

معرفی گونه‌های جدید قارچی از ریزوسفر درختان بلوط برای فلور قارچی ایران*

دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۰ / پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۲۰

امین علی‌دادی: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
مژگان کوثری: استادیار بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
غلامرضا صالحی جوزانی: استاد بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران

سعدی کرمی: دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران
ابراهیم کریمی: مربی بخش بیوتکنولوژی میکروبی، پژوهشگاه بیوتکنولوژی کشاورزی ایران، سازمان تحقیقات، ترویج و آموزش کشاورزی، کرج، ایران
محمد جوان نیکخواه✉: استاد گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، کرج، ایران (jnikkhah@ut.ac.ir)

چکیده

تحقیق حاضر با هدف جداسازی و شناسایی گونه‌های قارچی موجود در ریزوسفر درختان بلوط در جنگل‌های زاگرس استان ایلام انجام شد. برای این منظور، نمونه‌برداری از خاک ریزوسفر درختان بلوط در مناطق مختلف جنگل‌های زاگرس در استان ایلام طی سال‌های ۹۴-۱۳۹۳ صورت پذیرفت. رقت‌های مختلفی از سوسپانسیون خاک تهیه و روی محیط‌کشت‌های عصاره مالت-آگار (MEA)، سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) و عصاره آب-آگار (WA 2%) پخش گردید. خالص‌سازی جدایه‌ها با استفاده از روش نوک ریشه روی محیط‌کشت غذایی PDA انجام شد. ابتدا جدایه‌ها با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی شناسایی شدند. سپس، به منظور تایید شناسایی ریخت‌شناختی و تعیین جایگاه تاکسونومیک جدایه‌ها، شناسایی مولکولی و آنالیزهای فیلوژنتیکی با استفاده از ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA صورت پذیرفت. در نهایت، براساس مطالعات ریخت‌شناختی و مولکولی، سه گونه شامل *Mortierella alpina*، *Penicillago nodositata* و *Trichocladium jilongensis* شناسایی شدند که در تحقیق حاضر به عنوان آرایه‌های جدید برای فلور قارچی ایران توصیف می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: تاکسونومی، ریخت‌شناسی، *Mortierella alpina*، *Penicillago nodositata*، *Trichocladium jilongensis*

New records of fungi from rhizosphere of oak trees for Iran fungal flora

Received: 09.02.2020 / Accepted: 08.04.2020

Amin Alidadi: MSc Graduate in Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Mojegan Kowsari: Assistant Prof. of Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Gholamreza Salehi Jouzani: Prof. of Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Saadi Karami: MSc Graduate in Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Ebrahim Karimi: Instructor of Microbial Biotechnology Department, Agricultural Biotechnology Research Institute of Iran (ABRII), Agricultural Research, Education & Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Mohammad Javan-nikkhah✉: Prof. of Mycology and Plant Pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj 31587-77871, Iran (jnikkhah@ut.ac.ir)

Summary

The objective of the present study was to isolate and characterize of fungal species from Persian oak trees rhizosphere in Zagros forests, Ilam province (Iran). For this purpose, sampling was performed from different regions of the above-mentioned forests during 2014–15. The serial dilutions of soil suspensions were cultured on Water agar (WA 2%), Potato dextrose agar (PDA), and Malt extract agar (MEA) media. Fungi were purified by transferring single hyphal tips on PDA medium. At the first, the fungal isolates were identified using their morphological features. To confirm the morphological identification and taxonomic position of the isolates, molecular studied and phylogenetic analyses were then carried out using amplification and sequencing of ITS region of ribosomal DNA. Finally, the species *Mortierella alpina*, *Penicillago nodositata*, and *Trichocladium jilongensis* were identified based on morphological characters and molecular studies. These species were described and reported as new records for the mycobiota of Iran.

Keywords: Morphology, *Mortierella alpina*, *Penicillago nodositata*, taxonomy, *Trichocladium jilongensis*

* مستخرج از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده نخست به راهنمایی دکتر محمد جوان نیکخواه و دکتر مژگان کوثری ارائه شده به پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

2003, Kwa na 2004, Balci *et al.* 2010, Linaldeddu *et al.* 2014, Akilli *et al.* 2013.

این مطالعه، به منظور جداسازی و شناسایی گونه‌های قارچی موجود در ریزوسفر درختان بلوط در جنگل‌های زاگرس صورت پذیرفت.

روش بررسی

- نمونه‌برداری و جداسازی جدایه‌های قارچی

نمونه‌برداری از ریزوسفر درختان بلوط ایرانی (*Quercus brantii*) سالم در جنگل‌های زاگرس در مناطق مختلف استان ایلام (صلح‌آباد، گله‌جار، دره‌دراز، تنگه دالاب و چقاسبز) انجام شد. از هر منطقه، تعداد ۱۰ درخت سالم به صورت تصادفی انتخاب و از هر درخت تعداد یک نمونه خاک جمع‌آوری شد. برای تهیه خاک ریزوسفر چهار نقطه در چهار جهت اصلی با فاصله ۱/۵-۱ متری از پایه هر درخت انتخاب شد و نمونه‌برداری از اطراف ریشه‌ها صورت پذیرفت. لایه رویی خاک (به شعاع پنج سانتی‌متر) برداشته و حذف شد. تعداد چهار نمونه خاک به میزان ۵۰۰ گرم از چهار نقطه تعیین شده تهیه و با یکدیگر مخلوط و همگن‌سازی شدند. میزان ۵۰۰ گرم از خاک مخلوط شده به عنوان نمونه خاک برداشته شد. پس از ثبت اطلاعات مربوط به مختصات جغرافیایی محل و تاریخ نمونه‌برداری، هر یک از نمونه‌ها در پاکت‌های جداگانه به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی جدایه‌های قارچی از نمونه‌های خاک، از طریق رقیق‌سازی سوسپانسیون خاک صورت گرفت (Rapilly 1968). ده گرم از خاک مورد نظر وزن و به ۹۰ میلی‌لیتر از آب مقطر سترون اضافه شد و سپس با هم زدن آن به مدت ۳۰ دقیقه، رقت 10^{-1} به دست آمد. سپس با عمل رقیق‌سازی، رقت‌های مختلفی از سوسپانسیون تهیه و روی محیط‌کشت‌های MEA، PDA و WA (۲٪) پخش شد. تشتک‌های پتری مورد نظر به انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس منتقل شدند. جداسازی خالص‌سازی جدایه‌های قارچی به روش انتقال نوک ریشه به محیط‌کشت PDA انجام شد.

