

شناسایی اندوفیت‌های قارچی ریشه گیاهان مرتعی در استان مازندران

خدیدجه گودرزیان^۱، محمدعلی تاجیک قنبری^{۲*}، ولی‌اله بابایی‌زاد^۲ و شیده موجرلو^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران

پست الکترونیک: m.tajick@sanru.ac.ir

۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران

۴- استادیار، گروه باغبانی و گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۰۳

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۵/۱۵

چکیده

در این تحقیق، به منظور شناسایی قارچ‌های اندوفیت ریشه، طی سال ۹۶-۱۳۹۵، از ریشه گیاهان علفی سالم در مراتع مناطق مرکزی استان مازندران، نمونه‌برداری انجام شد. در آزمایشگاه، هر نمونه ریشه پس از ضدعفونی و کشت روی محیط PDA به مدت یک ماه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی مداوم نگهداری گردید. پس از خالص‌سازی جدایه‌های به‌دست آمده با استفاده از روش تک‌اسپور و نوک‌ریسه، شناسایی جدایه‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توالی ناحیه ITS انجام شد. در این مطالعه ۲۷ گونه متعلق به ۱۴ جنس شناسایی شدند. گونه‌های قارچی شامل: *Alternaria alternata*, *A.arborescens*, *A.burnsii*, *A.dumosa*, *A.solani*, *A.tenuissima*, *Botryosphaeria dothidea*, *B.auasmontanum*, *Curvularia australiensis*, *C.buchloes*, *C.spicifera*, *F.avenaceum*, *Fusarium acuminatum*, *Diaporthe bohemiae*, *Daldinia concentrica*, *Cladosporium tenuissimum*, *Nigrospora sphaerica*, *Microsphaeropsis arundinis*, *F.verticillioides*, *F.tricinatum*, *F.oxysporum*, *F.equiseti*, *Xylaria* و *Preussia minima*, *Poaceascoma helicoides*, *Periconia macrospinoso*, *Paraconiothyrium cyclothyrioides* هستند. در این میان، ۱۱ گونه شامل *Botryosphaeria auasmontanum*, *Curvularia australiensis*, *C.buchloes*، *Paraconiothyrium helicoides*، *Periconia macrospinoso*، *Microsphaeropsis arundinis*، *Diaporthe bohemiae*، *spicifera*، *Paraconiothyrium cyclothyrioides*، *Poaceascoma helicoides* و *Preussia minima* آرایه‌های جدید برای میکوفلور ایران هستند. علاوه بر این کلیه قارچ‌های شناسایی شده به‌جز گونه *Alternaria arborescens* برای اولین بار در این مطالعه به‌عنوان اندوفیت گیاهان میزبان یادشده در ایران گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های اندوفیت، گیاهان علفی، ITS، مراتع مازندران، آرایه‌های جدید.

مقدمه

فرم بیماری‌زا تبدیل شوند (Rodriguez et al., 2009). از زمان کشف اندوفیت، محققان تعاریف متعددی را برای توصیف این میکروارگانیسم‌ها در نظر گرفتند. به‌طورکلی قارچ‌های اندوفیت نقش‌های فیزیولوژیک و اکولوژیکی مهمی را در

قارچ‌های اندوفیت قارچ‌هایی هستند که بدون ایجاد علائم منفی، درون بافت زنده گیاهان زندگی می‌کنند (Bacon & White, 2000)، اما ممکن است در دوران پیری میزبان، به

روی برگ بوده است (Petrini, 1991; Arnold, 2007; Rakotoniriana *et al.*, 2008; He *et al.*, 2011; Douanla-Meli *et al.*, 2013). همچنین مطالعات اندکی نیز در زمینه بافت چوبی (Petrini & Fisher, 1988; Fisher *et al.*, 2008; Wang & Guo, 2007; Oses *et al.*, 1993) و بافت پوست (Chapela & Boddy, 1988; Fisher *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2008; Rivera-Orduna *et al.*, 2011; Takemoto *et al.*, 2014) انجام شده است. پراکندگی اندوفیت‌ها بیشتر از تمام گروه‌های گیاهی از جمله جلبک (Zuccaro *et al.*, 2008; Suryanarayanan *et al.*, 2010)، گل‌سنگ (Suryanarayanan *et al.*, 2005)، خزه و سرخس (Petrini, 1986)، سوزنی‌برگان (Giordano *et al.*, 2009) و نهاندانگان (Tejesvi *et al.*, 2010) گزارش شده است.

مرتج به‌عنوان یکی از منابع ثروت ملی کشور از اهمیت خاصی برخوردار است. مراتع در تولید علوفه و گوشت، حفظ آب و خاک، گیاهان دارویی و محصولات فرعی، حفاظت از محیط‌زیست و تنوع بیولوژیکی، جلوگیری از فرسایش خاک، مبارزه با آلودگی هوا، کاهش سر و صدای محیط، تعدیل و تلطیف آب‌وهوا، ایجاد فضای سبز و چشم‌اندازها و مناظر طبیعی، افزایش منابع آب زیرزمینی و غیره، حائز اهمیت است (Arzhangmehr & Asheri, 2012). حضور قارچ‌های اندوفیت در گیاهان علفی بر فیزیولوژی گیاه، عوامل بیماری‌زا و آفات و نیز اکوسیستم مرتع اثر می‌گذارد (Mirakbari, 2011). قارچ‌های اندوفیت به‌صورت همزیست در گیاهان علفی مراتع به فراوانی دیده می‌شوند و این نشان‌دهنده یک زنجیر گسترده از تعاملات، همیاری تا انگلی می‌باشد (Puri *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2005; Weber, 2009).

در تحقیقی کاربرد روش‌های کلاسیک و آغازگرهای اختصاصی در ردیابی قارچ‌های اندوفیت در گیاهان علفی تیره گندمیان بررسی شد و ۲۰ جدایه قارچ از چهار میزبان مرتعی جداسازی گردید (Ganjali *et al.*, 2004). در پژوهشی دیگر، با کاربرد مقایسه‌ای الگوهای PCR-RFLP در تاکسونومی گونه‌های قارچ اندوفیت *Neotyphodium* sp. موفق به جداسازی و شناسایی این قارچ از غلاف برگ و بذرها

زندگی میزبان خود ایفا کرده (Tintjer & Rudgers, 2006) و متابولیت‌های ثانویه زیستی با ساختار منحصر به فرد مانند آلکالوئیدها، بنزوپیرانول‌ها، کینون‌ها، اسیدهای فنولی، کوئینون‌ها، استروئیدها، تترالون‌ها، زانتون‌ها و غیره را تولید می‌کنند. این میکروارگانیسم‌ها با تولید متابولیت‌های ثانویه سازوکارهایی را برای غلبه بر عوامل بیماری‌زا به کار می‌برند (Tan & Zou, 2001). بنابراین به نظر می‌رسد گیاهان مواد غذایی را برای اندوفیت‌ها فراهم می‌کنند، در مقابل اندوفیت‌ها هم ممکن است سبب مقاومت میزبان در برابر آفات و بیماری‌ها شوند، یا وظایف مفید دیگری را انجام دهند (Hata & Futai, 1995; Arnold *et al.*, 2003). گیاهان حاوی قارچ همزیست نسبت به حمله بسیاری از حشرات مقاومند (Popay & Rowan, 1994). همچنین حضور قارچ همزیست اندوفیت در گیاه، آن را نسبت به طیف وسیعی از تنش‌های غیرزیستی همانند خشکی (Arachevaleta *et al.*, 1989)، شوری (Sabzalian, 2002) و سرما (Parsaeyan, 2003) مقاوم می‌کند. قارچ‌های اندوفیت ریشه ممکن است علاوه بر گیاه میزبان با دیگر موجودات زنده مانند قارچ‌های میکوریز و حیوانات نیز تعامل داشته باشند (Schulz & Boyle, 2005). از دیگر مزایای ظاهری اندوفیت‌ها برای میزبان می‌توان به تحمل مقاومت در برابر عناصر سنگین، افزایش مقاومت در برابر گیاه‌خواران، محافظت در برابر نماتدها، مقاومت سیستمیک در برابر عوامل بیماری‌زا و به‌طور کلی افزایش رشد اشاره کرد (Arnold *et al.*, 2003; Maddau *et al.*, 2008). قارچ‌های اندوفیت از نظر اکولوژیکی و جایگاه تاکسونومیک شامل گروه بسیار متنوعی از قارچ‌ها می‌شوند و از انواع مختلفی از گیاهان در اکوسیستم‌های گوناگون جداسازی شده‌اند (Maki, 2006; Harveson *et al.*, 2010).

تحقیقات نشان می‌دهد، بیشتر گیاهان در اکوسیستم‌های طبیعی با قارچ‌های اندوفیت یا میکوریز همزیست هستند (Petrini, 1986). جداسازی قارچ‌ها در گیاهان زراعی بسیار بیشتر از درختان و در بین درختان، درختان غیرمثمر بیشتر از درختانثمر مورد مطالعه قرار گرفته‌اند و بیشتر این مطالعات

دکستروز- آگار) منتقل شده و تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی به مدت ۳۰-۱۵ روز نگهداری شدند. تشتک‌های پتری به صورت مرتب و روزانه بررسی شدند. از حاشیه هر پرگنه رشد کرده، توسط سوزن‌های ظریف و استریل برداشته شد و به تشتک‌های پتری جدید منتقل شد. سپس جدایه‌ها به روش نوک‌ریسه، یا تک‌اسپور با استفاده از محیط کشت آب-آگار (WA) و PDA خالص شدند.

شناسایی ریخت‌شناسی جدایه‌ها

به منظور شناسایی ریخت‌شناسی از محیط کشت‌های PDA، WA و عصاره مالت-آگار (MEA) استفاده شد. برای بررسی ویژگی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ‌های جداسازی شده، ابتدا هریک از پرگنه‌ها به مدت ۲۰-۱۵ روز روی محیط کشت PDA در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس رشد داده شدند. پس از طی این مدت، نمونه‌ها تحت مطالعه ماکروسکوپی قرار گرفتند. ویژگی‌هایی از جمله رنگ سطح و پشت پرگنه، نوع بافت پرگنه قارچی، نحوه رشد حاشیه پرگنه، نواحی رشد موجود در پرگنه و ویژگی‌های مربوط به تشکیل اندام‌های باردهی و غیره مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بررسی ساختارهای تکثیری غیرجنسی و جنسی (در صورت تشکیل در محیط کشت)، کلیه نمونه‌ها تحت مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند.

شناسایی مولکولی جدایه‌ها

به منظور تهیه توده میسلیومی موردنیاز برای استخراج DNA، مقداری از هیف‌های قارچ از کشت‌های خالص شده با سوزن استریل به درون شیشه‌های حاوی محیط مایع عصاره سیب زمینی- دکستروز (PDB) منتقل و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس روی شیکر (۱۲۰ دور در دقیقه) قرار داده شدند. بر حسب سرعت رشد جدایه‌ها، به مدت ۷ تا ۱۰ روز، پس از رشد و تشکیل میسلیوم قارچ، توده‌های میسلیومی توسط آب مقطر استریل شسته شد. استخراج

میزبان‌های گیاهی *F. pratensis*, *Festuca ovina* و *Melica persica*, *Bromus tomentellus*, *arundinacea* و *Lolium preenne* شدند (Dehghanpour Farashah et al., 2006).

در تحقیقی که به جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت ریشه گیاه دارویی علف دندان (*Plumbago zeylanica* L.) پرداختند، دو استرین مختلف قارچ اندوفیت با دیواره تیره از ریشه گیاه جدا شدند. طبق بررسی مولکولی براساس توالی 28S rDNA دو قارچ *Aspergillus niger* و *Perenniporia* sp. از ریشه این گیاه گزارش شد (Sarkar & Dutta, 2016).

هدف از تحقیق پیش‌رو جداسازی قارچ‌های اندوفیت از ریشه برخی از گیاهان مرتعی مناطق مرکزی استان مازندران و شناسایی آنها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی است.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی

به منظور جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت ریشه گیاهان علفی نمونه‌برداری‌های متعددی در سال ۱۳۹۵-۹۶ از مراتع بالامرزنک و گاوان‌کلا واقع در شهرستان بابل انجام شد. نمونه‌های گیاهی از ناحیه ریشه گیاهان علفی سالم و بدون علائم بیماری شامل آقطی (*Sambucus ebulus* L.)، پونه آبی (*Mentha aquatic* L.)، پنجه‌مرغی (*Cynodon dactylon* L.)، پونه رسمی (*Mentha pulegium* L.)، ترشک (*Rumex acetosa* L.)، تمشک (*Rubus* sp. L.)، گل راعی (*Hypericum perforatum* L.)، فستوکا (*Festuca glauca* L.)، انیسون (بادیان رومی) (*Pimpinella anisum* L.) و قنطریون صغیر (*Centaureum minus* L.) به صورت تصادفی جمع‌آوری شدند. نمونه‌های جمع‌آوری شده درون پاکت‌های کاغذی با ثبت مشخصات به آزمایشگاه منتقل شدند. ضدعفونی نمونه‌ها برای جداسازی قارچ‌های اندوفیت به روش Duanla-Meli و همکاران (۲۰۱۳) با اندکی تغییرات انجام شد. سپس نمونه‌ها به محیط کشت PDA (سیب‌زمینی-

میزبان گیاهی شامل آفتی، پونه آبی، علف راعی، پونه رسمی، تمشک، ترشک، انیسون، قنطریون صغیر، پنجه مرغی و فستوکا در دو منطقه مراتع بالامرزنک و روستای گاوان کلا واقع در شهرستان بابل انجام شد. در مجموع ۱۶۰ جدایه قارچ به دست آمد. پس از بررسی مقدماتی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، جدایه‌ها دسته‌بندی شدند. از بین جدایه‌های خالص‌شده براساس بررسی‌های مقدماتی ریخت‌شناسی، ۵۵ جدایه به نمایندگی انتخاب و مورد مطالعه تاکسونومیکی قرار گرفتند و براساس منابع و با استفاده از بررسی‌های مولکولی توالی ناحیه ITS1-5.8S استفاده از بررسی‌های مولکولی توالی ناحیه ITS2 شناسایی شدند. در مجموع ۲۷ گونه متعلق به ۱۴ جنس شناسایی گردید (جدول ۱). از هر گونه به‌طور متوسط دو جدایه به دست آمد و توصیف ریخت‌شناسی گونه‌هایی که برای اولین بار در مایکوفلور ایران گزارش می‌شوند، در ادامه آورده شده است.

***Botryosphaeria auasmontanum* F.J.J. van der Walt, Slippers & G.J. Marais, 2014**

این جدایه هشت روز پس از کشت نمونه گیاهی از گیاه ترشک جداسازی شد. ویژگی ریخت‌شناسی این نمونه با مشخصات توصیف شده در تحقیق Slippers و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت داشت. سرعت رشد پرگنه قارچ در محیط PDA زیاد بود و پرگنه سفید با میسلیم‌های هوایی کرک‌دار متمایل به سفید در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی تولید کرد. رشد میسلیمومی، بین ۶-۸ میلی‌متر در روز بود (شکل ۱). کنیدیوم‌ها بیضی تا تخم مرغی شکل با پایه تخت و میسلیم‌ها به رنگ قهوه‌ای تا زیتونی خاکستری بودند. ویژگی ریخت‌شناسی این گونه با گونه تشخیص داده شده براساس توالی ناحیه ITS جدایه در بانک ژن NCBI نیز مطابقت داشت (۱۰۰ درصد تشابه توالی با MF398863). این جدایه برای اولین بار در ایران شناسایی شد و گونه جدید برای مایکوفلور ایران است.

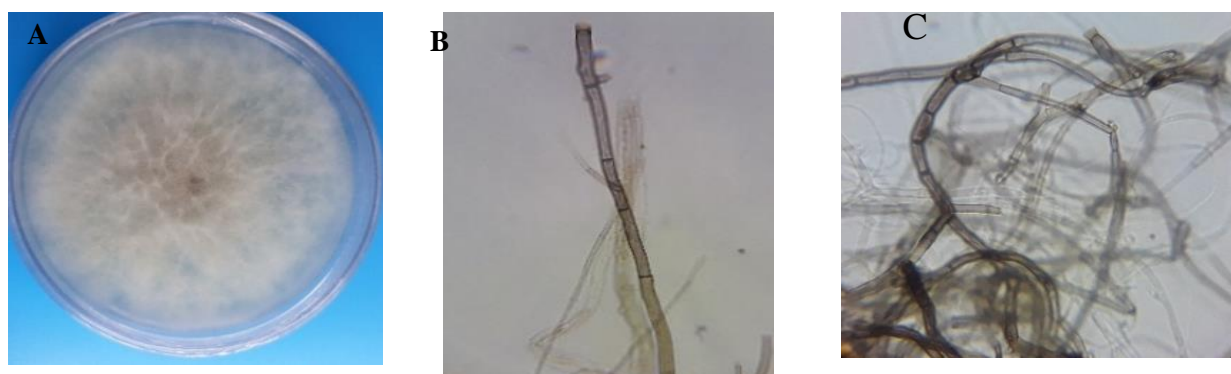
DNA با استفاده از CTAB انجام گردید (Moeller *et al.*, 1992). کمیت و کیفیت DNA استخراج شده به ترتیب با استفاده از روش الکتروفورز روی ژل آگارز و اسپکتروفوتومتری بررسی شد. سپس تکثیر قطعات DNA ریبوزومی با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 (White *et al.*, 1990) در واکنش زنجیره‌ای پلیمرز انجام شد. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۰/۸ میکرولیتر $MgCl_2$ ده میلی‌مولار، یک میکرولیتر dNTPs ده میلی‌مولار، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR با غلظت 10x، به همراه ۰/۳ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (5U/ μ l) (شرکت سیناکلون، ایران) و یک میکرولیتر از هر یک از آغازگرهای رفت و برگشت با غلظت ده پیکومول بر میکرولیتر، یک میکرولیتر DNA (با غلظت ۵۰ نانوگرم/میکرولیتر) و ۱۷ میکرولیتر آب دیونیزه آماده شد. برنامه واکنش زنجیره‌ای پلیمرز به صورت یک مرحله واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۵ چرخه تکثیر یا شرایط واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، مرحله اتصال در دمای ۵۸ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و در پایان یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. قطعه تکثیر شده برای تعیین توالی به شرکت بایونیر کره جنوبی (Bioneer, South Korea) فرستاده شد. پس از دریافت توالی‌های نوکلئوتیدی، با استفاده از ابزار جستجوی Blast در سایت NCBI بررسی شد. توالی‌های نوکلئوتیدی متعلق به جدایه‌های مورد بررسی در این تحقیق با توالی گرفته شده از بانک ژن مقایسه و توالی‌ها در پایگاه اطلاعاتی NCBI ثبت شدند.

نتایج و بحث

در این بررسی جداسازی قارچ‌های اندوفیت از ۱۰

جدول ۱- فهرست جدایه‌های شناسایی شده در این تحقیق، نام میزبان و محل جمع‌آوری آنها

| محل جمع‌آوری | میزبان | Gen Bank Accession number | نام قارچ | ردیف |
|--------------|-----------------------------|---------------------------|---|------|
| بالامرznak | <i>Rubus sp.</i> | MK299997 | <i>Alternaria alternata</i> | ۱ |
| بالامرznak | <i>Mentha pelagium</i> | MK299998 | <i>Allternaria arborescens</i> | ۲ |
| گاوان‌کلا | <i>Mentha aquatica</i> | MK299999 | <i>Alternaria burnsii</i> | ۳ |
| بالامرznak | <i>Sambucus ebulus</i> | MK300000 | <i>Alternaria dumosa</i> | ۴ |
| بالامرznak | <i>Rumex acetosa</i> | MK300001 | <i>Alternaria solani</i> | ۵ |
| بالامرznak | <i>Mentha pulegium</i> | MK300002 | <i>Alternaria tenuissima</i> | ۶ |
| بالامرznak | <i>Rumex acetosa</i> | MK300003 | <i>Botryosphaeria dothidea</i> | ۷ |
| بالامرznak | <i>Rumex acetosa</i> | MK300004 | <i>Botryosphaeria auasmontanum</i> | ۸ |
| بالامرznak | <i>Hypericum perforatum</i> | MK300005 | <i>Curvularia australiensis</i> | ۹ |
| بالامرznak | <i>Cynodon dactylon</i> | MK300006 | <i>Curvularia buchloes</i> | ۱۰ |
| گاوان‌کلا | <i>Cynodon dactylon</i> | MK300007 | <i>Curvularia spicifera</i> | ۱۱ |
| گاوان‌کلا | <i>Festuca glauca</i> | MK300008 | <i>Cladosporium tenuissimum</i> | ۱۲ |
| بالامرznak | <i>Pimpinella anisum</i> | MK300011 | <i>Daldinia concentrica</i> | ۱۳ |
| بالامرznak | <i>Festuca glauca</i> | MK300012 | <i>Diaporthe bohemiae</i> | ۱۴ |
| گاوان‌کلا | <i>Rumex acetosa</i> | MK300013 | <i>Fusarium acuminatum</i> | ۱۵ |
| گاوان‌کلا | <i>Rumex acetosa</i> | MK300014 | <i>Fusarium avenaceum</i> | ۱۶ |
| بالامرznak | <i>Sambucus ebulus</i> | MK300015 | <i>Fusarium equiseti</i> | ۱۷ |
| بالامرznak | <i>Festuca glauca</i> | MK300016 | <i>Fusarium oxysporum</i> | ۱۸ |
| گاوان‌کلا | <i>Festuca glauca</i> | MK300017 | <i>Fusarium tricinctum</i> | ۱۹ |
| بالامرznak | <i>Cynodon dactylon</i> | MK300018 | <i>Fusarium verticillioides</i> | ۲۰ |
| بالامرznak | <i>Hypericum perforatum</i> | MK300019 | <i>Microsphaeropsis arundinis</i> | ۲۱ |
| بالامرznak | <i>Cynodon dactylon</i> | MK300020 | <i>Nigrospora sphaerica</i> | ۲۲ |
| گاوان‌کلا | <i>Centuarium minus</i> | MK300021 | <i>Paraconiothyrium cyclothyrioides</i> | ۲۳ |
| گاوان‌کلا | <i>Cynodon dactylon</i> | MK300022 | <i>Periconia macrospinoso</i> | ۲۴ |
| بالامرznak | <i>Festuca glauca</i> | MK300023 | <i>Poaceascoma helicoides</i> | ۲۵ |
| بالامرznak | <i>Festuca glauca</i> | MK300024 | <i>Preussia minima</i> | ۲۶ |
| بالامرznak | <i>Mentha aquatica</i> | MK300025 | <i>Xylaria heliscus</i> | ۲۷ |

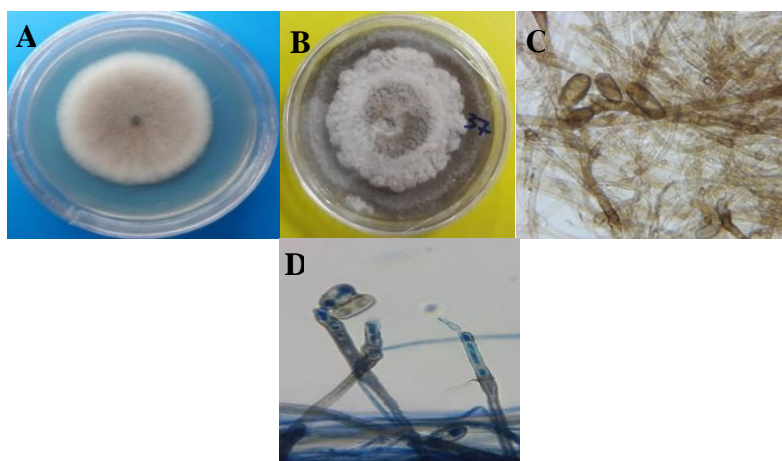


شکل ۱- گونه *Botryosphaeria auasmontanum*: (A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از هفت روز؛ (B و C) هیف‌های قارچ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰

کنیدیوم‌ها مستقیم یا صاف و در انتها گرد و به‌رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ تا قهوه‌ای مایل به قرمز بودند. کنیدیوم‌ها دارای ۳-۵ سلول تشکیل دادند که بیضوی یا مستطیلی بودند. اندازه آنها ۱۱-۶ × ۴۰-۱۴ میکرومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۲). ویژگی ریخت‌شناسی این گونه با گونه شناسایی شده براساس توالی ناحیه ITS در بانک ژن NCBI مطابقت داشت (۱۰۰ درصد تشابه توالی با MK299137). این جدایه برای اولین بار در ایران شناسایی شد و گونه جدیدی برای میکوفلور ایران می‌باشد.

Curvularia australiensis (M.B. Ellis) L.
Manamgoda, Cai & K.D. Hyde, 2012

این جدایه هشت روز پس از کشت نمونه گیاهی از گیاه علف راعی جداسازی شد. ریخت‌شناسی این گونه با مشخصات توصیف شده در تحقیق Da Cunha و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت داشت. رنگ پرگنه خاکستری مایل به قهوه‌ای روشن و سطح آن حالت مخملی بود. کنیدیوفورها قهوه‌ای رنگ، انعطاف‌پذیر، دارای دیواره صاف و تا ۱۵۰ میکرومتر طول و اغلب ۳-۷ میکرومتر عرض داشتند.

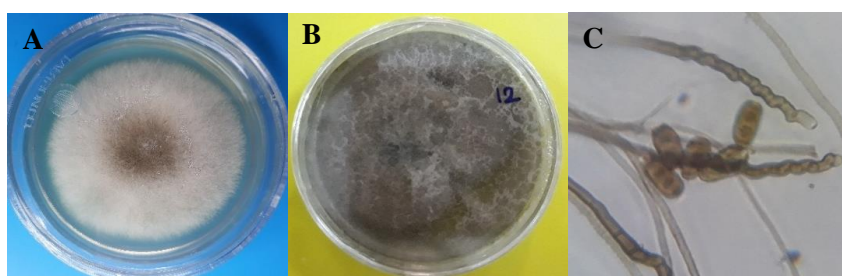


شکل ۲- گونه *Curvularia australiensis*: (A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از شش روز؛ (B) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از سه هفته؛ (C و D) کنیدیوم و کنیدیوفور قارچ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰

زیتونی و سلول‌های پایه کنیدی‌ها تا حدودی تیره‌تر بودند. کنیدی‌ها به اندازه ۳۱-۲۱ × ۱۲-۹ میکرومتر مشاهده شدند (شکل ۳). ویژگی ریخت‌شناسی این گونه با گونه شناسایی شده براساس توالی ناحیه ITS در بانک ژن NCBI مطابقت داشت (۱۰۰ درصد تشابه توالی با MG250427). این جدایه برای اولین بار در ایران شناسایی شد و گونه جدیدی برای مایکوفلور ایران می‌باشد.

***Curvularia buchloes* (Lefebvre & Aar.G. Johnson)
Manamgoda, Rossman & K.D. Hyde, 2014**

این جدایه پس از یک هفته، از کشت نمونه گیاه پنجه‌مرغی جداسازی شد. ویژگی‌های ریخت‌شناسی این جدایه با مشخصات توصیف شده در تحقیق Baba-Ahmadi و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت. رنگ پرگنه خاکستری کم‌رنگ تا قهوه‌ای با میسلیم‌های هوایی کرک‌دار به رنگ سفید بود. کنیدی‌ها دارای دیواره صاف و به‌رنگ قهوه‌ای

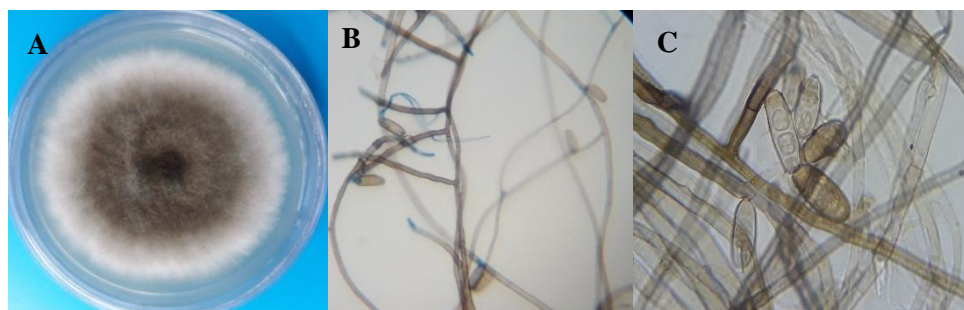


شکل ۳- گونه *Curvularia buchloes*: (A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از هفت روز؛ (B) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از سه هفته؛ (C) کنیدی و کنیدیوفور قارچ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰

۸-۴ میکرومتر ظاهر شدند. کنیدیوسپورها به صورت زنجیره‌های منظم در مکان اسپورزایی وجود داشتند. کنیدی‌های قهوه‌ای، استوانه‌ای شکل بودند و اندازه ۴۰-۲۰ × ۱۴-۹ میکرومتر داشتند (شکل ۴). ویژگی ریخت‌شناسی این گونه با گونه شناسایی شده براساس نتایج مولکولی نیز مطابقت داشت (۱۰۰ درصد تشابه توالی با LT631349). این جدایه در ایران برای اولین بار شناسایی شد و گونه جدیدی برای مایکوفلور ایران می‌باشد.

***Curvularia spicifera* (Bainier) Boedijn, 1908**

این جدایه هفت روز پس از کشت نمونه گیاهی از گیاه پنجه‌مرغی جداسازی شد. خصوصیات ریخت‌شناسی این نمونه با مشخصات توصیف شده در تحقیق Da Cunha و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت داشت. سرعت رشد پرگنه این قارچ زیاد و پرگنه به رنگ زیتونی تیره مایل به قهوه‌ای با کرک‌های سفید رنگ بوده است. کنیدیوم‌ها به صورت صاف، مستقیم و غیرمنشعب بودند که به طول ۲۵۰ میکرومتر و عرض

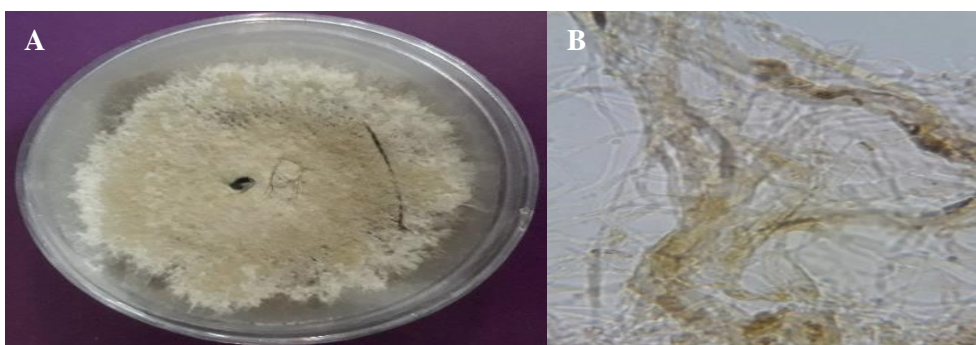


شکل ۴- گونه *Curvularia spicifera*: (A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از هفت روز؛ (B) کنیدی و کنیدیوفور با بزرگ‌نمایی ۴۰؛ (C) کنیدی و کنیدیوفور قارچ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰

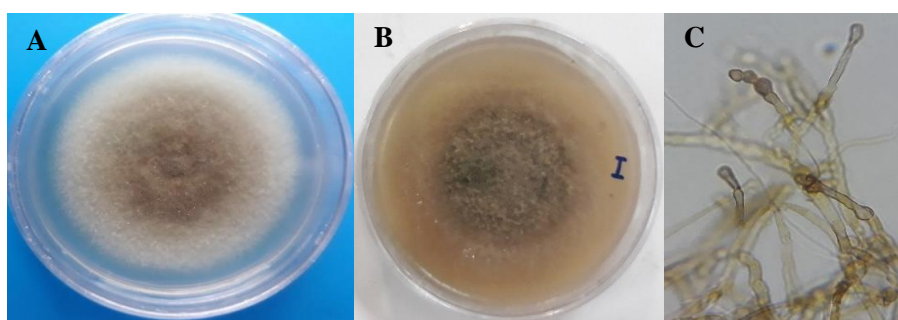
مشاهده شد. اندازه پیکنیدیومها در طول ۶۵۰-۷۰۰ میکرومتر و عرض آن ۲۵۰-۵۰۰ میکرومتر، و دیواره آن قهوه‌ای تیره بود. دیواره کنیدیوفورها نازک، قهوه‌ای و چند سلولی بود. سلول‌های کنیدی‌زا در نوک کنیدیوفور قرار گرفتند و ابعاد آنها $۱/۲-۱/۵ \times ۱۸-۸$ میکرومتر اندازه‌گیری شد. ویژگی ریخت‌شناسی این گونه با گونه شناسایی شده براساس توالی ناحیه ITS در بانک ژن NCBI مطابقت داشت (۹۴ درصد تشابه توالی با NR_164425). این جدایه برای اولین بار در ایران شناسایی شد و گونه جدیدی برای مایکوفلور ایران می‌باشد.

***Diaporthe bohemiae* Guarnaccia, Eichmeier & Crous, 2018**

این جدایه ۱۲ روز پس از کشت از گیاه فستوکا جداسازی شد. ویژگی ریخت‌شناسی این نمونه با مشخصات توصیف شده گونه در تحقیق Guarnaccia و همکاران (۲۰۱۸) مطابقت داشت. سرعت رشد پرگنه قارچ در محیط PDA متوسط و قطر رشدی آن بعد از ۱۲ روز ۲۰ میلی‌متر بود. رشد پرگنه قارچ به شکل دوایر متحدالمرکز و رنگ پرگنه سبز زیتونی تا قهوه‌ای بود (شکل ۵). قارچ در فرم غیرجنسی تشکیل پیکنید داده که این پیکنیدها به رنگ قهوه‌ای تیره



شکل ۵- گونه *Diaporthe bohemiae*؛ (A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از دو هفته؛ (B) هیف‌های قارچ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰



شکل ۶- گونه *Microsphaeropsis arundinis*؛ (A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از ۱۰ روز؛ (B) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از سه هفته؛ (C) هیف‌های قارچ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰

توصیف شده در تحقیق Pendle و همکاران (۲۰۰۴) مطابقت داشت. سرعت رشد پرگنه این قارچ در محیط PDA متوسط بود و قطر پرگنه در محیط PDA پس از گذشت ۱۴ روز به ۴۰ میلی‌متر رسید. پرگنه این قارچ به رنگ سفید و در مرکز

***Microsphaeropsis arundinis* (S. Ahmad) B. Sutton, 1980**

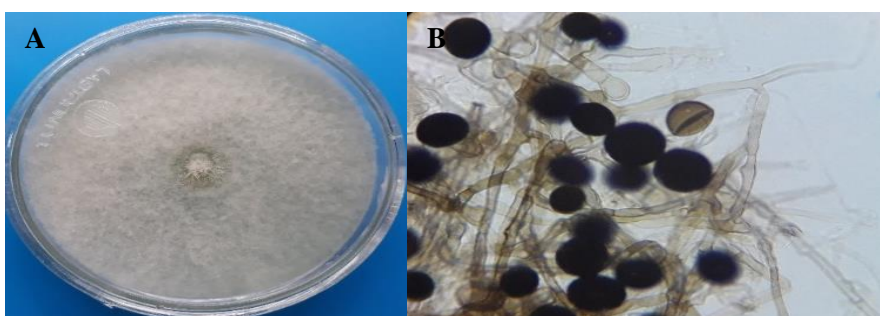
این جدایه هفت روز پس از کشت نمونه از گیاه علف راعی جداسازی شد. ویژگی ریخت‌شناسی این نمونه با مشخصات

سرعت رشد پرگنه این قارچ در محیط PDA زیاد بود و قطر پرگنه قارچ پس از طی دو هفته به ۱۰۰ میلی‌متر رسید. رنگ محیط در ابتدای رشد سفید، اما بعد از گذشت یک هفته به رنگ خاکستری روشن درآمد. کنیدیوفور دارای انشعاب و کوتاه با ۳-۵ دیواره به ابعاد ۱۴-۱۹×۲۰-۳۷ میکرومتر بودند. کنیدیوفورها صاف یا خمیده و سلول انتهایی قهوه‌ای روشن بود. کنیدی سیاه، بیشتر کروی تا بیضی در ابعاد ۲۰-۱۵ یا ۱۳-۱۸ × ۱۴-۱۹ میکرومتر مشاهده شد (شکل ۷). ویژگی ریخت‌شناسی این گونه با گونه شناسایی شده در بررسی‌های مولکولی مطابقت داشت (۹۹ درصد تشابه توالی با MT225783). این جدایه برای اولین بار در ایران شناسایی شد و گونه جدیدی برای مایکوفلور ایران می‌باشد.

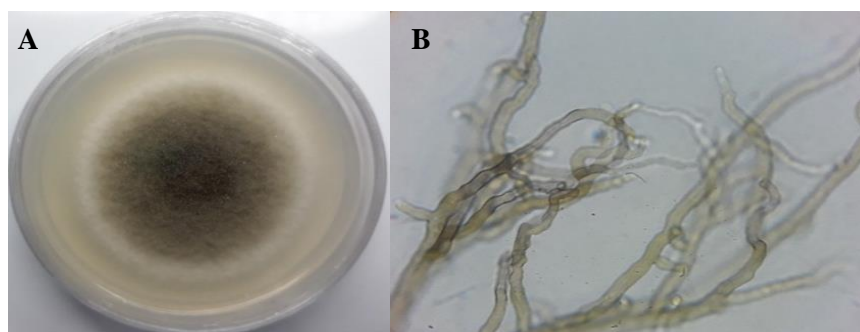
به رنگ زرد تا قهوه‌ای کم‌رنگ و در حالت معکوس به رنگ قهوه‌ای بود. کنیدیوم‌ها دارای دیواره صاف، استوانه‌ای، قهوه‌ای رنگ و به ابعاد ۳/۵-۴/۵ × ۱-۱/۵ میکرومتر بودند (شکل ۶). ویژگی ریخت‌شناسی این گونه با گونه شناسایی شده در بررسی مولکولی مطابقت داشت (۱۰۰ درصد تشابه توالی با KU574701). این جدایه برای اولین بار در ایران شناسایی شد و گونه جدیدی برای مایکوفلور ایران می‌باشد.

Nigrospora sphaerica (Sacc.) Mason, 1927

این جدایه پنج روز پس از کشت از گیاه پنجه‌مرغی جداسازی شد. ویژگی ریخت‌شناسی این نمونه با مشخصات توصیف شده در تحقیق Domsch (۱۹۸۰) مطابقت داشت.



شکل ۷- گونه *Nigrospora sphaerica*؛ (A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از شش روز؛ (B) کنیدیوم‌های قارچ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰



شکل ۸- گونه *Paraconiothyrium cyclothyrioides*؛ (A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از هفت روز؛ (B) هیف‌های قارچ با بزرگ‌نمایی ۱۰۰

صغیر جداسازی شد. خصوصیات ریخت‌شناسی این نمونه با مشخصات توصیف شده در تحقیق Verkleij و همکاران

Paraconiothyrium cyclothyrioides Verkleij, 2004

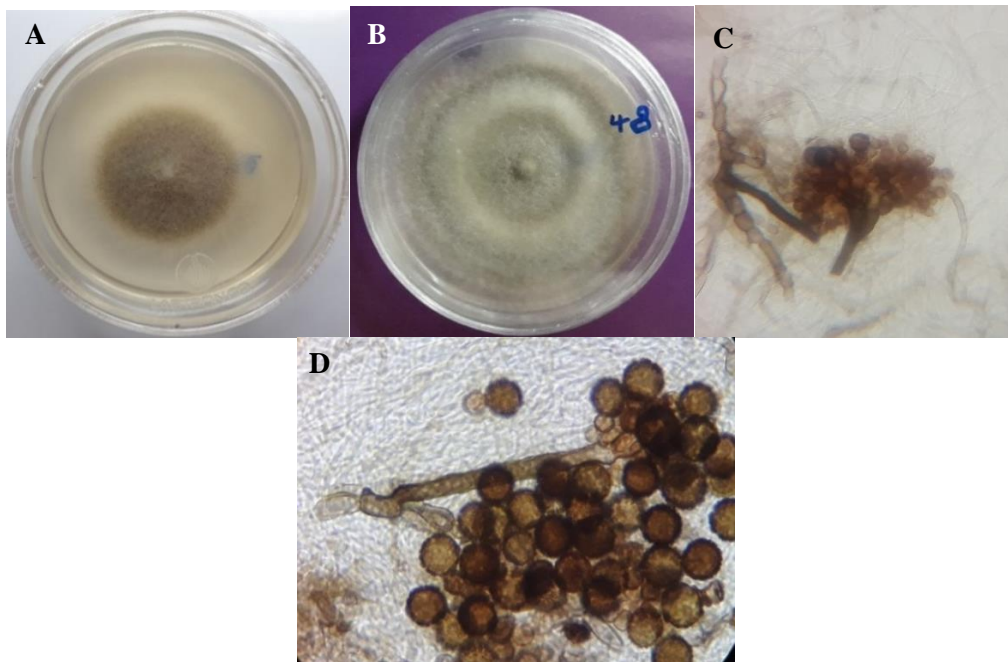
این جدایه پس از هفت روز از کشت نمونه گیاه قنطریون

مرغی جداسازی شد. سرعت رشد پرگنه قارچ در محیط PDA متوسط بود و پس از طی دو هفته، قطر رشدی پرگنه به ۲۵ میلی‌متر رسید. رنگ پرگنه قارچ قهوه‌ای روشن تا زیتونی، ریشه تیره، دیواره‌دار، کنیدیوفور ساده و کنیدیوم‌ها کروی و تک‌سلولی بود (شکل ۹). Yuan و همکاران (۲۰۱۰)، قارچ *Periconia macrospinos* را به‌عنوان اندوفیت برنج از چین گزارش کردند، همچنین بررسی مولکولی و ریخت‌شناسی آنان نشان داد که ناحیه ITS2، ITS1، 5.8S ناحیه مناسبی برای بررسی این گونه می‌باشد. نتایج حاصل از بررسی مولکولی این جدایه با نتایج Yuan و همکاران (۲۰۱۰) مطابقت داشت (۹۹ درصد تشابه توالی با KU9015558). این جدایه برای اولین بار در ایران شناسایی شد و گونه جدیدی برای میکوفلور ایران می‌باشد.

(۲۰۰۴) مطابقت داشت. سرعت رشد پرگنه این قارچ در محیط PDA متوسط بود و قطر رشدی پرگنه بعد از ۱۴ روز به ۳۰ میلی‌متر رسید (شکل ۸). پرگنه روی محیط PDA به‌صورت دواپر متحدالمرکز رشد کرد که به‌رنگ سبز زیتونی تا خاکستری مشاهده شد. پیکنیدیوم صاف، کروی، با یک دهانه به قطر ۴۰-۲۰ میکرومتر و کنیدی‌ها داخل پیکنیدیوم تشکیل شدند. کنیدی‌ها دارای اشکال متغیر، ابتدا روشن و زمان بلوغ تیره، بدون بند و به ابعاد $۳/۵-۶ \times ۲-۳$ میکرومتر بودند. ویژگی ریخت‌شناسی این گونه با گونه تشخیص داده شده براساس توالی ناحیه ITS مطابقت داشت (۹۹ درصد تشابه توالی با LT796893). این جدایه برای اولین بار در ایران شناسایی شد.

***Periconia macrospinos* Lefebvre & Aar. G.
Johnson, 1949**

این جدایه دوازده روز پس از کشت نمونه از گیاه پنجه



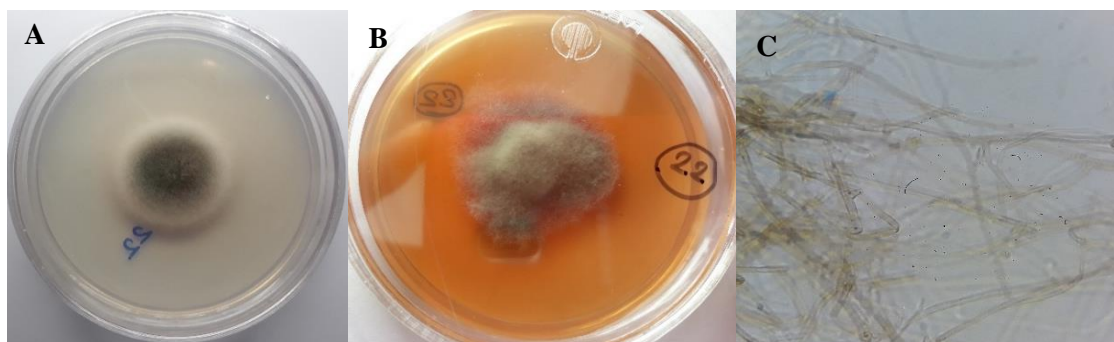
شکل ۹- گونه *Periconia macrospinos*؛ (A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از هفت روز؛ (B) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از ۲۲ روز؛ (C) کنیدیوفور و کنیدیوم با بزرگ‌نمایی ۴۰؛ (D) کنیدیوم و کنیدیوفور با بزرگ‌نمایی ۱۰۰

این جدایه دوازده روز پس از کشت نمونه از گیاه فستوکا جداسازی شد. سرعت رشد پرگنه کم بود و قطر رشدی پرگنه

***Poaceascoma helicoides* Phookamasak & K. D.
Hyde, 2015**

مطابقت داشت، اما به دلیل کند رشد بودن و عدم تشکیل کنیدیوم از روش مولکولی برای تشخیص و تأیید گونه استفاده شد (۹۹ درصد تشابه توالی با KP998459). این جدایه برای اولین بار در ایران شناسایی شد و گونه جدیدی برای مایکوفلور ایران می‌باشد.

بعد از دو هفته به ۱۵ میلی‌متر رسید. رنگ پرگنه سبز زیتونی تا قهوه‌ای است و با گذر زمان و رشد قارچ، رنگ محیط تغییر کرد. ریشه‌ها شفاف و قهوه‌ای رنگ بودند (شکل ۱۰). برخی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی این نمونه با مشخصات توصیف شده گونه در تحقیق Phookamasak و همکاران (۲۰۱۵)

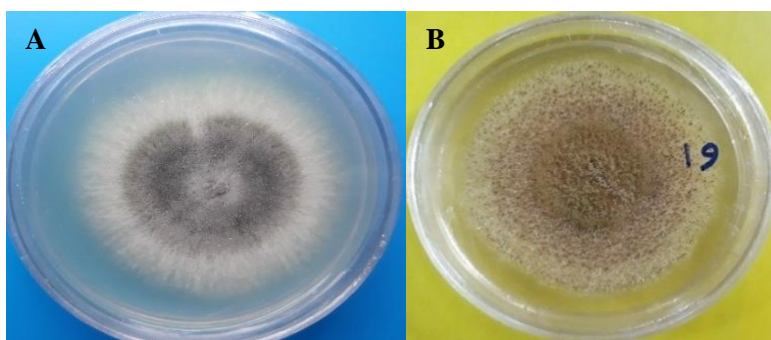


شکل ۱۰- گونه *Poaceascoma helicoides*؛ (A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از یک هفته؛ (B) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از ۲۱ روز؛ (C) هیف‌های قارچ با بزرگ‌نمایی ۴۰

توصیف شده در تحقیق Zhong و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت داشت. اما به دلیل عدم تشکیل کنیدیوم و اندام‌های تشخیصی قارچ تنها از روش مولکولی برای تشخیص و تأیید گونه استفاده شد (۹۹ درصد تشابه توالی با KP942941). این جدایه برای اولین بار در ایران شناسایی شد و گونه جدیدی برای مایکوفلور ایران می‌باشد.

Preussia minima (Ayersw.) Arx, 1973

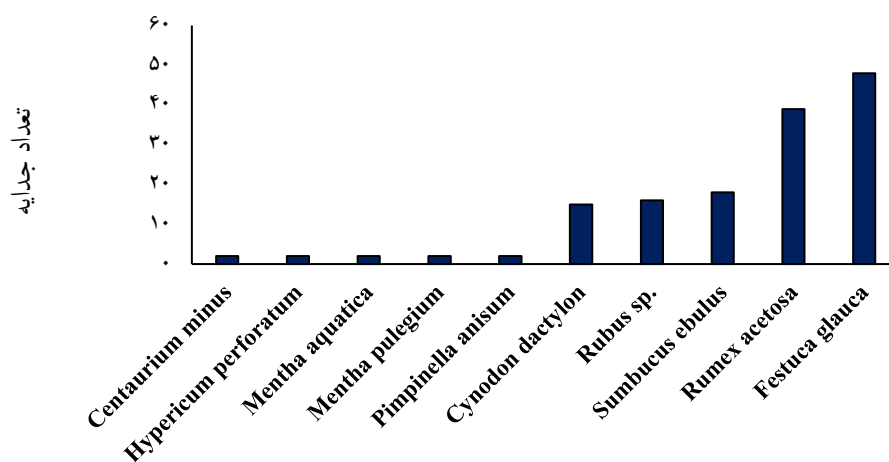
این جدایه هفت روز پس از کشت از گیاه فستوکا جداسازی شد. سرعت رشد پرگنه در محیط PDA متوسط بود و قطر رشدی آن بعد از ۱۵ روز به ۴۵ میلی‌متر رسید. رنگ پرگنه سبز زیتونی تا قهوه‌ای روشن بود. ریشه‌ها شفاف و سفید رنگ بودند (شکل ۱۱). برخی از مشخصات ریخت‌شناسی این نمونه با گونه



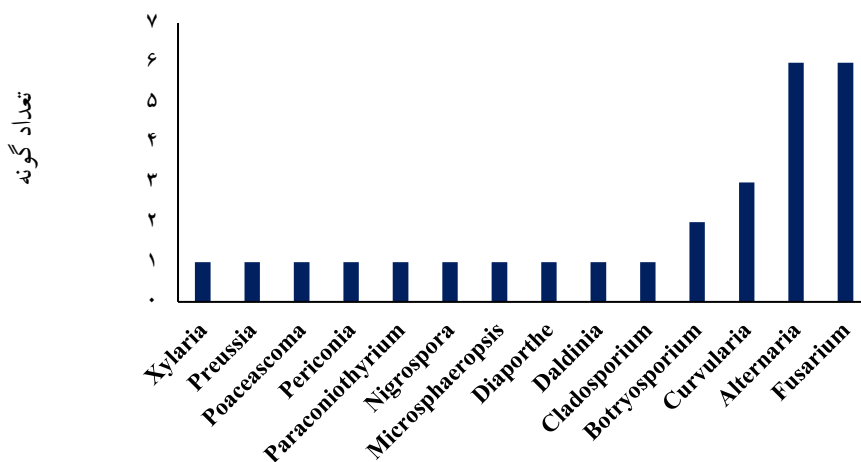
شکل ۱۱- گونه *Preussia minima*؛ (A) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از هشت روز؛ (B) رشد قارچ روی محیط کشت PDA پس از ۲۱ روز

جنس شناسایی شده در این تحقیق، بیشترین تعداد جدایه مربوط به جنس‌های *Alternaria* و *Fusarium* هر یک با فراوانی ۲۱ جدایه، همچنین بیشترین تعداد گونه به دست آمده مربوط به جنس *Alternaria* و *Fusarium* هر یک با فراوانی شش گونه بود (شکل ۱۳). از بین ۲۷ گونه شناسایی شده، بیشترین تعداد گونه به ترتیب از ریشه گیاه فستوکا با فراوانی هفت گونه، ترشک با فراوانی شش گونه و پنجه‌مرغی با فراوانی پنج گونه، جداسازی و شناسایی شد (شکل ۱۴).

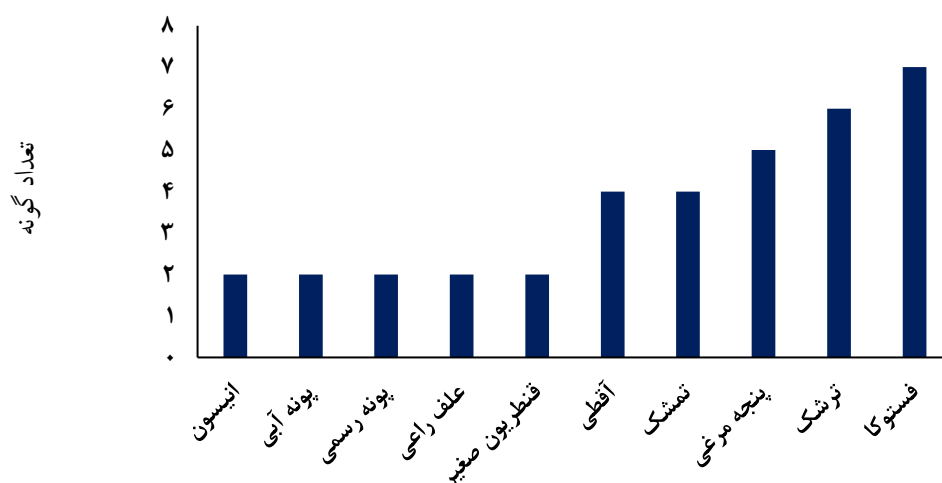
در این تحقیق، از ریشه ده گونه گیاهی نمونه برداری شد. بیشترین تعداد جدایه قارچ از ریشه فستوکا (*Festuca glauca*) با فراوانی ۴۸ جدایه و ترشک (*Rumex acetosa*) با فراوانی ۳۹ جدایه و کمترین فراوانی مربوط به پونه رسمی (*Mentha pulegium*)، گل راعی (*Hypericum perforatum*)، پونه آبی (*Mentha aquatica*)، انیسون (*Pimpinella anisum*) و قنطریون صغیر (*Centaureum minus*) هر یک با دو جدایه بوده است (شکل ۱۲). از بین ۱۴



