 2014. Isolation, Identification and evaluation of siderophore production in *Pseudomonas* bacteria and its effect on hydroponically grown corn. *Iranian Journal of Biology* 27(1):75-87. (in Persian with English abstract).
41. Tan, R.X. and Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 18(4): 448-459.
42. Vassilev, N., Baca, M.T., Vassileva, M., Fracol, I. and Azcon, R. 1995. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugar-beet wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44: 546-549.
43. Vaz, A.B., Mota, R.C., Bomfim, M.R.Q., Vieira, M.L., Zani, C.L., Rosa, C.A. and Rosa, L.H. 2009. Antimicrobial activity of endophytic fungi associated with Orchidaceae in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology* 55(12): 1381-1391.
44. Viterbo, A., Haran, S., Friesem, D., Ramot, O., Chet, I. 2001. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum* Rifai TM. *FEMS Microbiology* 200(2): 169-174.
45. Waqas, M., Khan, A.L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H. and Lee, I.J. 2012. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules* 17(9): 10754-10773.

46. White, T.J., Bruns, T., Lee, S.J.W.T. and Taylor, J.W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications* 18(1): 315-322.
47. Yuan, Z.L., Su, Z.Z., Mao, L.J., Peng, Y.Q., Yang, G.M., Lin, F.C. and Zhang, C.L. 2011. Distinctive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of *Muscodor* (Xylariaceae). *The Journal of Microbiology* 49(1): 15-23.
48. Zafari, D., Zare, R., Ershad, D. and Alizadeh, A. 2004. Three new species of *Trichoderma* for the mycoflora of Iran. *Rostaniha* 5(2): 159-170. (in Persian with English abstract)
49. Zhou, X., De Beer, Z.W., Xie, Y., Pegg, G.S. and Wingfield, M.J. 2007. DNA-based identification of *Quambalaria pitereka* causing severe leaf blight of *Corymbia citriodora* in China. *Fungal Diversity* 25: 245-254.
50. Zucchi, T.D., De Moraes, L.A.B. and De Melo, I.S. 2008. *Streptomyces* sp. ASBV-1 reduces aflatoxin accumulation by *Aspergillus parasiticus* in peanut grains. *Journal of Applied Microbiology* 105(6): 2153-2160.

Identification and Evaluation of Growth Promoting and Biocontrol Properties of Isolated Endophytic Fungi from the leaves and fruits of *Pistacia vera*

H. Kari Dolatabad, H. Asadi Rahmani¹, and F. Rejali

Assistant professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: h.kari@areeo.ac.ir

Associate professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: asadi_1999@yahoo.com

Associate professor, Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran; E-mail: frejali@yahoo.com

Received: December, 2018 & Accepted: March, 2019

Abstract

Endophytic fungi increase plant growth and confer stress resistance to plants with different mechanisms. In order to identify endophytic fungi of *Pistacia vera* and to evaluate their growth promoting and biocontrol properties, samples were taken from the leaves and fruits of *Pistacia vera* in Rafsanjan. After morphological and molecular identification, Growth stimulating factors were evaluated by estimating auxin production, siderophore production and inorganic phosphate solubilizing activity. Biocontrol activities were evaluated based on chitinase and hydrogen cyanide production. Mean comparison of the data showed that the highest amounts of auxin at levels of 0 and 50 mg/L of tryptophan were produced with *Trichoderma atroviride* TA2-2-1 as the amount of 19.34 and 32.88 mg/L, respectively. *Quambalaria cyanescens* QC11-3-2 produced the highest amount of siderophore which the ratio of the diameter of the halo zone to the colony was 2.96. Only, *Byssochlamys nivea* BN1-1-1 had the ability to solubilize the inorganic phosphate which the ratio of the halo zone diameter to the colony diameter was 1/1. Most chitinase activities were observed by *Trichoderma harzianum* TH 5-1-2 (2.92 U/mL) and *T. atroviride* TA2-2-1 (2.34 U/mL), respectively. *T. atroviride* TA2-2-1 and *Clonostachys rosea* CR2-3-1 were able to produce the HCN.

Keywords: Chitinase, Endophyte, Hydrogen cyanide, Siderophore

¹ Corresponding author: Soil and Water Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran