

## قارچ‌های اندوفیت جدا شده از درختان بلوط (*Quercus infectoria* Oliv و *Quercus brantii* Lindl)

آسو حاجی زاده<sup>۱</sup>، جهانشیر امینی<sup>۲\*</sup> و جعفر عبدالله زاده<sup>۳</sup>

۱- فارغ التحصیل کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران

۲- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران

پست الکترونیک: jamini@uok.ac.ir

۳- دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، کردستان، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۳

تاریخ دریافت: ۹۷/۰۵/۰۹

### چکیده

قارچ‌های اندوفیت بخشی از اجزای مهم تنوع زیستی مرتبط با گیاهان هستند و قادر بوده تمام بافت‌های داخلی گیاهان را کلمه کرده و سبب بهبود سلامت گیاه شوند. آنها می‌توانند با بیمارگرهای گیاهان برای فضا و غذا از نظر اکولوژیکی رقابت کرده و موجب کاهش بیماری در گیاهان شوند. به‌منظور شناسایی قارچ‌های اندوفیت از برگ، تنه و پوست شاخه‌های سالم درختان بلوط گونه‌های *Quercus brantii* Lindl و *Quercus infectoria* Oliv در استان کردستان از مناطق بانه، کامیاران و مریوان نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی انجام شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه به قطعات نیم تا یک سانتی‌متری تقسیم و پس از ضدعفونی با هیپوکلرید سدیم ۵٪ و اتانول ۷۰٪ با آب مقطر سترون شستشو داده و پس از خشک کردن روی کاغذ صافی سترون روی محیط سیب‌زمینی - دکستروز - آگار حاوی آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین (۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر) در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد کشت شد. شناسایی گونه‌ها براساس خصوصیات ریخت‌شناختی و توالی ناحیه ITS-rDNA انجام گردید. بر این اساس از ۷۵ جدایه، گونه‌های *Truncatella Peyronellaea glomerata* (Corda)، *Chaetomium subaffine*، *Microsphaeropsis olivacea* (Bonord.)، *Ulocladium botrytis* (Preuss) *angustata* (Pers.) Hughes، *Chaetomium* (Sergeeva)، *Trichoderma citrinoviride* (Bissett) و *Trichoderma atroviride* (P. Karst) شناسایی شدند. دو گونه *Chaetomium subaffine* و *Ulocladium botrytis* بیشترین فراوانی را در بین قارچ‌های جدا شده از بافت‌های مورد مطالعه به خود اختصاص دادند. علاوه بر این، بیشترین جدایه‌های اندوفیت به‌ترتیب از بافت ساقه و تنه درختان بلوط گونه *Q. brantii* جدا شد.

واژه‌های کلیدی: بلوط، مطالعات فیلوژنتیکی، ITS، *Peyronellaea*، *Truncatella*

### مقدمه

سرزمین‌های نیم کره شمالی بوده (Nixon, 2002) و در ایران بیشترین انتشار گونه‌های آن در رشته کوه‌های زاگرس است (Ghahramany et al., 2017). منطقه زاگرس بر اساس رویش و انتشار گونه‌های بلوط به‌دو منطقه زاگرس شمالی (استانهای آذربایجان غربی، کردستان، قسمت‌های از

بلوط از جنس *Quercus* و خانواده راش یا پیاله‌داران (Fagaceae) است که با بیش از ۶۰۰ گونه بزرگترین جنس این خانواده را تشکیل می‌دهد (Masoudinejad & Rezazade, 2003). پراکنش گونه‌های بلوط بیشتر در

موز، کاکائو، سویا و گوجه فرنگی اشاره کرد (Larran et al., 2002a; Cao et al., 2002; Larran et al., 2002b; Larran et al., 2001). از تنه درختان جنگلی هم گونه‌های مختلف تریکودرما (*Trichoderma* sp.) به‌عنوان اندوفیت جداسازی و اعلام شده‌اند (Chaverri & Gazis, 2011; Gond et al., 2007; Gazis & Chaverri, 2010). در دنیا از تنه، پوست و برگ درختان بلوط قارچ‌های اندوفیت مختلفی از قبیل *Diplodina* sp. *Phomopsis quercina* *Tubakia dryina* *Fusarium lateritium* *Epicoccum nigrum* *Scytalidium lignicola* *Monocillium* sp. *Colletotricum* *Eutypella* sp. *Trichoderma viride* و *Diplodia mutila* *Acremonium strictum acutatum* Ragazzi *Discula quercina* جداسازی و گزارش شده‌اند (Ragazzi et al., 2001; Vannini & Anselmi, 1997; Gonthier et al., 2011; Linaldeddu et al., 2006; al., 2006). در ایران نیز گونه *Drechslera triseptata* (Drechsler) به‌عنوان قارچ اندوفیت از درخت بلوط گونه *Q. brantii* جداسازی شده است (Roughanian et al., 2012). تحقیقاتی که در زمینه قارچ‌های اندوفیت در دنیا و بویژه ایران صورت گرفته خیلی محدود و مختصر می‌باشد (Hajizadeh et al., 2015). با توجه اهمیت جایگاه اکولوژیکی، اقتصادی و مسایل زیست محیطی جنگل و حفظ درختان جنگلی و همچنین نقشی که قارچ‌های اندوفیت در افزایش مقاومت و حفظ سلامت گیاهان میزبان دارند، این تحقیق برای شناسایی اندوفیت‌های قارچی درختان بلوط (*Q. infectoria* و *Q. brantii*) در استان کردستان انجام شد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری و جداسازی قارچ‌ها

نمونه‌برداری در بهار و تابستان سال‌های ۹۱ و ۹۲ از برگ، شاخه و پوست تنه سالم درختان بلوط گونه *Q. brantii* و *Q. infectoria* فاقد هر گونه علائم بیماری از شهرستان‌های بانه، مریوان، کامیاران و سروآباد به‌صورت تصادفی با فاصله پنج کیلومتری انجام شد. نمونه‌ها در

کرمانشاه و لرستان) و زاگرس جنوبی (استانهای لرستان، چهار محال بختیاری، کهگیلویه و بویر احمد و فارس) تقسیم می‌گردد (Ghahramany et al., 2017). سه گونه از بلوط شامل *Quercus libani* Oliv. *Quercus brantii* Lindl و *Quercus infectoria* Oliv مهمترین گونه‌های آن در زاگرس هستند. گونه *Q. infectoria* در زاگرس شمالی رشد می‌کند که در برخی از نقاط گونه‌های *Q. libani* و *Q. brantii* نیز همراه با آن یافت می‌شوند. زاگرس جنوبی نیز مختص گونه *Q. brantii* است (Marvie, 2005). گونه‌های بلوط در تمامی بخش‌های زاگرس پراکنده هستند (Hosseini et al., 2008).