شکل ۱۲- فراوانی جدایه‌های قارچی در میزبان‌های مورد بررسی در تحقیق



شکل ۱۳- فراوانی گونه‌های شناسایی شده در جنس‌های مورد بررسی در این تحقیق



شکل ۱۴- فراوانی گونه‌های قارچی در میزبان‌های گیاهی این تحقیق

Curvularia و *Preussia minima* از ریشه فستوکا و *Nigrospora*، *Curvularia spicifera*، *buchloes* از ریشه پنجه مرغی، *Periconia macrospinoso* و *sphaerica*، *Microsphaeropsis* و *Curvularia australiensis* از ریشه علف راعی، *Botryosphaeria arundinis* از ریشه ترشک و گونه *auasmontanum* از ریشه قنطریون صغیر، آرایه‌های جدیدی برای مایکوفلور ایران می‌باشند.

کلیه میزبان‌های مورد مطالعه، به جز گونه *Alternaria arborescens* از ریشه پونه رسمی (*Mentha pulegium*)، میزبان‌های جدیدی برای قارچ‌های جداسازی شده در این تحقیق هستند. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده تنوع قارچ‌های اندوفیت بافت ریشه در گیاهان علفی بود که جنس و گونه قارچ به کمک روش‌های مولکولی قابل تشخیص است و جمعیت و تنوع آنها در میزبان‌های مختلف، متفاوت است. همچنین بیشترین قارچ‌های شناسایی شده در این تحقیق مربوط به جنس‌های *Alternaria* و *Fusarium* است و بیشترین گونه‌های قارچی از ریشه گیاه فستوکا جداسازی شد.

تاکنون پژوهش‌های انجام شده روی اندوفیت‌ها با هدف‌های مختلفی انجام شده است. تمام گیاهان آوندی و غیر آوندی، خشکی‌زی و دریازی مطالعه شده تاکنون، توسط گروهی از قارچ‌ها با عنوان اندوفیت، کلونیزه می‌شوند. در مجموع از بین جدایه‌های شناسایی شده، برخی از گونه‌ها به دلیل تولید اندام بارده مناسب با استفاده از کلیدهای شناسایی و مقالات معتبر و بر حسب ویژگی‌های ریخت‌شناسی شناسایی شدند و نتایج حاصل از بررسی مولکولی آنها نشان داد که ناحیه ITS2، ITS1، 5/8S، می‌تواند به‌عنوان متمم مناسب در شناسایی آنها استفاده شود. در مقابل بعضی از جدایه‌ها به دلیل عدم تولید اسپور فقط به روش مولکولی شناسایی شدند. براین اساس سه جنس برای اولین بار به‌عنوان اندوفیت از گیاهان مرتعی در ایران گزارش می‌شود. جنس‌های جدید شناسایی شده شامل *Microsphaeropsis* از ریشه گیاه علف راعی (*Hypericum perforatum*)، جنس *Poaceascoma* از ریشه گیاه فستوکا (*Festuca glauca*) و جنس *Paraconiothyrium* از ریشه گیاه قنطریون صغیر (*Centaurium minus*) هستند.

در بین جدایه‌های به‌دست آمده، ۱۱ گونه جدید برای فلور قارچی ایران شناسایی شد. براین اساس، گونه‌های *Diaporthe bohemiae*، *Poaceascoma helicoides* و

- L.) trees in the Alps. *Fungal Diversity*, 38: 69-83.
- Guarnaccia, V., Groenewald, J.Z., Woodhall, J., Armengol, J., Cinelli, T., Eichmeier, A., Ezra, D., Fontaine, F., Gramaje, D., Gutierrez-Aguirregabiria, A., Kaliterna, J., Kiss, L., Larignon, P., Luque, J., Mugnai, L., Naor, V., Raposo, R., Sándor, E., Váczy, K.Z. and Crous, P.W. 2018. Diaporthe diversity and pathogenicity revealed from a broad survey of grapevine diseases in Europe. *Persoonia*, 40: 135-153.
- Harveson R. M., Markell S. G., Goswami R., Urrea C.A., Burrows M. E., Dugan k. and Skoglund L.G. 2010. Ascochyta blight of cheackpeas. *Plant Health Progress* 200-220. Doi: 10.1094/PHP-2011-0103-01-DG
- Hata, K. and Futai, K. 1995. Endophytic fungi associated with healthy pine needles and needles infested by the pine needle gall midge, *The codiplosis japonensis*. *Canadian Journal of Botany*, 73: 384-390.
- He, X., Han, G., Lin, Y., Tian, X., Xiang C., Tian Q., Wang F. and He Z. 2011. Diversity and decomposition potential of endophytes in leaves of a *Cinnamomum camphora* plantation in China. *Ecological Research*, 27(2): 273-284.
- Hu, M.Y., Zhong, G.H., Sun, Z.T., Shi, G., Liu, H.M. and Liu, X.Q. 2005. Insecticidal activities of secondary metabolites of endophytic *Penicillium* sp. in *Derris elliptica* Benth. *Journal of Applied Entomology*, 129: 413-417.
- Maddau, L., Cabras, A., Franceschini, A., Linaldeddu, B.T., Crobu, S., Roggio, T. and Pagnozzi, D. 2008. Occurrence and characterization of peptaibols from *Trichoderma citrinoviride* an endophytic fungus of cork oak, using electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Microbiology*, 155: 3371-3381.
- Maki, C.S. 2006. Diversidade e potencial biotecnológico de fungus endofiticus de cacao (*Theobroma cacao* L.). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz.
- Mirakbari, Z. 2011. Investigation and identification of endophytic fungi in rangeland grasses (Chahar Bagh region). Master thesis, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (In Persian).
- Moeller, E.M., Bahnweg, G., Sandermann, H. and Geiger, H.H. 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*, 22: 6115-6116.
- Oses, R., Valenzuela, S., Freer, J., Sanfuentes, E. and Rodriguez, J. 2008. Fungal endophytes in xylem of healthy Chilean trees and their possible role in early wood decay. *Fungal Diversity*, 33: 77-86.
- Parsaeyan, M. 2003. The effect of endophytes on cold
- منابع مورد استفاده**
- Arachevaleta, M., Bacon, C.W., Hoveland, C.S. and Radcliffe, D.E. 1989. Effect of the tall fescue endophyte on plant response to environmental stress. *Agron*, 81: 83-90.
- Arnold, A. E. 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: Progress, challenges and frontiers. *Fungal Biology Reviews*, 21: 51-66.
- Arnold, A.E., Carlos Mejía, L., Kyllö, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E.A. 2003. Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *PNAS*, 100(26): 15649-15654.
- Arzhangmehr, A. and Asheri, E. 2012. The importance of forests and pastures in sustainable development. Abstracts of Second National Conference on Biodiversity and its Impact on Agriculture and the Environment, Urmia, 11 July 2012 (In Persian).
- Baba-Ahmadi, G., Hayati, J. and Mehrabi Koushki, M. 2016. First report of *Curvularia buchloes* fungus associated with corn leaf spot in Iran. Proceedings of 22nd Iranian Plant Protection Congress, University of Tehran, Karaj, 27-30 August 2016, p: 206 (In Persian).
- Bacon, C.W. and White, J.F.Jr. 2000. Microbial endophytes. Marcel Dekker, New York, 487 p.
- Chapela, I.H. and Boddy, L. 1988. Fungal colonization of attached beech branches. *New Phytologist*, 110: 47-57.
- Da Cunha, K.C., Gene Diaz, J., Lira, F. and Artigas, J. 2014. Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Exserohilum* and *Pitomyces*. *Universitat Rovira I Virgili*, 33: 162-167.
- Dehghanpour Farashah, S., Sharifnabi, B. and Mirlohi, A.F. 2006. Application of 5.8 s gene and its, PCR-RFLP patterns in taxonomy of *Neotyphodium* endophytic fungi. *Rostaniha*, 7(1): 1-15 (In Persian).
- Domsch, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H. 1980. Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press (London) Ltd.
- Douanla-Meli, C., Langer, E. and Mouafo, F.T. 2013. Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of Citrus Limon. *Fungal Ecology*, 6(3): 212-222.
- Fisher, P., Petrini, O. and Sutton, B. 1993. A comparative study of fungal endophytes in leaves, xylem and bark of Eucalyptus in Australia and England. *Sydowia*, 45(2): 338-345.
- Ganjali, R., Sharif Nabi, B. and Mirlouhi, A. F. 2004. Classical methods and specific primers in detection of endophytic fungi in some gramineous plants. *Rostaniha*, 5(1): 37-51 (In Persian).
- Giordano, L., Gontheir, P., Varese G. C., Miserere L. and Nicoloti G. 2009. Mycobiota inhabiting sapwood of healthy and declining Scot's pine (*Pinus sylvestris*