- بررسی‌های ریخت‌شناسی

به منظور شناسایی جدایه‌های قارچی به دست آمده، ویژگی‌های ریخت‌شناختی ماکروسکوپی مختلف شامل نحوه رشد، سرعت رشد، رنگ و بافت پرگنه و نیز مشخصات میکروسکوپی از قبیل ویژگی‌های ساختارهای جنسی و غیرجنسی هر یک از جدایه‌های قارچی بسته به گونه، در محیط‌کشت‌های (CYA) Czapek yeast autolysate agar

خاک به عنوان یک منبع طبیعی با ارزش دربردارنده مجموعه متنوعی از میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌باشد و جمعیت‌های بومی میکروارگانیسم‌ها در خاک دارای اهمیت ویژه‌ای برای اکوسیستم هستند (Swier *et al.* 2011). قارچ‌ها بخش بزرگی از فلور میکروبی خاک را تشکیل می‌دهند که شامل ساپروفیت‌ها (پوده‌زیست‌ها)، میکوریزها و انگل‌هایی از همه گروه‌های اصلی (زیگومیکوتا در مفهوم کلی، آسکومیکوتا و بازیدیومیکوتا) قارچی می‌باشند (Hannula *et al.* 2010). قارچ‌های خاک‌زی نقش مهمی در تجزیه مواد گیاهی، بیوکنترل عوامل بیماری‌زا، فراهم کردن مواد مغذی برای گیاه، حذف سموم و سلامت گیاه دارند (Kozdroj & Van Elsas 2000, Kirk *et al.* 2004, Prescott *et al.* 2005, Raaijmakers *et al.* 2009). از طرف دیگر، بسیاری از آن‌ها عامل بیماری در گیاهان، انسان و حیوانات و همچنین تولید مایکوتوکسین‌های خطرناک می‌باشند (Mendes *et al.* 2013). ریزوسفر ناحیه‌ای از خاک است که تحت تاثیر ترشحات ریشه‌های گیاهی قرار می‌گیرد و یک جایگاه اکولوژیکی غنی است که میکروارگانیسم‌های خاک تمایل زیادی به این ناحیه دارند و از ترشحات ریشه‌ای به عنوان منبع کربن و انرژی استفاده می‌کنند. این ناحیه، زیستگاه مناسبی برای تکثیر انواع میکروارگانیسم‌ها از جمله قارچ‌ها و باکتری‌ها می‌باشد (Hannula *et al.* 2010). فلور میکروبی ریزوسفر بسته به میزان متفاوت است و وابسته به گیاه میزبان و ترکیبات آلی آزاد شده توسط ریشه گیاه در منطقه ریزوسفر می‌باشد (Ehrmann & Ritz 2014). فلور قارچی ریزوسفر بسیار متنوع است و دربردارنده گونه‌های قارچی مفید برای میزبان و کنترل‌کننده گونه‌های قارچی بیماری‌زای خاک‌زاد می‌باشد (Hannula *et al.* 2010).

گونه‌های بلوط از مهم‌ترین اجزای فلور گیاهی جنگل‌های زاگرس محسوب می‌شوند (Jazirehi & Ebrahimi Rostaghi 2013). تاکنون، مطالعات زیادی در مناطق مختلف دنیا روی فلور قارچی منطقه ریزوسفر درختان بلوط انجام شده است. قارچ‌های متنوعی از جمله *Fusarium spp.*, *Absidia cylindrospora*, *Pythium spp.*, *Phytophthora spp.*, *Mortierella spp.*, *F. solani*, *Fusarium oxysporum*, *P. daleae*, *P. citrinum*, *Penicillium adametzii*, *Umbelopsis vinacea* و *Trichoderma spp.*, *P. janczewskii* از ریزوسفر درختان بلوط در مناطق مختلف دنیا جداسازی و گزارش شده‌اند (Kwa na 2001, Balci & Halmschlager

حاصل به وسیله شاخص اعتبارسنجی bootstrap و با ۱۰۰۰ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت (Felsentien 1985). کلیه توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده در این مطالعه در مجموعه داده‌های بانک ژن NCBI ذخیره و شماره‌های دسترسی برای آن‌ها فراهم شد (شماره دسترسی برای هر جدایه در بخش نمونه‌های بررسی شده ذکر شده است).

نتیجه و بحث

در این مطالعه، تعداد ۴۵ جدایه قارچی جداسازی و خالص‌سازی شد. در نهایت، با استفاده از مطالعات ریخت‌شناختی و مولکولی، تعداد سه گونه شامل *Mortierella alpina*، *Trichocladium jilongensis* و *Penicillago nodositata* شناسایی شدند که آرایه‌های جدیدی برای فلور قارچی ایران می‌باشند. توصیف گونه‌های شناسایی شده به شرح زیر است:

۱- *Mortierella alpina* Peyronel, I germi atmosferici dei funghi con micelio, Diss. (Padova): 17 (1913)

پرگنه روی محیط‌کشت‌های PDA و MEA بی‌رنگ، سریع رشد، به صورت گل کلمی و قطر رشد آن پس از هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به ترتیب ۵۰-۴۰ و ۶۰-۵۵ میلی‌متر بود. میسلیوم‌ها دارای دیواره عرضی و بسیار منشعب و به قطر ۸-۴ میکرومتر می‌باشد. اسپورانژیوفورها بی‌رنگ، راست، اغلب ساده، به سمت انتها باریک شونده، به طول (۷۰) ۱۰۰-۵۰ میکرومتر و در انتها دارای یک اسپورانژیوم کروی با ابعاد (۱۴/۵) ۱۷-۱۳ میکرومتر می‌باشند. اسپورانژیوسپورها اغلب بیضی و یا ندرتا به شکل نامنظم و به ابعاد ۸-۲ میکرومتر بودند. کلامیدوسپورها با دیواره صاف و به صورت میانی و انتهایی و به ابعاد (۱۴) ۲۰-۱۲ میکرومتر تشکیل شدند (شکل ۱).

نمونه‌های بررسی شده: تعداد ۳۵ جدایه، توصیف براساس جدایه‌های 19R3 (ABRIICC 10026)، 20B1 (ABRIICC 10022)، 20B4 (ABRIICC 10020)، 22B1 (ABRIICC 10024) و 25B1 (ABRIICC 10027)، استان ایلام، منطقه تنگه دالاب، خاک ریزوسفر درختان بلوط، مهر ماه ۱۳۹۴.

این گونه، پراکنش وسیعی داشته و اغلب به عنوان یک گونه ساپروفیت با قابلیت تجزیه کیتین در خاک گزارش شده است (Gray & Baxby 1968, Gan et al. 2017)؛ هر چند گزارش‌هایی از این گونه به عنوان قارچ اندوفیت روی ریشه و اندام هوایی میزبان‌های مختلف به ثبت رسیده است (Melo et al. 2014, Comby et al. 2016). اخیراً، خاصیت

PDA، MEA، Malt agar (MA) و Oatmeal agar (OA) مورد ارزیابی قرار گرفت. برای مشاهده ساختارهای میکروسکوپی جدایه‌های قارچی، نمونه‌های میکروسکوپی تهیه شده با استفاده از محلول لاکتوفنل و لاکتوفنل کاتن بلو، توسط میکروسکوپ نیکون (Nikon) مدل E600 مورد بررسی قرار گرفتند. شناسایی گونه‌های قارچی با استفاده از کلیدها و مقالات معتبر صورت گرفت (Ellis 1976, Valla et al. 1989, Watanabe 2002, Seifert & Gams 2011, Wang et al. 2019). جدایه‌های گونه‌های شناسایی شده در کلکسیون میکروبی پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی ایران (ABRIICC) نگهداری می‌شوند.

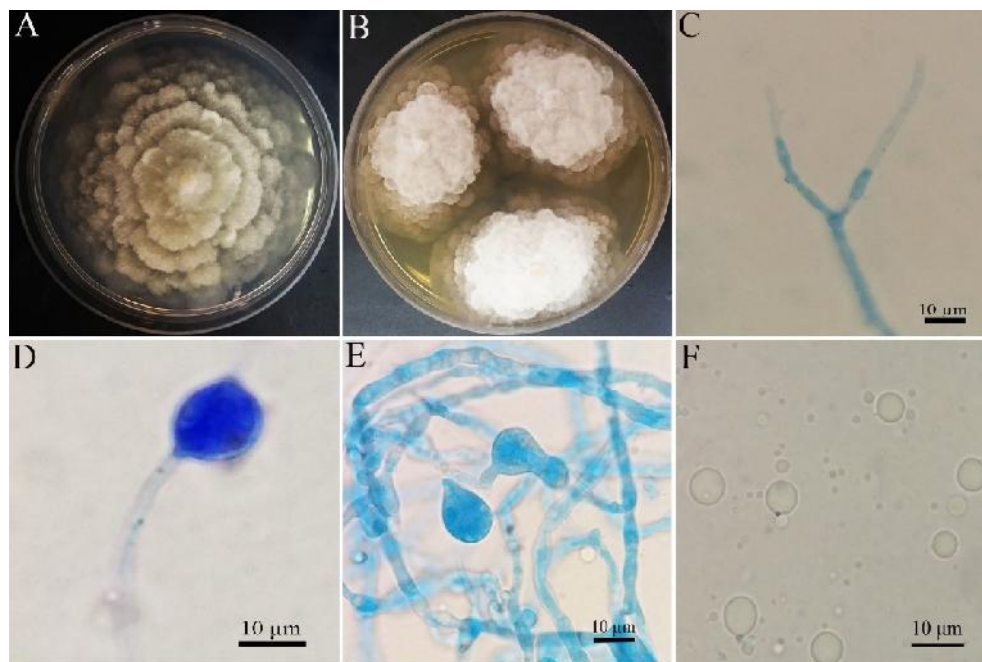
- استخراج DNA ژنومی و واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) استخراج DNA ژنومی به روش ژانگ و استیفنسون (Zhong & Steffenson 2001) صورت گرفت. تکثیر نواحی ITS از DNA ریبوزومی، توسط جفت آغازگرهای ITS4/ITS1 (White et al. 1990) انجام گرفت. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز برای آغازگرهای ITS4/ITS1 با حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۸/۳ آب دیونیزه سترون، ۲/۵ میکرولیتر 10X PCR Buffer، ۵ میلی‌مولار MgCl2، ۲۰۰ میلی‌مولار از هر نوکلئوتید، ۱۰ پیکومول از هر آغازگر، یک واحد Taq DNA پلیمرز و ۳ میکرولیتر DNA الگو با غلظت ۱۰-۵۰ نانوگرم تهیه شد. برنامه مشابه مطالعات قبلی (Alidadi et al. 2019) برای تعیین توالی محصولات تکثیر شده توسط شرکت ماکروژن، کره جنوبی (Macrogen Inc., Korea) انجام گرفت.

- ارزیابی‌های فیلوژنتیکی

ویرایش توالی‌های نوکلئوتیدی به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار BioEdit Ver. 7.2.5 انجام شد. جستجوی بلاست برای تمامی ترادف‌های به دست آمده در بانک ژن NCBI جهت حصول اطمینان از صحت توالی‌های مورد بررسی انجام گرفت. عمل هم‌ردیف‌سازی چندگانه توالی‌های نوکلئوتیدی جدایه‌های مورد مطالعه به همراه توالی‌های نوکلئوتیدی اخذ شده از بانک ژن NCBI در نرم‌افزار Clustal X Ver. 2.1 (Thompson et al. 1997) انجام گرفت. تبارنمای فیلوژنتیکی Maximum Parsimony (MP) با استفاده از روش جستجوی تبارنمای ابتکاری (Heuristic search)، شاخص random addition sequence با ۱۰۰۰ تکرار و الگوریتم TBR به وسیله نرم‌افزار MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013) رسم شد. در این تجزیه و تحلیل تمامی مکان‌های خالی (gap) به صورت اطلاعات از دست رفته (missing data) در نظر گرفته شدند. پایداری تبارنمای

گونه *M. alpina* (Gams 1977, Watanabe 2002, Yadav *et al.*) و نیز داده‌های توالی ناحیه ITS-rDNA (شکل ۵)، گونه *M. alpina* شناسایی شد. گزارش این گونه برای فلور قارچی ایران جدید می‌باشد.

ضدمیکروبی علیه باکتری‌های بیمارگر انسانی مانند *E. coli* و همچنین، خاصیت بیمارگری روی حشرات و عوامل بیماری‌زای گیاهی از این گونه گزارش شده است (Al-Shammari *et al.* 2013, Edgington *et al.* 2014, Gan *et al.* 2017). این جدایه‌ها براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و مقایسه آن‌ها با توصیف



شکل ۱- *Mortierella alpina* جدایه 19R3: A. پرگنه روی محیط‌کشت PDA پس از ۱۰ روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس، B. پرگنه روی محیط‌کشت MEA پس از سه روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس، C. اسپورانژیوفور، D. اسپورانژیوم، E. کلامیدوسپورها، F. اسپورانژیوسپورها.

Fig. 1. *Mortierella alpina* isolate 19R3: A. 10-d-old colony on PDA under darkness at 25 °C, B. 3-d-old colony on MEA under darkness at 25 °C, D. Sporangium, E. Chlamydospores, F. Sporangiospores.

۴۵ و ۳۵ میلی‌متر بود. در این گونه کنیدیوفورها بسیار بلند و اغلب منشعب بوده و به ابعاد ۴-۵ × (۱۵۰) × ۲۵۰-۱۰۰ میکرومتر می‌باشند. روی کنیدیوفورها متولا تشکیل شد که اغلب به تعداد (۱۰-۲-۵) عدد به صورت فراهم و چسبیده به هم و به ابعاد (۵-۸) × (۱۱-۱۳) میکرومتر بودند (Biverticillate). فیالیدها آمپولی شکل بوده و به تعداد ۱۰-۳ عدد روی هر متولا تشکیل شدند. ابعاد فیالیدها (۲/۵-۳) × (۱۰-۱۲) میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها اغلب بیضوی تا کمی کشیده بوده و زواید کوچک خاردار داشتند. کنیدیوم‌ها به صورت زنجیرهای کوتاه (دو، سه و به ندرت چهار هاگ) روی هر کنیدیوفور و به ابعاد ۲-۴/۵ × ۳-۵ میکرومتر تشکیل شدند (شکل ۲).

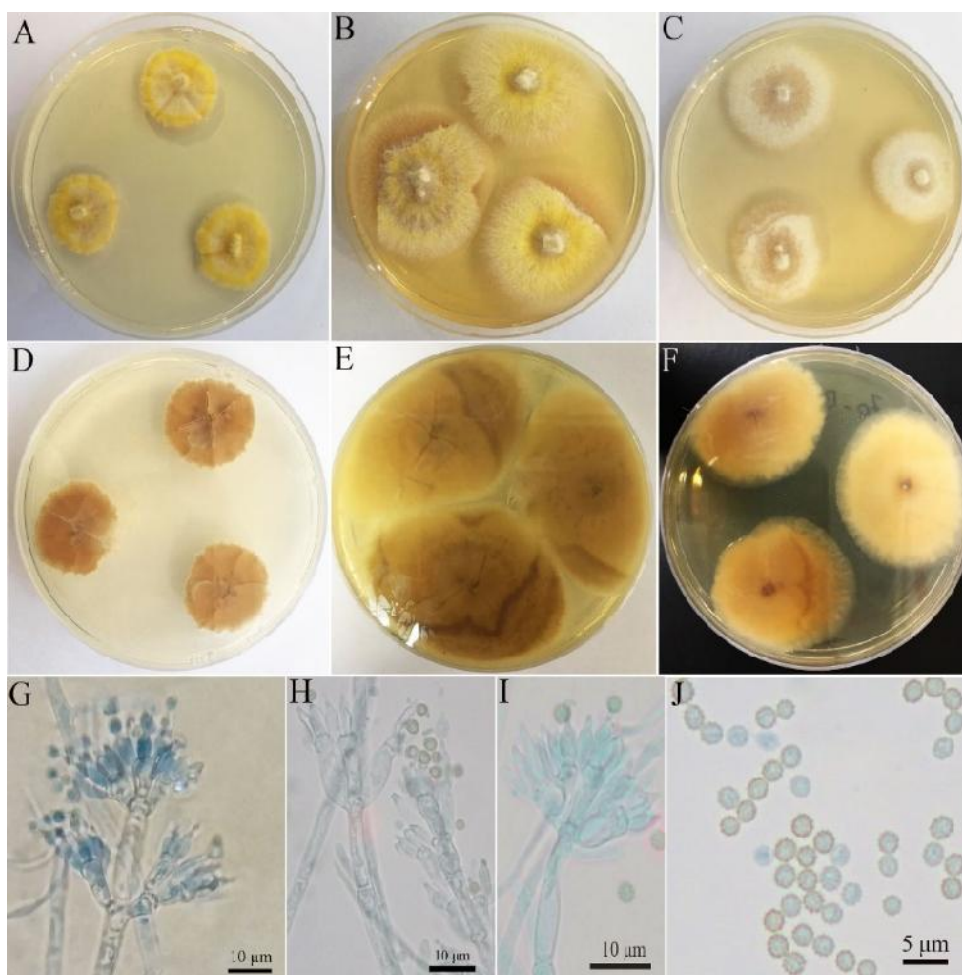
۲- *Penicillago nodositata* (Valla) Guevara-Suarez, Gené & Dania García

سطح روبی پرگنه روی محیط‌کشت CYA به رنگ زرد روشن و سطح پشتی پرگنه به رنگ قهوه‌ای روشن بود. مشخصات پرگنه روی محیط‌کشت PDA شبیه به مشخصات آن روی محیط‌کشت CYA بود. پرگنه روی محیط‌کشت MEA به رنگ زرد کدر و مایل به قهوه‌ای و سطح پشتی آن به صورت قهوه‌ای کم‌رنگ تشکیل شد. پرگنه روی محیط‌کشت MA در مرکز به صورت قهوه‌ای روشن، در حاشیه به رنگ سفید و سطح پشتی به رنگ سفید مایل به قهوه‌ای بود. در هیچ یک از محیط‌کشت‌ها رنگدانه تولید نشد. قطر رشد پرگنه پس از هفت روز رشد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی در محیط‌کشت‌های CYA، PDA، MEA و MA به ترتیب ۲۰، ۲۵،

در مطالعات بعدی، گوئوارا-سوارز و همکاران (۲۰۱۹)، براساس مطالعات فیلوژنتیکی، این گونه را به جنس *Penicillago* و تحت *Penicillago nodositata* نامگذاری کردند. در این مطالعه، جدایه 70B6 با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی براساس توصیف والا و همکاران (۱۹۸۹)، همچنین گوئوارا-سوارز و همکاران (۲۰۱۹) و داده‌های توالی ناحیه ITS-rDNA (شکل 4)، به عنوان گونه *P. nodositata* شناسایی شد که آرایه جدیدی برای فلور قارچی ایران می‌باشد.

نمونه‌های بررسی شده: تعداد چهار جدایه، توصیف براساس جدایه 70B6 (ABRIICC 10048)، استان ایلام، منطقه ارغوان، خاک ریزوسفر درختان بلوط، شماره دستیابی ناحیه ITS-rDNA در بانک ژن (KY950243)، مهر ماه ۱۳۹۴.

این گونه، نخستین بار توسط والا و همکاران (Valla *et al.* 1989) براساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی شامل مسیلیوم‌های زرد رنگ، فیالیدهای آمپولی شکل و کنیدیوم‌های بیضوی حاوی زواید خاردار از ریشه درخت توسکا (*Alnus spp.*) جداسازی و به عنوان *Penicillium nodositatum* شناسایی شد.



شکل ۲- *Penicillago nodositata* جدایه 70B6: A و D. به ترتیب سطح رو و پشت پرگنه در محیط کشت CYA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس، B و E. به ترتیب سطح رو و پشت پرگنه روی محیط کشت MEA پس از هفت روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس، C و F. به ترتیب سطح رو و پشت پرگنه روی محیط کشت MA پس از هفت روز شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس، G-I. کنیدیوفور، متولا و فیالید، J. کنیدیوم‌ها.

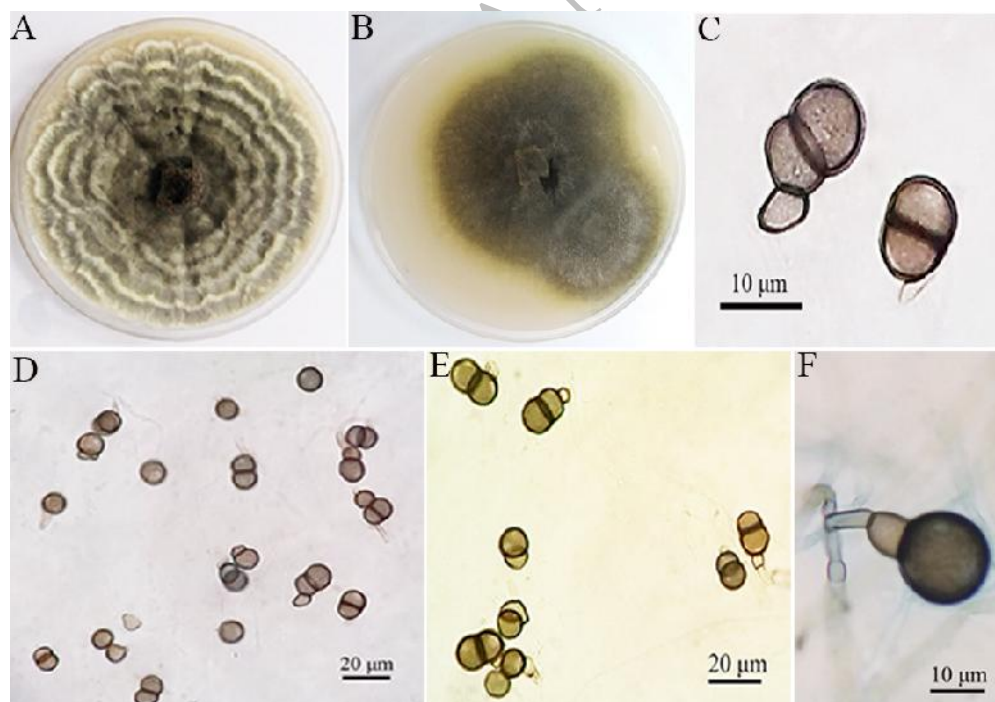
Fig. 2. *Penicillago nodositata* isolate 70B6: A & D. Upper side and Backside of 7-d-old colony on CYA, respectively under darkness at 25 °C, B & E. Upper side and Backside of 7-d-old colony on MEA, respectively under darkness at 25 °C, C & F. Upper side and Backside of 7-d-old colony on MA, respectively under darkness at 25 °C, G & I. Conidiophore, metulae and Phialide, J. Conidia.

نمونه بررسی شده: تعداد شش جدایه، توصیف براساس جدایه 24R1 (ABRIICC 10045)، استان ایلام، منطقه تنگه دالاب، خاک ریزوسفر درختان بلوط، شهریور ماه ۱۳۹۳.

این گونه، نخستین بار توسط Wu & Zhang (2013) در کشور چین از خاک جداسازی و تحت عنوان *Humicola jilongense* نامگذاری شد. وانگ و همکاران (۲۰۱۹) با استفاده از اطلاعات ریخت‌شناختی و آنالیزهای فیلوژنتیکی براساس نواحی مختلف ژنومی این گونه را در جنس *Trichocladium* و تحت نام *T. jilongense* نامگذاری کردند. این گونه، از لحاظ ریخت‌شناسی، به گونه *T. griseum* شباهت دارد. گونه *T. jilongense* با داشتن کنیدیوم‌های ۲-۳ سلولی از گونه *T. griseum* (دارای کنیدیوم تک‌سلولی و گاهی به صورت زنجیره کوتاه کنیدیومی) قابل تفکیک می‌باشد (Wang et al. 2019). در این مطالعه، گونه *T. jilongense* با استفاده از ویژگی‌های ریخت‌شناختی براساس توصیف وانگ و همکاران (۲۰۱۹) و همچنین مشخصات مولکولی براساس ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA شناسایی شد (شکل ۴). گزارش این گونه برای فلور قارچی ایران جدید می‌باشد.

Trichocladium jilongense (Y.M. Wu & T.Y. Zhang) – X. Wei Wang & Houbraken, in Wang, Yang, Meijer, Kraak, Sun, Jiang, Wu, Bai, Seifert, Crous, Samson & Houbraken, Stud. Mycol. 93: 141 (2018)

پرگنه قارچ روی محیط‌کشت OA به رنگ خاکستری روشن و به صورت حلقه‌های متحدالمرکز رشد کرد. قطر رشد پرگنه پس از ۱۰ روز روی محیط‌کشت OA و در شرایط ۲۵ درجه سلسیوس، ۶۰ میلی‌متر بود. کنیدیوفورها به رنگ قهوه‌ای، غیرمنشعب، به صورت بیضوی، سیلندری و یا بشکه‌ای شکل، گاهی محدود به سلول کنیدی‌زا، به طول (۲۰-۸) میکرومتر، به صورت جانبی و یا در انتهای ریشه تشکیل شدند. سلول کنیدیوم‌زا بی‌رنگ تا قهوه‌ای کم‌رنگ بود که به صورت انتهایی روی کنیدیوفور و یا به صورت بینابینی روی ریشه (بدون کنیدیوفور) و به ابعاد ۳-۶ میکرومتر هستند. کنیدیوم‌ها به صورت منفرد، کروی، تخم‌مرغی یا بیضوی، به رنگ قهوه‌ای تیره، دارای ۱-۰ و به ندرت دو دیواره عرضی کاملاً مشخص و به ابعاد (۱۰/۵)۹-۱۴ × (۱۷)۲۴-۱۱ میکرومتر بودند (شکل ۳).



شکل ۳- *Trichocladium jilongense* جدایه 24R1: A. پرگنه روی محیط‌کشت OA پس از ۱۴ روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس، B. پرگنه روی محیط PCA پس از ۱۰ روز در شرایط تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس C-E. کنیدیوم‌ها، F. کنیدیوفور و سلول کنیدی‌زا.

Fig. 3. *Trichocladium jilongense* isolate 24R1: A. 14-d-old colony on OA under darkness at 25 °C, B. 10-d-old colony on PCA under darkness at 25 °C, C-E. Conidia, F. Conidiophore and conidiogenous cell.

- ارزیابی فیلوژنتیکی
تعداد هشت جدایه از مجموع جدایه‌ها برای مطالعات فیلوژنتیکی با استفاده از توالی ناحیه ITS-rDNA انتخاب شد (جدول ۱). آنالیزهای فیلوژنتیکی برای جدایه‌های متعلق به شاخه *Ascomycota* و *Mortierellomycota* به صورت جداگانه انجام گردید. تکثیر ناحیه ITS با استفاده از جفت آغازگرهای ITS1 و ITS4، قطعاتی به طول ۶۳۰-۵۰۰ جفت نوکلئوتید را تولید کرد. انجام هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS مربوط به دو جدایه مورد مطالعه از شاخه آسکومیکوتا به همراه ترادف‌های نوکلئوتیدی ۲۵ جدایه به دست آمده از بانک ژن NCBI (جدول ۱) منجر به ایجاد ۵۱۸ (نوکلئوتید+گپ‌ها) کاراکتر شد. از مجموع کل کاراکترهای مورد ارزیابی، تعداد ۲۹۱ کاراکتر ثابت، ۲۲۷ کاراکتر متغیر و ۲۲۴ کاراکتر دارای اطلاعات پارسیمونی بودند. در تبارنمای فیلوژنتیکی حاصل از روش Maximum Parsimony، گونه‌های شناسایی شده در این مطالعه، با حمایت زیادی (۷۹٪) در کلاذ مربوط به گونه *M. alpina* قرار گرفتند و شجره ترسیم شده تاییدی بر شناسایی ریخت‌شناختی گونه می‌باشد (شکل ۵).

T. jilongense CBS 195.87 قرار گرفته و به خوبی از گونه *T. griseum* تفکیک شد (شکل ۴). جدایه 70B6 با درجه اعتبارسنجی ۱۰۰ در کنار سویه‌های گونه *P. nodositata* قرار گرفته است و شناسایی ریخت‌شناختی را به درستی تایید می‌کند. هم‌ردیف‌سازی چندگانه ترادف‌های نوکلئوتیدی ناحیه ITS-rDNA مربوط به پنج جدایه مورد مطالعه از شاخه *Mortierellomycota* به همراه ترادف‌های نوکلئوتیدی ۱۵ جدایه از بانک ژن NCBI (جدول ۱) منجر به ایجاد ۷۳۶ (نوکلئوتید+گپ‌ها) کاراکتر گردید. تعداد کاراکترهای ثابت ۳۳۸ و تعداد کاراکترهای متغیر و دارای اطلاعات پارسیمونی به ترتیب ۳۴۲ و ۲۱۳ بود. در تبارنمای فیلوژنتیکی حاصل از روش Maximum Parsimony، گونه‌های شناسایی شده در این مطالعه، با حمایت زیادی (۷۹٪) در کلاذ مربوط به گونه *M. alpina* قرار گرفتند و شجره ترسیم شده تاییدی بر شناسایی ریخت‌شناختی گونه می‌باشد (شکل ۵).

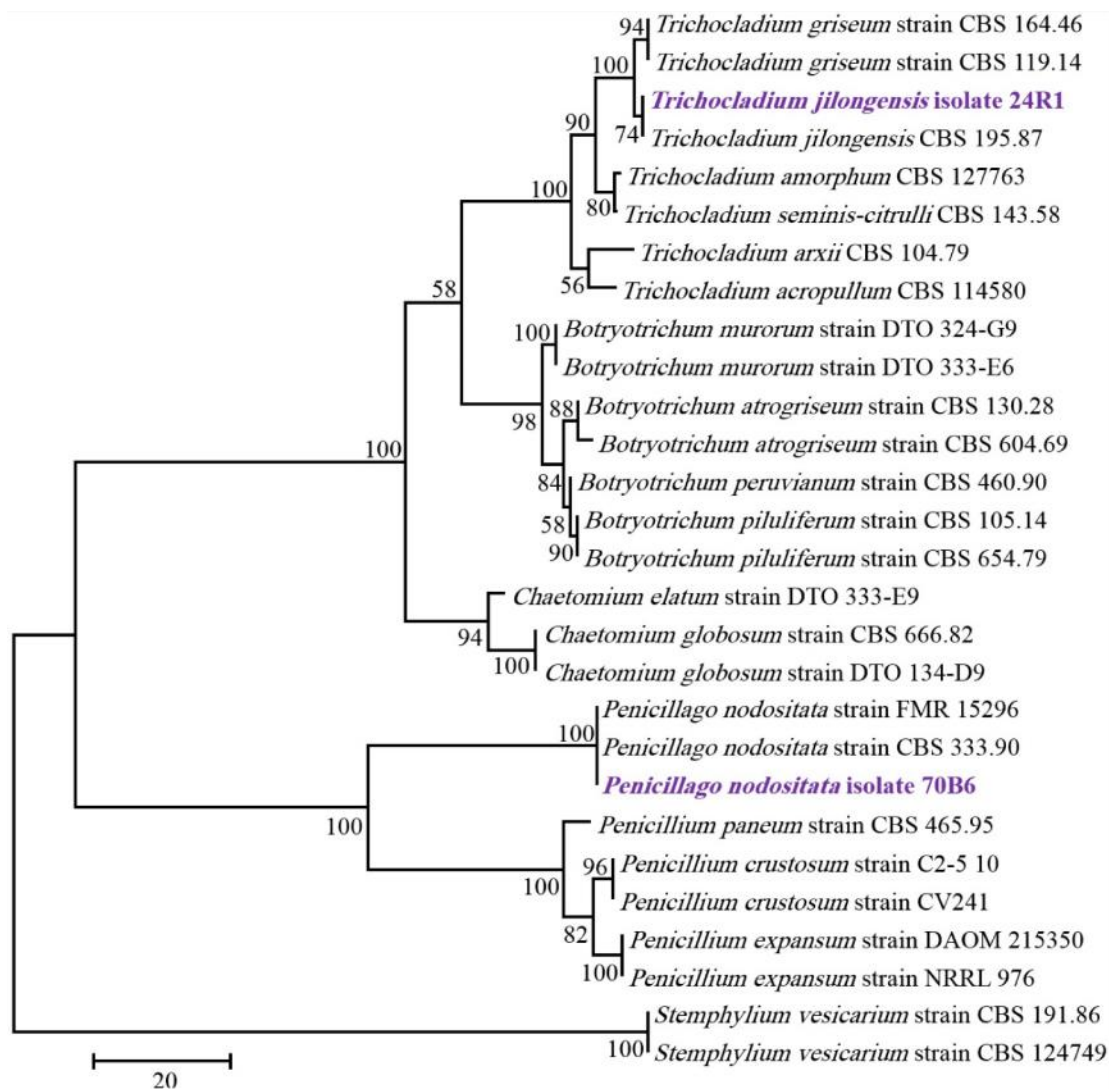
جدول ۱- گونه‌های قارچی استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی (گونه‌های مورد مطالعه در این تحقیق به صورت پررنگ مشخص شده‌اند).

Table 1. Fungal species used in the phylogenetic analyses (species identified in the present study are in bold.)

Taxon	Strain	GenBank accessions	Reference
<i>Botryotricum peruvianum</i>	CBS 460.90	KX976623	Wang <i>et al.</i> 2016
<i>Botryotricum atrogiseum</i>	CBS 130.28	KX976589	Wang <i>et al.</i> 2016
<i>Botryotricum piluliferum</i>	DTO 194-F7	KX976599	Wang <i>et al.</i> 2016
<i>Mortierella alpina</i>	22B1	KY825121	This study
<i>Mortierella alpina</i>	25B1	KY825124	This study
<i>Mortierella alpina</i>	20B4	KY825117	This study
<i>Mortierella alpina</i>	19R3	KY825123	This study
<i>Mortierella alpina</i>	20B1	KY825119	This study
<i>Mortierella alpina</i>	CBS 527.72	MH860553	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella alpina</i>	CBS 384.71C	MH860175	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella amoeboidea</i>	CBS 889.72	JX976073	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella indohii</i>	CBS 220.72	MH860454	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella indohii</i>	CBS 528.75	JX976044	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella wolfii</i>	CBS 209.69	JN943805	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella ambigua</i>	CBS 450.88	JX976067	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella ambigua</i>	CBS 521.80	JX976120	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella beljakovae</i>	CBS 123.72	MH860410	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella lignicola</i>	CBS 207.37	JX976095	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella zychae</i>	CBS 16.52	JX975979	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella zychae</i>	CBS 102879	JX976074	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Mortierella parvispora</i>	CBS 311.52	JX976076	Yadav <i>et al.</i> 2014
<i>Penicillium paneum</i>	CBS 465.95	HQ442349	Houbraken <i>et al.</i> 2010
<i>Penicillium crustosum</i>	CBS 115503	MH862985	Visagie <i>et al.</i> 2014
<i>Penicillium crustosum</i>	CBS 499.73	MH860760	Vu <i>et al.</i> 2019
<i>Penicillium expansum</i>	DAOM 215350	JN942855	Schoch <i>et al.</i> 2012
<i>Penicillium expansum</i>	NRRL 976	FJ463031	Cabañas <i>et al.</i> 2009
<i>Penicillago nodositata</i>	CBS 333.90	KC790403	Visagie <i>et al.</i> 2013
<i>Penicillago nodositata</i>	70B6	KY950243	This study
<i>Penicillago nodositata</i>	FMR 15296	LT899787	Guevara-Suarez <i>et al.</i> 2019
<i>Trichocladium seminis-citrulli</i>	CBS 143.58	MH857728	Wang <i>et al.</i> 2019