عوامل نامساعد طبیعی و عوامل زنده‌ای مانند آفات و بیمارگرهای گیاهان کمیت و کیفیت درختان بلوط را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بیماری‌های مختلفی از قبیل آنتراکنوز، پژمردگی، شانکر و مرگ ناگهانی بلوط توسط عوامل بیماری‌زای قارچی به‌وجود می‌آیند و باعث ایجاد خسارت روی این درختان می‌شوند (Brugemann & Schnitzer, 2001).

گروه دیگری از قارچ‌ها که در بافت‌های گیاهی مستقر بوده و هیچ گونه علائمی را در میزبان‌هایشان نشان نمی‌دهند، قارچ‌های اندوفیت هستند. این گروه از قارچ‌ها همه‌جازی بوده و دارای تنوع زیستی بالایی می‌باشند، به‌صورتی که ممکن است در برخی گونه‌های گیاهی بیش از صد گونه قارچ اندوفیت یافت شود (Amal et al., 2011; Debbab et al., 2011). برخی از قارچ‌های اندوفیت در شرایطی که گیاه میزبان‌شان دچار تنش می‌شود باعث بروز بیماری در گیاه می‌شوند (Li et al., 2012; Hashemloo et al., 2013). اما بعضی از گیاهانی که با اندوفیت‌ها در تعامل هستند، نسبت به بیمارگرهای گیاهی از قبیل قارچ‌ها، باکتری‌ها و نماتدها از خود مقاومت بیشتری نشان می‌دهند (Zabalgogezcoa, 1995; Wilson, 2008). قارچ‌های اندوفیت متابولیت‌های ثانویه‌ای تولید می‌کنند که باعث افزایش مقاومت میزبان‌شان در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Strobel, 2002; Huzefa et al., 2008; Fernando et al., 2015; al., 2015). آنها از گیاهان مختلفی در دنیا جداسازی و گزارش شده‌اند از جمله می‌توان به گندم،

کمک منابع و متون مهم قارچ‌شناسی از جمله کلید شناسایی قارچ‌های ناقص (Barnett & Hunter, 1973)، کلید شناسایی سلومیسیت (Sutton, 1980)، کلید شناسایی آسکومیسیت‌ها (Pleosporales) (Zhang *et al.*, 2012) و یا اقدام به شناسایی جدایه‌ها گردید (Boerema *et al.*, 2005).

#### مطالعات فیلوژنتیکی

به منظور تهیه میسلیوم و برای استخراج DNA، جدایه‌های که از نظر رنگ، شکل پرگنه و تیپ اندام‌های قارچ از قبیل هیف، اسپور و کنیدیوفور و ... یکسان بودند در یک گروه قرار گرفتند و از هر گروه فقط یک جدایه برای مطالعات بعدی انتخاب شد. هر کدام از جدایه‌های انتخاب شده در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری دارای ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع Potato Dextrose Broth (PDB) کشت شدند و در حالت عادی به مدت ۱۴-۷ روز در دمای اتاق و روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. توده‌های میسلیومی حاصل از کشت مایع بعد از آبگیری با کاغذ صافی سترون به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری سترون منتقل شدند و تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Roughanian *et al.*, 2012). نحوه استخراج DNA ژنومی و تهیه مخلوط واکنش PCR مطابق روش ذکر شده توسط Abdollahzadeh و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت. به منظور انجام مطالعات فیلوژنتیکی ناحیه ITS1-5.8S از ITS2 DNA ریبوزومی با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 (White *et al.*, 1990) در شرایط واسرشتگی مقدماتی (۹۵ درجه سلسیوس، ۵ دقیقه)، ۳۵ چرخه پی‌سی‌آر شامل واسرشتگی (۹۴ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه)، اتصال (۵۴ درجه سلسیوس، ۰/۵ دقیقه) و طویل شدن (۷۲ درجه سلسیوس، ۱ دقیقه) و سرانجام مرحله طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه تکثیر شد. تخلیص و تعیین توالی توسط شرکت ماکروژن کره

پاکت‌های جداگانه‌ای قرار داده شدند و روی هر کدام از آنها محل و تاریخ نمونه‌برداری درج و سپس به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌ها به قطعاتی به اندازه ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری تهیه و به ترتیب در ابتدا به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد، سه دقیقه در هیپوکلرید ۵ درصد و ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی و سه بار با مقطر سترون شستشو داده شد و پس از خشک کردن روی کاغذ صافی سترون روی محیط غذایی Potato Dextrose Agar (PDA) دارای آنتی‌بیوتیک داکسی‌سایکلین (۱۵۰ mg/l) کشت گردید (Arnold *et al.*, 2001; Larran *et al.*, 2007). خالص‌سازی جدایه‌ها با روش تک اسپور و تک هیف روی محیط کشت PDA و قارچ‌های جدا شده از محیط کشت‌ها اختصاصی مثل Corn Meal Agar (CMA)، Oat Meal Agar (OMA) و Extract Agar (MEA) نیز استفاده گردید. نمونه‌برداری از گونه‌های بلوط در مناطق کامیاران، سروآباد و مریوان صورت گرفت.

#### مطالعات ریخت‌شناختی

به منظور تحریک اسپورزایی، جدایه‌ها به تشتک‌های دارای محیط Water Agar (WA) (آب-آگار) دو درصد منتقل و در شرایط نور- تاریکی ۱۲:۱۲ ساعت زیر ترکیبی از نور NUV و فلورسنت در دمای ۲۴ تا ۲۶ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها براساس ویژگی‌های مختلفی مانند نحوه رشد و رنگ پرگنه روی محیط‌های کشت، سرعت رشد پرگنه در دماهای مختلف، ریخت‌شناسی اندام‌ها و اسپورهای غیرجنسی و جنسی، نحوه کنیدی‌زایی و ریخت‌شناسی کنیدیوفور و سلول کنیدی‌زا انجام شد. به این منظور نمونه‌های میکروسکوپی با استفاده از اسید لاکتیک ۱۰۰٪ تهیه و با میکروسکوپ الپیوس BX51 ساخت ژاپن بررسی شدند. عکس‌برداری از ساختارهای قارچی با دوربین Olympus مدل DP72 انجام گرفت. اندازه‌گیری‌ها با نرم‌افزار CellSens Entry از عکس‌ها با بزرگنمایی ۴۰ یا ۱۰۰ انجام شد. سرانجام با

## نتایج

بر اساس مطالعه و بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی، ۷۵ جدایه بدست آمده در این تحقیق به شش جنس تقسیم شدند. جدایه‌های بدست آمده در این مطالعه در حد جنس و گونه شناسایی شدند. شناسایی جدایه‌های مربوط به جنس *Trichoderma* بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی انجام گردید (Gams & Bissett, 1998). اما شناسایی جدایه‌های متعلق به جنس‌های *Ulocladium*، *Microsphaeropsis*، *Truncatella*، *Peyronellaea*، *Chaetomium* بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی در حد گونه امکان‌پذیر نبودند. بنابراین از هر گروه بر اساس اطلاعات موجود از قبیل ویژگی‌های ریخت‌شناسی و محل نمونه‌برداری یک جدایه به‌عنوان نماینده هر گروه جهت مطالعات مولکولی و شناسایی دقیق گونه قارچ انتخاب شدند. فراوانی، بافت و محل جداسازی هر یک از گونه‌های قارچی شناسایی شده در این تحقیق در جدول یک آمده است.

جنوبی انجام شد. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و Sequence Alignment Editor v.7.0.9.0 اصلاح و استخراج شدند. توالی‌های مربوط به سایر جدایه‌های استفاده شده در این تحقیق از بانک ژن استخراج شدند. هم‌ردیف کردن توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار ClustalX v. 1.83 انجام شد (Thompson *et al.*, 1997). همچنین، در صورت نیاز، ردیف کردن توالی‌ها به‌صورت دستی نیز انجام شد. آنالیزهای فیلوژنتیکی به روش Neighbor joining (NJ) و Maximum parsimony (MP) با نرم‌افزار PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2003) انجام شد. درخت‌های حاصل از آنالیزهای فیلوژنتیکی به وسیله نرم‌افزار TreeView (Page, 1996) مشاهده شدند. روش NJ با تصحیح دو پارامتری کیمورا (Kimura, 1980) و ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap انجام شد. روش MP با استفاده از روش Heuristic search با شاخص‌های stepwise addition، random addition sequence با ۱۰۰۰ تکرار، مساوی ۱۰۰۰۰ و الگوریتم TBR انجام شد. پایداری پارسیمونی‌ترین درخت‌ها با ۱۰۰۰ تکرار Bootstrap ارزیابی شد (Hillis & Bull, 1993).

جدول ۱- فراوانی، میزبان، بافت و محل جداسازی قارچ‌های جدا شده در این تحقیق

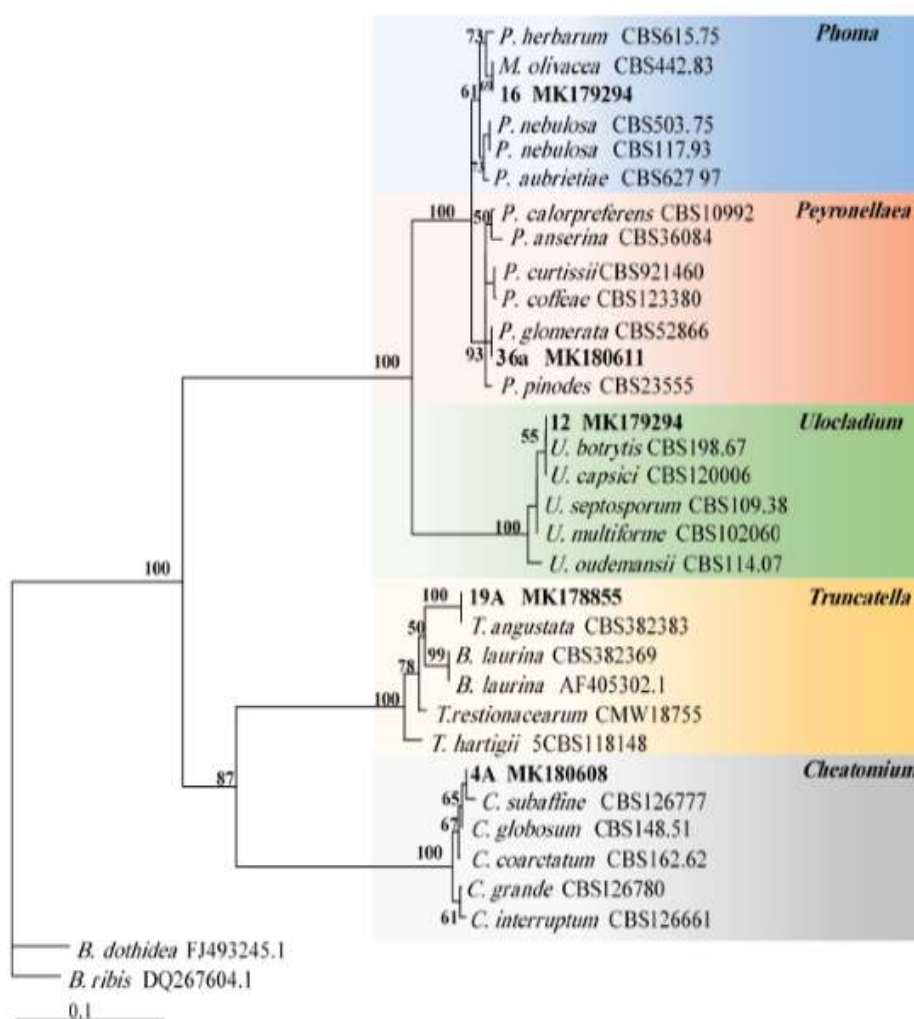
محل نمونه‌برداری	بافت		گونه‌های بلوط		*فراوانی (%)	آرایه
	شاخه	برگ	<i>Q. infectoria</i>	<i>Q. brantii</i>		
کامیاران- مریوان- سروآباد	+	+	-	+	۲۲/۸	<i>Ulocladium botrytis</i>
کامیاران- بانه- سروآباد	+	+	+	-	۳۳	<i>Chaetomium subaffine</i>
کامیاران- مریوان	-	+	+	+	۱۰/۷	<i>Peyronellaea glomerata</i>
کامیاران	-	+	+	+	۴	<i>Microsphaeropsis olivacea</i>
سروآباد- مریوان- بانه	-	+	+	-	۶/۷	<i>Truncatella angustata</i>
کامیاران- بانه- مریوان	-	+	-	-	۱۲/۱	<i>Trichoderma atroviride</i>
کامیاران- مریوان	-	+	+	+	۱۰/۷	<i>Trichoderma citrinoviride</i>

\* فراوانی هر قارچ شناسایی شده مساوی است با تعداد جدایه‌های هر گونه قارچ شناسایی شده تقسیم بر تعداد کل جدایه‌ها (۷۵ جدایه) ضربدر در ۱۰۰ بدست آمد.

## فیلوژنی

تعداد پنج جدایه از مجموع ۷۵ جدایه متعلق به پنج جنس مختلف آسکومیستی برای مطالعات فیلوژنتیکی انتخاب شدند. توالی‌های مربوط به ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 تعداد ۲۸ جدایه نماینده ۲۶ گونه از بانک ژن استخراج و به توالی‌های ۵ جدایه مطالعه شده در این تحقیق اضافه و همردیف شدند. بخش‌های ابتدایی و انتهایی که در بعضی توالی‌ها وجود نداشتند از آنالیزها حذف شدند. تجزیه‌ها با روش‌های NJ و MP انجام شدند. دو جدایه (از جنس

*Botryosphaeria*) به‌عنوان outgroup تعیین شدند (Swofford, 2003; Verkley *et al.*, 2014). براساس نتایج آنالیزهای مذکور و ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌های *Peyronellaea* مربوط به این تحقیق به گونه‌های *Ulocladium*, *Truncatella angustata*, *glomerata*, *Chaetomium*, *Microsphaeropsis olivacea*, *botrytis*, *Trichoderma* و *Trichoderma citrinoviride subaffine atroviride* تعلق داشتند (شکل ۱).

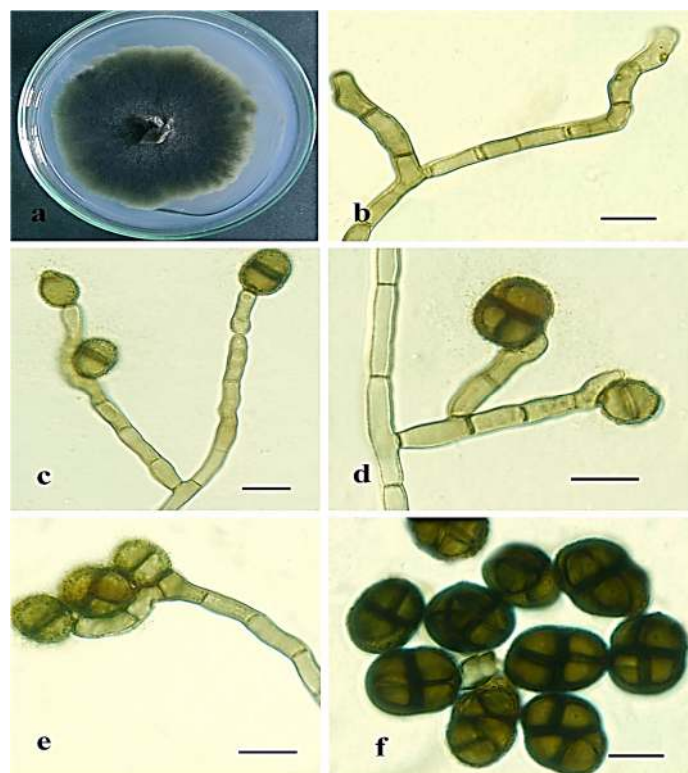


شکل ۱- یکی از سه درخت پارسیمونی حاصل از تجزیه توالی ناحیه ITS گونه‌های شناسایی شده در این تحقیق. مقادیر bootstrap support (درصد) مربوط به تجزیه NJ در روی شاخه‌ها نشان داده شده است. دو جدایه از جنس *Botryosphaeria* به‌عنوان outgroup استفاده شدند.

کروی‌اند، با رنگ قهوه‌ای متمایل به زرد تا قهوه‌ای زیتونی، برخی نیز قهوه‌ای پررنگ‌اند و دارای دیواره زیر و خشن تا زگیل‌مانند هستند. تعدادی نیز دارای دیواره صاف هستند. اندازه کنیدی‌ها ۱۶-۱۱×۲۴-۱۵ میکرومتر بوده و دارای یک تا سه دیواره عرضی و یک تا دو دیواره طولی هستند. در برخی دیواره‌های مورب نیز دیده می‌شوند. دارای پایه مخروطی یا گرد می‌باشند و نوک آنها گرد است (شکل ۲). از لحاظ مورفولوژیکی و با توجه به داشتن کنیدی‌های بیضوی تا گرد این قارچ خیلی به دو گونه *U. consortiale* و *U. cantlous* نزدیک است. ولی از لحاظ اندازه اسپورها با آنها تفاوت دارد. جدایه بدست آمده در این تحقیق بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی کاملاً با گونه *U. botrytis* مشابه بود اما از لحاظ تشابه نوکلئوتیدی یک نوکلئوتید با گونه مذکور تفاوت داشت. در این تحقیق ۱۷ جدایه از گونه *U. botrytis* از شاخه‌های سالم جداسازی گردید.

*Ulocladium botrytis* (Preuss) Woudenberg and Crous, *Studies in Mycology* 75: 206 (2013)

پرگنه قارچ روی محیط کشت PDA بعد از دو هفته قطر آن به ۷۰ میلی‌متر می‌رسد. رنگ آن سبز زیتونی متمایل به تیره تا سیاه بوده، حاشیه پرگنه دارای رنگ سفید می‌باشد (شکل ۲-a). ریشه‌های هوایی خیلی کم مشاهده می‌شوند و بیشتر کنیدیوفورها هستند که از سطح پرگنه بالا آمده‌اند. میسیلیوم‌ها حدود ۳-۴ میکرومتر قطر دارند، زرد تا قهوه‌ای روشن، صاف و دارای دیواره عرضی هستند. کنیدیوفورها به صورت عمودی و بالارونده یا به صورت کج، ساده و کوتاه با اندازه ۳-۴×۱۰-۸ میکرومتر، البته بیشتر به صورت عمود و شاخه‌دار تا بالای ۱۰۰ میکرومتر و به رنگ زرد قهوه‌ای تا قهوه‌ای طلایی با دیواره صاف و معمولاً دارای یک تا دو دیواره عرضی دیده می‌شوند. کنیدی‌ها به صورت منفرد و به شکل تخم‌مرغی، یا بیضوی پهن، بعضی از آنها نیز به شکل



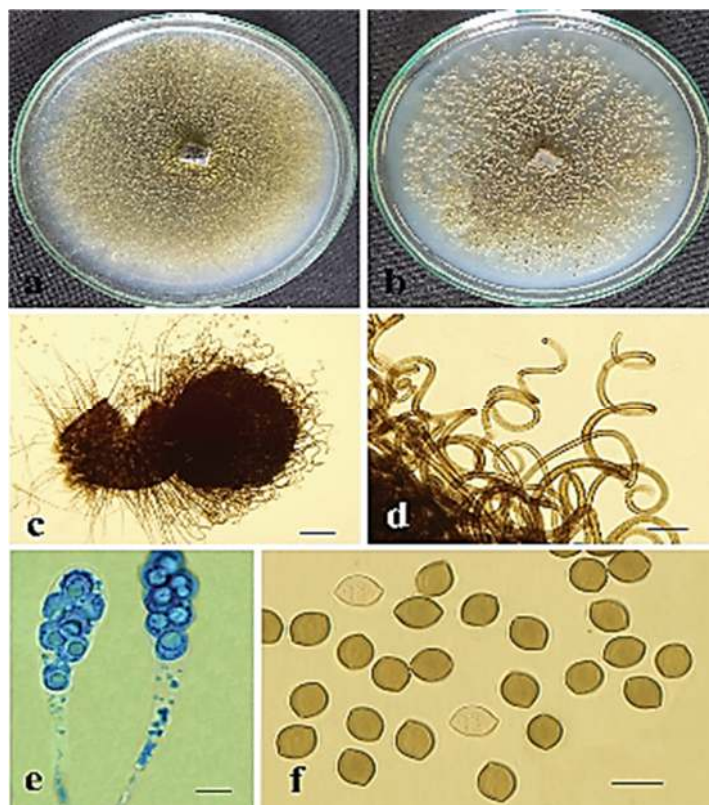
شکل ۲- گونه *Ulocladium botrytis*: (a) پرگنه قارچ روی PDA، (b و c) کنیدیوفورهای بلند، (d و e) کنیدیوفورهای کوتاه، (f)

کنیدی‌های قارچ. مقیاس‌ها) تمامی مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر

بالایی و اطراف دهانه آسکوکارپ دارای موهای فراوان و مترامی می‌باشد که این موها غیر منشعب بوده و به صورت ماریج می‌باشند که این مشخصه از ویژگی‌های این گونه می‌باشد. آسک‌ها به صورت چماقی یا گریزی شکل‌اند و حاوی ۸ آسکوسپور هستند. آسکوسپورها به صورت دو ردیفه یا به صورت تویی در داخل آسک قرار می‌گیرند. اندازه آسک‌ها  $11-14 \times 33-39$  میکرومتر می‌باشد. آسکوسپورها یک شکل و هم‌اندازه بوده و به شکل لیمویی دیده می‌شوند در هنگام بلوغ دارای رنگ قهوه‌ای هستند. دارای یک منفذ جوانه‌زنی انتهایی هستند. اندازه آسکوسپورها  $6/5-5/8 \times 5/5-6/5$  میکرومتر می‌باشد (شکل ۳).

*Chaetomium subaffine* Sergeeva, Not. syst. Pl. non-vasc.: 148 (1961)

پرگنه روی محیط کشت PDA و CMA کشت داده شد. با یک نرخ رشد  $7/5-9$  میلی‌متر در روز، قطر پرگنه یک هفته بعد از کشت به ۵۰ میلی‌متر می‌رسد. رنگ پرگنه زرد مایل به سبز و بدون ترشحات رنگی بود. ریشه‌های قارچ در محیط PDA به رنگ سبز زیتونی دیده می‌شوند (شکل ۳-a). آسکوکارپ‌ها حدوداً یک هفته بعد از کشت ظاهر می‌شوند، روی محیط کشت PDA تراکم زیادی دارند ولی روی CMA سرعت رشد آسکوکارپ‌ها بیشتر بوده و زودتر بالغ می‌شوند. دیواره آسکوکارپ به رنگ تیره بوده و همچنین در ناحیه



شکل ۳- گونه *Chaetomium subaffine*: (a و b) پرگنه قارچ روی PDA و CMA، (c) آسکوکارپ، (d) موهای ماریجی روی سطح

آسکوکارپ، (e) آسک‌ها، (f) آسکوسپورها. مقیاس‌ها (c) = ۱۰۰ میکرومتر، (d,e,f) = ۱۰ میکرومتر

شد. در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بعد از یک هفته پرگنه قارچ روی MEA تا قطر ۷۰ میلی‌متر و روی OMA به اندازه ۵۰ میلی‌متر رشد داشتند. پرگنه دارای ریشه‌های

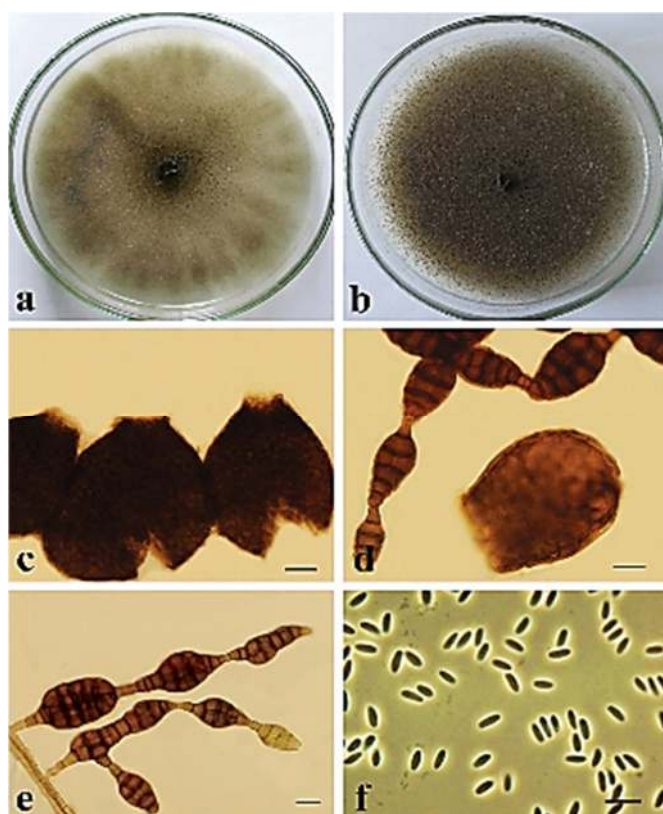
*Peyronellaea glomerata* (Corda) Goid., Atti della Accademia Nazionale dei Lincei 1: 455 (1946)

قارچ روی محیط کشت‌های OMA و MEA کشت داده



کنیدی‌ها به صورت یک قطره مشاهده می‌شود. کنیدی‌ها در شکل و اندازه‌های متنوع بیشتر اوقات تخم مرغی تا بیضوی شکل با اندازه  $3/5-5 \times 1/5-3/5$  میکرومتر و دارای رنگ روشن بوده که با مسن تر شدن آنها رنگ‌شان به قهوه‌ای مایل به زیتونی در می‌آید. کلامیدوسپورها با اندازه‌های مختلف و به طور کلی چند سلولی و دارای دیواره‌های طولی و عرضی و شبیه کنیدی‌های آلترناریا به نظر می‌آیند. به صورت انتهایی و تکی اما بیشتر در شاخه‌ها و زنجیره‌های طولانی تشکیل می‌شوند. دیواره کلامیدوسپورها در ابتدا صاف بوده اما با بلوغ آنها دیواره زیر و خشن می‌شود. رنگ آنها قهوه‌ای تیره تا سیاه و اندازه آنها  $24-12 \times 12-8$  میکرومتر می‌باشد (شکل ۴).

هوایی و متراکم هستند رنگ آنها سبز زیتونی تا مایل به قهوه‌ای رنگ، اما پرگنه روی OMA تیره‌تر است (شکل ۴-a و b). با قدیمی شدن محیط کشت پرگنه قارچ توسط پیکنیدها و کلامیدوسپورها فراگرفته می‌شود. پیکنیدها گرد تا گلابی شکل بدون کرک با اندازه  $300-100$  میکرومتر، قهوه‌ای رنگ و دارای گردن‌هایی با اندازه‌های متفاوت هستند. هم به صورت تکی و هم به صورت مجتمع در محیط کشت دیده می‌شوند. بخش بیرونی پیکنید از سلول‌هایی با ابعاد مساوی تشکیل شده است. میسلسوم‌های هوایی اغلب دارای یک کلامیدوسپور هستند که در زیر آنها یک میکروپیکنید با اندازه  $20-50$  میکرومتر تشکیل می‌شود. بعد از یک هفته در دهانه پیکنیدها اجتماع



شکل ۴- گونه *Peyronellaea glomerata*: (a و b) پرگنه قارچ روی OA و MEA، (c) پیکنیدها، (d) میکروپیکنید، (e)

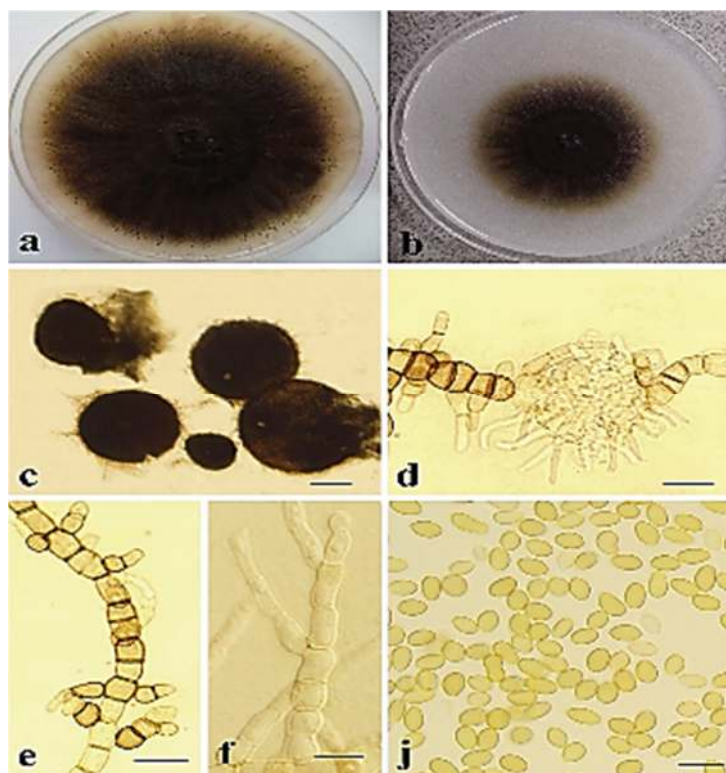
کلامیدوسپورها، (f) کنیدی‌ها. مقیاس‌ها (c = ۲۰ میکرومتر، d,e,f = ۱۰ میکرومتر)



پیکنیدها در کل پرگنه قارچ پراکنده بوده، بدون کرک و رنگ آنها قهوه‌ای می‌باشد. دارای گردن کوتاه هستند و به صورت تکی و مجتمع در پرگنه دیده می‌شوند، با اندازه ۱۴۰-۱۱۵ میکرومتر. کنیدی‌ها تک سلولی بوده و دارای اشکال مختلفی از دایره‌ای تا بیضوی و استوانه‌ای، و حتی به صورت انحنادار نیز دیده می‌شوند. رنگ آنها قهوه‌ای مایل به خاکستری می‌باشد با اندازه ۵-۴ × ۵/۹-۴/۵ میکرومتر. کلامیدوسپورها استوانه‌ای و تک سلولی بوده که مانند دانه‌های تسبیح چسبیده به هم و پشت سر هم قرار می‌گیرند، که از این زنجیره‌ها نیز ممکن است زنجیره‌های دیگری از کلامیدوسپورها منشعب شوند و به رنگ قهوه‌ای کم‌رنگ بوده و دیواره آنها صاف تا زیر و خشن (شکل ۵) با اندازه ۵-۸/۵ × ۱۰-۴/۵ میکرومتر است.

*Microsphaeropsis olivacea* (Bonord.) Hohn., Hedwigia 59:267 (1917).

قطر پرگنه قارچ روی محیط کشت MEA بعد از یک هفته به ۴۰ میلی‌متر می‌رسد. مرکز پرگنه به رنگ قهوه‌ای مایل به تیره بوده اما رنگ پرگنه در حاشیه کلنی به رنگ قهوه‌ای مایل به زرد یا سبز زیتونی دیده می‌شود. روی OMA بعد از یک هفته قطر آن به ۴۵ میلی‌متر می‌رسد. پرگنه به صورت دوایر متحدالمرکز رشد کرده و در مرکز پرگنه رنگ آن قهوه‌ای مایل به تیره می‌باشد. از مرکز به طرف حاشیه از شدت تیرگی آن کاسته می‌شود طوری که رنگ پرگنه در حاشیه قهوه‌ای مایل به زرد به نظر می‌رسد (شکل ۵، a و b). تست NaOH در مورد این قارچ منفی بوده و هیچ تغییر رنگی مشاهده نشد.



شکل ۵- گونه *Microsphaeropsis olivacea*: (a و b) پرگنه قارچ روی OA و MEA، (c) پیکنیدها، (d) میکروپیکنید،

(e و f) کلامیدوسپورها، (g) کنیدی‌ها. مقیاس‌ها (c = ۱۰۰ میکرومتر؛ d, e, f, j = ۱۰ میکرومتر)

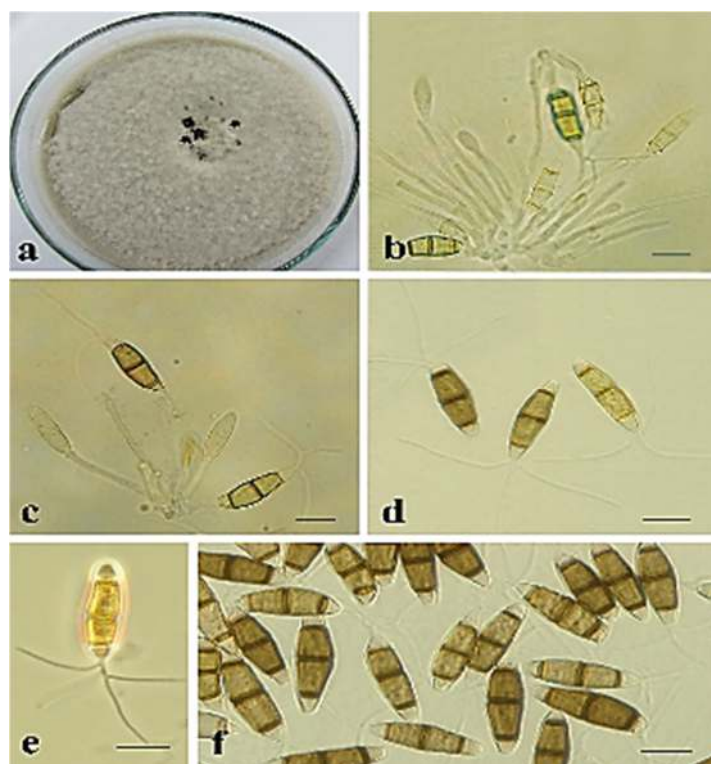
پرگنه روی PDA در دمای ۲۵ درجه بعد از یک هفته به اندازه ۳۰ میلی‌متر رشد می‌کند. دارای ریشه‌های هوایی