- 698-707.
- Schulz, B. and Boyle, C. 2005. The endophytic continuum. *Mycological Research*, 109: 661-686.
- Slippers, B., Roux, J., Wingfield, M.J., van der Walt, F.J.J., Jami, F., Mehl, J.W.M. and Marais, G.J. 2014. Confronting the constraints of morphological taxonomy in the Botryosphaeriales. *Persoonia*, 33: 155-168.
- Suryanarayanan, T.S., Thirunavukkarasu, N., Hariharan, G.N. and Balaji P. 2005. Occurrence of non-obligate mi-crofungi inside lichen thalli. *Sydowia*, 57: 120-130.
- Suryanarayanan, T.S., Venkatachalam, A., Thirunavukkarasu, N., Rvishankar, J.P., Doble, M. and Geetha, V. 2010. Internal mycobiota of marine macroalgae from the Tamilnadu coast: distribution, diversity and biotechnological potential. *Botanica Marina*, 53: 457-468.
- Takemoto, S., Masuya, H. and Tabata, M. 2014. Endophytic fungal communities in the bark of canker-diseased *Toxicodendron vernicifluum*. *Fungal Ecology*, 7: 1-8.
- Tan, R.X. and Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 18: 448-459.
- Tejesvi, M.V., Ruotsalainen, A.L., Markkola, A.M. and Pirttila, A.M. 2010. Root endophytes along a primary succession gradient in northern Finland. *Fungal Diversity*, 41: 125-134.
- Tintjer, T. and Rudgers, J.A. 2006. Grass-Herbivore interactions altered by strains of a native endophyte. *New Phytologist*, 170: 513-521.
- Verkley, G.J.M., Silva, M., Wicklow, D.T. and Crous, P.W. 2004. *Paraconiothyrium* a new genus to accommodate the mycoparasite *Coniothyriumminitans*, anamorphs of *Paraphaeosphaeria*, and four new species. *Studies in Mycology*, 50: 323-335.
- Wang, Y. and Guo, L.D. 2007. A comparative study of endophytic fungi in needles, bark and xylem of *Pinus tabulaeformis*. *Botany*, 85: 911-917.
- Wang, Y.T., Lo, H.S. and Wang, P.H. 2008. Endophytic fungi from *Taxus mairei* in Taiwan: first report of *Colletotrichum gloeosporioides* as an endophyte of *Taxus mairei*. *Botanical Studies*, 49: 39-43.
- Weber, D. 2009. Endophytic fungi, Occurrence and Metabolites. In: K. Esser, T. Anke. And D. Weber (Eds). *The Mycota, Physiology and genetics selected basic and applied aspects*. Springer, Germany, pp: 153-196.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to Methods and Applications*, 18: 315-322.
- Yuan, Z.L., Zhang, C.L., Lin, F.C. and Kubicek, C.P. resistance in two species of *Festuca*. Master thesis, Department of Plant Protection, Isfahan University of Technology (In Persian).
- Pendle, S., Weeks, K., Priest, M., Gill, A., Hudson, B., Kotsiou, G. and Pritchard, R. 2004. Phaeohyphomycotic soft tissue infection caused by the coelomycetous fungus *Microphaeropsis arundinis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11): 5315-5319.
- Petrini, L.E. 1986. Haupt-und nebenfruchtformen europaischer Hypoxylon-Arten (*Xylariaceae*, *Sphaeriales*) und verwandterpilze. *Micology helv*, 1: 501-627.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. *Microbial Ecology of Leaves*, Springer, 179-197.
- Petrini, O. and Fisher, O.J. 1988. A comparative study of fungal endophytes in xylem and whole stem of *Pinus sylvestris* and *fagus sylvatica*. *Transactions of the British Mycological Society*, 91: 233-238.
- Phookamsak, R., Manamgoda, D.S, Li, W.J., Dai, D.Q., Singtripop, C. and Hyde, K.D. 2015. *Poaceascoma helicoides* gen et sp. nov., a new genus with scolecospores in Lentitheciaceae. *Cryptogamie, Mycologie*, 36(2): 225-236.
- Popay, A.J. and Rowan, D.D. 1994. Endophytic fungi as mediators of plant-insect intractions: in E.A. Bernays (ED.), *insect-plantintraction 5*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Puri, S.C., Varma, V., Amna, T., Qazi, G.N. and Spitter, M. 2005. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. *Journal of Natural Product*, 68: 1717-1719.
- Rakotoniriana, E.F., Decock, C., Munaut F., Randriamampionona D., Andriambololoniana M., Rakotomalala, T. and Mahillon, J. 2008. Endophytic fungi from leaves of *Centella asiatica*: occurrence and potential interactions within leaves. *Antonic van Leeuwenhoek*, 93: 27-36.
- Rivera-Orduna, F.N., Suarez-Sanchez, R.A., Flores-Bustamante, Z.R., Gracida-Rodriguez, J.N. and Flores-Cotera, L.B. 2011. Diversity of endophytic fungi to *Taxos globosa* (Mexican yew). *Fungal Diversity*, 47: 65-74.
- Rodriguez, R., White, J., Arnold, A. and Redman, R. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*, 182(2): 314-330.
- Sabzalian, M.R. 2002. Evaluation of resistance to induced salinity by endophytes in tall fescue and range fescue. Master thesis, Department of Plant Protection, Isfahan University of Technology (In Persian).
- Sarkar, A. and Dutta, S. 2016. Isolation and Identification of Some Dark Septate Endophytic Fungi (DSE) from the Roots of the Ethno-Medicinal Plant *Plumbago zeylanica* L. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 5(10):

2012. Pleosporales. *Fungal Diversity*, 53(1): 1-221.
- Zuccaro, A., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Kohlmeyer, J., Draeger, S. and Mitchell, J. 2008. Cation of detection and identify- fungi associated with the brown seaweed *focus serratus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 931-942.
2010. Identity, Diversity, and molecular phylogeny of the endophytic mycobiota in the roots of rare wild Rice (*Oryza granulata*) from a nature reserve in Yunnan, China. *Applied and Environmental Microbiology*, 1642-1652.
- Zhong, Y., Crous, P.W., Schoch, C.L. and Hyde, K.D.

Identification of root endophytic fungi from rangeland plants in Mazandaran province

K. Goodarzian¹, M. A. Tajick Ghanbary^{2*}, V. Babaeizad¹ and Sh. Mojerlou³

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agronomic sciences, Sari Agriculture and Natural Resources University, Sari, Iran

2*- Corresponding author, Department of Plant Protection, Faculty of Agronomic sciences, Sari Agriculture and Natural Resources University, Sari, Iran, E-mail: m.tajick@sanru.ac.ir

3- Department of Horticulture and Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahrood University of Technology, Shahrood, Iran

Received: 05.08.2020

Accepted: 23.12.2020

Abstract

In this study, to isolate and identify the root endophyte fungi, root samples of herbaceous plants were collected from the central regions of Mazandaran province during 2016-17. In the laboratory, each root sample was cultured on PDA medium after surface disinfection and then incubated for a month at 25°C in a complete dark condition. Fungal isolates were purified using the single spore and hyphal tip methods. Fungal species were identified based on morphological characteristics and ITS sequence data. In this study, 27 species belonging to 14 different genera including *Alternaria alternata*, *A. arborescens*, *A. burnsii*, *A. dumosa*, *A. solani*, *A. tenuissima*, *Botryosphaeria dothidea*, *B. auasmontanum*, *Curvularia australiensis*, *C. buchloes*, *C. spicifera*, *Cladosporium tenuissimum*, *Daldinia concentrica*, *Diaporthe bohemiae*, *Fusarium acuminatum*, *F. avenaceum*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*, *F. tricinctum*, *F. verticillioides*, *Microsphaeropsis arundinis*, *Nigrospora sphaerica*, *Paraconiothyrium cyclothyrioides*, *Periconia macrospinosa*, *Poaceascoma helicoides*, *Preussia minima* and *Xylaria heliscus* were identified. Among identified fungi, *Botryosphaeria auasmontanum*, *Curvularia australiensis*, *C. buchloes*, *C. spicifera*, *Diaporthe bohemiae*, *Microsphaeropsis arundinis*, *Nigrospora sphaerica*, *Paraconiothyrium cyclothyrioides*, *Periconia macrospinosa*, *Poaceascoma helicoides* and *Preussia minima* are new for mycoflora of Iran. Except *Alternaria arborescens*, other fungi are introduced from their hosts for the first time in Iran.

Key word: Endophytic Fungi, Herbaceous Plants, ITS, Mazandaran rangeland, New Records.