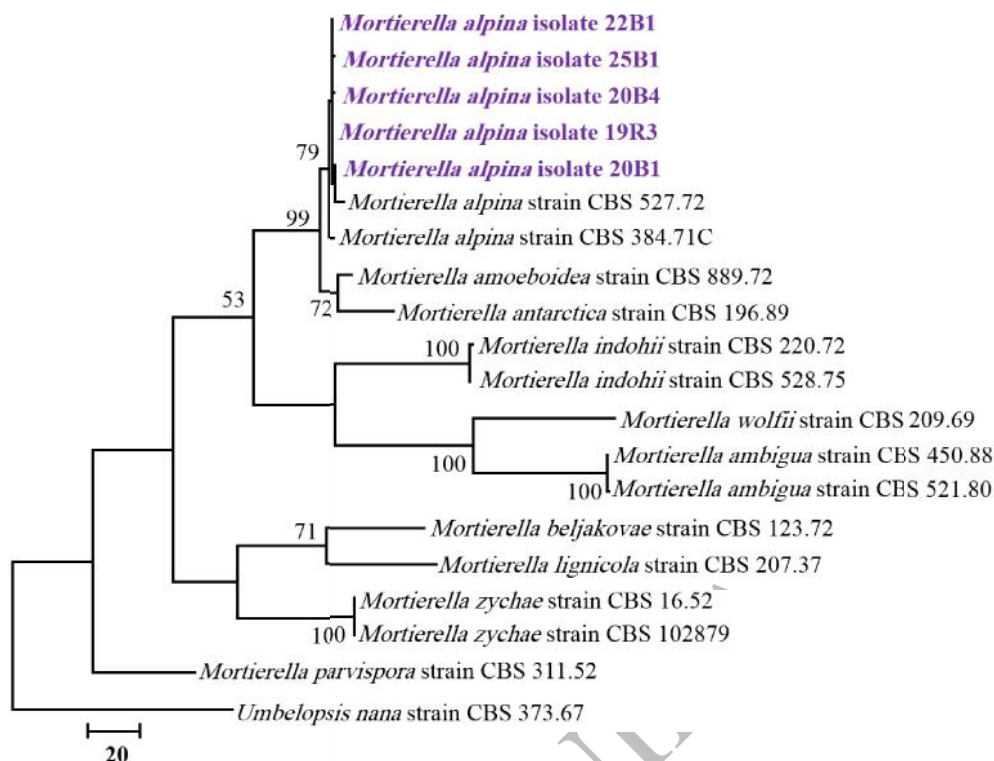
جدول ۱ (ادامه)

<i>Trichocladium acropullum</i>	CBS 114580	JX280763	Wang <i>et al.</i> 2019
<i>Trichocladium amorphum</i>	CBS 127763	LT993628	Wang <i>et al.</i> 2019
<i>Trichocladium arxii</i>	CBS 104.79	MH861178	Wang <i>et al.</i> 2019
<i>Trichocladium griseum</i>	CBS 119.14	KM655328	Wang <i>et al.</i> 2019
<i>Trichocladium griseum</i>	CBS 164.46	MH856152	Vu <i>et al.</i> 2019
<i>Trichocladium jilongensis</i>	CBS 195.87	LT993643	Wang <i>et al.</i> 2019
<i>Trichocladium jilongensis</i>	24R1	KY950240	This study



شکل ۴- تبارنمای فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه ITS-rDNA برای ۲۸ آرایه متعلق به شاخه *Ascomycota* با روش Maximum Parsimony با استفاده از نرم‌افزار Mega 6.0. اعداد بالای هر شاخه مقدار Bootstrap از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. گونه *Stemphylium vesicarium* به عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

Fig. 4. The parsimonious tree inferred from the ITS-rDNA sequences of 28 taxa belong to *Ascomycota* using Mega 6.0 software. The numbers in front of the nodes show the bootstrap values from 1000 replicates. The ITS sequence of *Stemphylium vesicarium* was used as out group.



شکل ۵- تبارنمای فیلوژنتیکی استنباط شده از ناحیه ITS-rDNA برای ۱۹ آرایه متعلق به شاخه *Mortierellomycota* با روش Maximum Parsimony با استفاده از نرم‌افزار Mega 6.0. اعداد بالای هر شاخه مقدار Bootstrap از ۱۰۰۰ تکرار را نشان می‌دهد. گونه *Umbelopsis nana* به عنوان گروه خارجی انتخاب شده است.

Fig. 5. The parsimonious tree inferred from the ITS-rDNA sequences of 19 taxa belong to *Mortierellomycota* using Mega 6.0 software. The numbers in front of the nodes show the bootstrap values from 1000 replicates. The ITS sequence of *Umbelopsis nana* was used as out group.

References

- Akilli, S., Uluba Serçe, Ç., Katircio lu, Y.Z. & Maden, S. 2013. Does *Pythium anandrum* contribute to the dieback of sessile oak (*Quercus petraea*) in Turkey?. *Forest Pathology* 43: 505–508.
- Al-Hatmi, A.M., Hagen, F., Menken, S.B., Meis, J.F. & De Hoog, G.S. 2016. Global molecular epidemiology and genetic diversity of *Fusarium*, a significant emerging group of human opportunists from 1958 to 2015. *Emerging Microbes & Infections* 5: 1–11.
- Alidadi, A., Javan-Nikkhah, M., Kowsari, M., Karami, S. & Ebrahimi Rastaghi, M. 2018. Some species of fungi associated with declined Persian oak trees in Ilam province with emphasis on new records to mycobiota of Iran. *Rostaniha* 19(2): 75–91.
- Al-Shammari, T.A., Bahkali, A.H., Elgorban, A.M., El-Kahky, M.T. & Al-Sum, B.A. 2013. The use of *Trichoderma longibrachiatum* and *Mortierella alpina* against root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on tomato. *Journal of Pure and Applied Algebra Microbiology* 7: 199–207.
- Balci, Y. & Halmschlager, E. 2003. *Phytophthora* species in oak ecosystems in Turkey and their association with declining oak trees. *Plant Pathology* 52: 694–702.
- Balci, Y., Long, R.P., Mansfield, M., Balser, D. & MacDonald, W.L. 2010. Involvement of *Phytophthora* species in white oak (*Quercus alba*)