*Truncatella angustata* (Pers.) S. Hughes, Canadian Journal of Botany 36 (6): 822 (1958)

میانی قهوه‌ای و در برخی موارد کمی در تیغه‌ها کم‌رنگ می‌شوند. سلول‌های آپیکالی بسیار کوچک بوده ولی در کنیدی‌های قدیمی‌تر و گاهی نیز در کنیدی‌های جوان توسعه یافته‌اند، در پایه گرد و فاقد آپاندیج می‌باشند اما در ناحیه آپیکالی دارای یک تا چهار آپاندیج بلند، باریک و شفاف هستند که در برخی از کنیدی‌ها منشعب‌اند. آپاندیج‌ها بیشتر از ۱۹ میکرومتر طول دارند. اندازه کنیدی ۶/۵-۲۲×۱۸- میکرومتر است (شکل ۶).

فراوان و سفید می‌باشد که ظاهری پنبه مانند به پرگنه می‌دهد (شکل ۶-ا).

کنیدیوماتا آسروولار تا پیکنیدیال، به تعداد زیاد و به صورت پراکنده یا گروهی در سطح محیط کشت تشکیل می‌شوند، نامنظم و قهوه‌ای تیره تا سیاه، بیشتر آن‌ها در مرکز محیط کشت تشکیل می‌شوند. کنیدیوفورها به صورت ساده یا منشعب و شفاف هستند دارای دیواره عرضی، با طول ۳۲-۴۵ میکرومتر. کنیدی‌ها و سلول کنیدی‌زا در ابتدا لعاب‌دار هستند. کنیدی‌ها چهار سلولی بوده که دو سلول



شکل ۶- گونه *Truncatella angustata*: (a) پرگنه قارچ روی PDA، (b و c) کنیدیوفورهای جوان و بالغ، d، e، و f کنیدی‌ها با آپاندیج‌های منشعب و غیر منشعب. مقیاس‌ها) تمامی مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر

دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی کامل روی محیط کشت PDA کنیدیوم‌زایی از وسط پرگنه شروع می‌شود (شکل ۷).

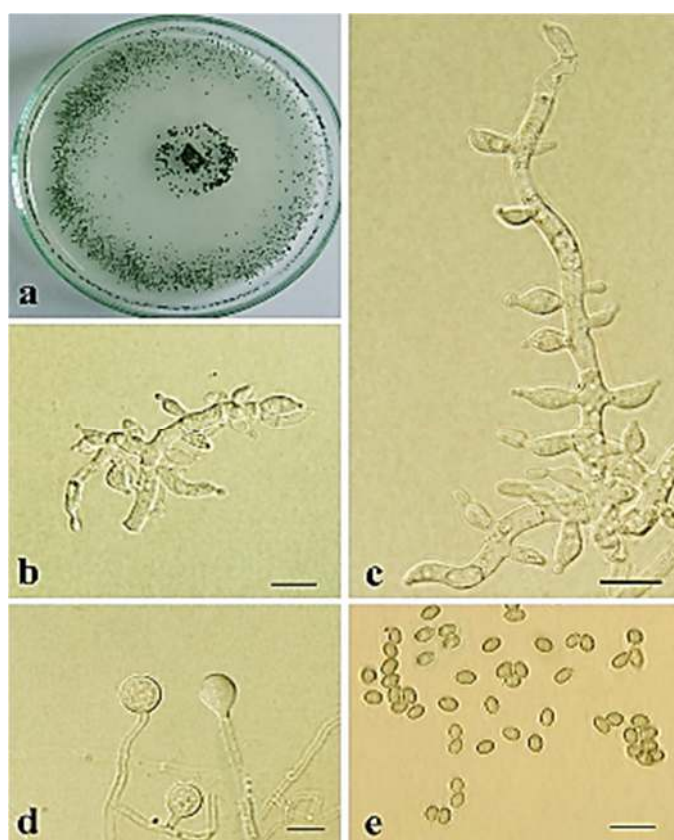
کنیدیوم‌زایی، معمولاً به صورت یکنواخت و پیوسته در سطح محیط پراکنده می‌شود. تولید جوش‌هایی به صورت

*Trichoderma atroviride* P. Karst., Finlands  
Mögelsvampar: 21 (1892)

پرگنه دارای رشد به نسبت سریع و قطر رشد آنها روی محیط کشت MA بعد از سه روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به ۷۵ میلی‌متر می‌رسد. بعد از ۹۶ ساعت در

قلاب مانند می شوند. فیالیدها غالباً به صورت منفرد یا در دسته های ۲-۴ تایی روی کنیدیوفور قرار می گیرند. فیالیدهای منفرد و انتهایی معمولاً استوانه ای ولی سایر فیالیدها فلاسکی شکل تا حدودی در قسمت میانی نسبت به دو طرف متورم ترند. اندازه فیالیدها  $3-12 \times 2/5-6$  میکرومتر می باشد. کنیدیومها به شکل نیم کروی تا تخم مرغی، دارای دیواره صاف هستند. اندازه کنیدیومها  $3-4/5 \times 2/5-3$  میکرومتر. کلامیدوسپورها کروی تا نیم کروی (شکل ۷).