- decline in southern Ohio. *Forest Pathology* 40: 430–442.
- Cabañas, R., Castellá, G., Abarca, M.L., Bragulat, M.R. & Cabañas, F.J. 2009. Thiabendazole resistance and mutations in the α -tubulin gene of *Penicillium expansum* strains isolated from apples and pears with blue mold decay. *FEMS Microbiology Letters* 297: 189–195.
- Comby, M., Lacoste, S., Baillieul, F., Profizi, C. & Dupont, J. 2016. Spatial and temporal variation of cultivable communities of co-occurring endophytes and pathogens in wheat. *Frontiers in Microbiology* 7: 403.
- Edgington, S., Thompson, E., Moore, D., Hughes, K.A. & Bridge, P. 2014. Investigating the insecticidal potential of *Geomyces* (Myxotrichaceae: Helotiales) and *Mortierella* (Mortierellaceae: Mortierellales) isolated from Antarctica. *Springer Plus* 3: 289.
- Ehrmann, J. & Ritz, K. 2014. Plant: soil interactions in temperate multi-cropping production systems. *Plant and Soil* 376: 1–29.
- Ellis, M.B. 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Kew, London: Commonwealth Mycological Institute 507 pp.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Gan, H., Churchill, A.C. & Wickings, K. 2017. Invisible but consequential: root endophytic fungi have variable effects on belowground plant-insect interactions. *Ecosphere* 8: e01710.
- Gray, T.R.G. & Baxby, P. 1968. Chitin decomposition in soil: II. The ecology of chitinoclastic microorganisms in forest soil. *Transactions of the British Mycological Society* 51: 293–309.
- Guevara-Suarez, M., García, D., Cano-Lira, J.F., Guarro, J. & Gené, J. 2019. Species diversity in *Penicillium* and *Talaromyces* from herbivore dung, and the proposal of two new genera of penicillium-like fungi in Aspergillaceae. *Fungal Systematics and Evolution* 5: 39–75.
- Hannula, S.E., De Boer, W. & Van Veen, J.A. 2010. In situ dynamics of soil fungal communities under different genotypes of potato, including a genetically modified cultivar. *Soil Biology and Biochemistry* 42: 2211–2223.
- Houbraken, J., Frisvad, J.C. & Samson, R.A. 2010. Sex in *Penicillium* series roqueforti. *IMA fungus* 1: 171–180.
- Kirk, J.L., Beaudette, L.A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J.N., Lee, H. & Trevors, J.T. 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods* 58: 169–188.
- Kwa na, H. 2001. Fungi in the rhizosphere of common oak and its stumps and their possible effect on infection by *Armillaria*. *Applied Soil Ecology* 17: 215–227.
- Kwa na, H. 2004. Natural shifts in communities of rhizosphere fungi of common oak after felling. *Plant and soil* 264: 209–218.
- Kozdrój, J. & van Elsas, J.D. 2000. Application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis for comparison of direct and indirect extraction methods of soil DNA used for microbial community fingerprinting. *Biology and Fertility of Soils* 31: 372–378.
- Linaldeddu, B.T., Scanu, B., Maddau, L. & Franceschini, A. 2014. *Diplodia corticola* and *Phytophthora cinnamomi*: the main pathogens involved in holm oak decline on Caprera Island (Italy). *Forest Pathology* 44: 191–200.
- Melo, I.S., Santos, S.N., Rosa, L.H., Parma, M.M., Silva, L.J., Queiroz, S.C. & Pellizari, V.H. 2014. Isolation and biological activities of an endophytic *Mortierella alpina* strain from the Antarctic moss *Schistidium antarctici*. *Extremophiles* 18: 15–23.
- Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. 2005. The epidemiology of infectious disease. Pp. 821–843.

- In: Prescott, L.M., Harley, J.P. & Klein, D.A. (eds). Microbiology, 6th edn, McGraw-Hill, New York.
- Raaijmakers, J.M., Paulitz, T.C., Steinberg, C., Alabouvette, C. & Moëgne-Loccoz, Y. 2009. The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil*: 341–361.
- Rapilly, F. 1968. Les techniques de mycologie en pathologie végétale. INR, Paris, 102 pp.
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W. & Fungal Barcoding Consortium. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 6241–6246.
- Seifert, K.A. & Gams, W. 2011. The genera of Hyphomycetes-2011 update. *Persoonia. Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 27: 119.
- Swier, H., Dkhar, M.S. & Kayang, H. 2011. Fungal population and diversity in organically amended agricultural soils of Meghalaya, India. *Journal of Organic Systems* 6: 3–12.
- Valla, G., Capellano, A., Huguency, R. & Moiroud, A. 1989. *Penicillium nodositatum* Valla, a new species inducing myconodules on *Alnus* roots. *Plant and Soil* 114: 142–146.
- Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T. & Samson, R.A. 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Studies in Mycology* 78: 343–371.
- Visagie, C.M., Houbraken, J., Rodrigues, C., Pereira, C.S., Dijksterhuis, J., Seifert, K.A., Jacobs, K. & Samson, R.A. 2013. Five new *Penicillium* species in section *Sclerotiora*: a tribute to the Dutch Royal family. *Persoonia* 31: 42.
- Vu, D., Groenewald, M., De Vries, M., Gehrmann, T., Stielow, B., Eberhardt, U., Al-Hatmi, A., Groenewald, J.Z., Cardinali, G., Houbraken, J. & Boekhout, T. 2019. Large-scale generation and analysis of filamentous fungal DNA barcodes boosts coverage for kingdom fungi and reveals thresholds for fungal species and higher taxon delimitation. *Studies in Mycology* 92: 135–154.
- Wang, X.W., Yang, F.Y., Meijer, M., Kraak, B., Sun, B.D., Jiang, Y.L., Wu, Y.M., Bai, F.Y., Seifert, K.A., Crous, P.W. & Samson, R.A. 2019. Redefining *Humicola* sensu stricto and related genera in the Chaetomiaceae. *Studies in Mycology* 93: 65–153.
- Wang, X.W., Houbraken, J., Groenewald, J.Z., Meijer, M., Andersen, B., Nielsen, K.F., Crous, P.W. & Samson, R.A. 2016. Diversity and taxonomy of *Chaetomium* and chaetomium-like fungi from indoor environments. *Studies in Mycology* 84: 145–224.
- Watanabe, T. 2002. Soil and Seed Fungi and Key to Species, Lewis Publishers, Florida, Boca Raton, 487 pp.
- Wu, Y.M. & Zhang, T.Y. 2013. New species of *Humicola* and *Endophragmiella* from China. *Mycotaxon* 121: 147–151.
- Yadav, D.R., Kim, S.W., Babu, A.G., Adhikari, M., Kim, C., Lee, H.B. & Lee, Y.S. 2014. First report of *Mortierella alpina* (Mortierellaceae, Zygomycota) isolated from crop field soil in Korea. *Mycobiology* 42: 401–404.
- Zhong, S. & Steffenson, B.J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology* 91: 469–476.