شعاعی می نمایند. جدایه های این گونه روی محیط کشت های OA، PDA به شدت بویی شبیه بوی نارگیل تولید می نمایند. ریشه ها بی رنگ بوده و دارای دیواره صاف می باشند. کنیدیوفورها درختچه ای و به تدریج به طرف نوک باریک می شوند. شاخه های فرعی غالباً به صورت منفرد روی کنیدیوفور قرار می گیرند ولی تعدادی از آنها نیز ممکن است به صورت جفتی و حتی دسته های سه تایی فراهم منشعب گردند. فیالیدها مستقیم یا خمیده اند و غالباً در قسمت نوک



شکل ۷- گونه *Trichoderma atroviride*: (a) پرگنه قارچ روی PDA، (b و c) کنیدیوفورها و فیالیدها، (d) کلامیدوسپورها، (e) کنیدی ها. مقیاس ها) تمامی مقیاس ها = ۱۰ میکرومتر

خیلی کم دیده می شوند. رنگ پرگنه روی این محیط سبز مایل به زرد است. سطح زیرین پرگنه در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد کمی زرد و با افزایش دما زردتر می شود (شکل ۸). روی محیط کشت MEA کنیدیومزایی به صورت دسته های سست و غالباً در حاشیه پرگنه انجام می شود. گاهی دسته ها به هم

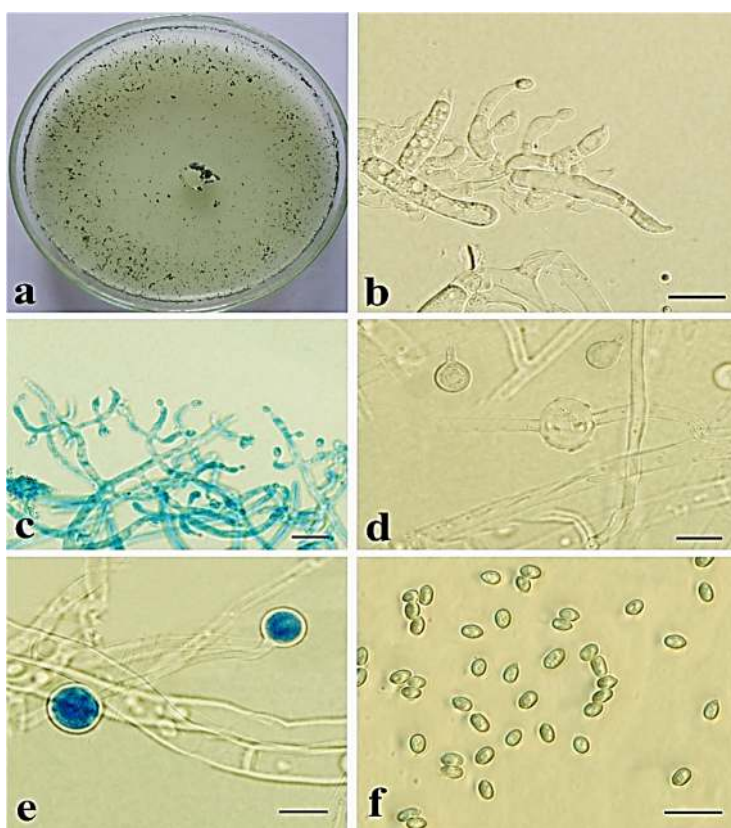
*Trichoderma citrinoviride* Bissett, Canadian Journal of Botany 62 (5): 926 (1984)

پرگنه دارای رشد سریع و شعاع پرگنه روی محیط کشت PDA بعد از ۶۴ ساعت در شرایط تاریکی در دماهای ۳۰ درجه سانتی گراد به ۶۶ میلی متر می رسد. ریشه های هوایی

جفتی و گاهی تکی به صورت یک در میان و حتی نامنظم هم روی کنیدیوفور تشکیل می‌شوند. فیالیدهای منفرد به‌ویژه در قسمت انتهایی محور اصلی کنیدیوفور و شاخه‌های فرعی ایجاد می‌گردند. فیالیدها به صورت مستقیم و در قسمت پایه جمع شده و تا حدودی در وسط متورم، در محل تشکیل کنیدیوم کاملاً باریک می‌شوند و اندازه آنها  $3-8 \times 2-4$  میکرومتر. کنیدیوم‌ها کشیده تا بیضوی به نسبت منظم و اندازه آنها  $2/5-4/5 \times 3/4-4/5$  میکرومتر و دیواره کنیدیوم‌ها صاف و به رنگ سبز روشن است (شکل ۸).

تشخیص این گونه از سایر گونه‌های بخش *Longibrachiatum* با داشتن کنیدیوفورهای دارای شاخه‌های فرعی بیشتر و همچنین دسته‌های سه‌تایی فیالیدها به راحتی امکان‌پذیر است. در این تحقیق ۸ جدایه از این گونه از تنه درختان بلوط جداسازی شد.

پیوسته و تولید بالشتک‌های بزرگی می‌نمایند. دسته‌های کنیدیومی در ابتدا سفید و به سرعت شروع به سبز شدن می‌نمایند و در نهایت سبز متمایل به زرد می‌شوند. در کشت‌های مسن هنگامی که دسته‌ها به همدیگر می‌پیوندند توده‌های بزرگی به رنگ سبز متمایل به آبی به وجود می‌آورند. سطح زیرین پرگنه در این گونه به طور مشخصی زرد می‌شود. از پرگنه بوی خاصی متصاعد نمی‌شود. ریشه‌ها بی‌رنگ و دارای دیواره صاف بوده و داخل محیط کشت رشد می‌کنند. کلامیدوسپورها، به شکل کروی تا نیم‌کروی به صورت انتهایی یا میانی تشکیل می‌شوند. کنیدیوفورها، از نوع بخش *Longibrachiatum* کنیدیوفورها بی‌رنگ، به نسبت بلند و ایستاده، دارای انشعابات اغلب نامنظم و به ندرت به صورت جفتی و متقابل تشکیل می‌شوند. بندها در کنیدیوفور به وضوح رؤیت می‌شوند. فیالیدها، تنگی شکل تا آمپولی شکل و به صورت دسته‌های ۲-۳ تایی و فراهم و یا



شکل ۸- گونه *Trichoderma citrinoviride*: (a) پرگنه قارچ روی PDA، (b) و (c) کنیدیوفورها و فیالیدها، (d) و (e) کلامیدوسپورها، (f)

کنیدی‌ها. مقیاس‌ها) تمامی مقیاس‌ها = ۱۰ میکرومتر

## بحث

در این مطالعه ۷۵ جدایه قارچی اندوفیت از بافت‌های مختلف درخت بلوط از قبیل تنه، برگ و شاخه جداسازی و براساس مطالعات ریخت‌شناسی و مولکولی گونه‌های *Chaetomium subaffine*, *Ulocladium botrytis*, *Microsphaeropsis Peyronellaea glomerata*, *Trichoderma Truncatella angustata olivacea atroviride* و *T. citrinoviride* شناسایی شدند. بیشتر گونه‌ها از بافت ساقه و تنه درختان بلوط شناسایی شدند. دو گونه *C. subaffine* و *U. botrytis* بترتیب بیشترین فراوانی در بین جدایه‌های بدست آمده به خود اختصاص دادند. از تعداد ۷۵ جدایه بدست آمده، ۱۷ جدایه متعلق به گونه *U. botrytis* است.

جنس *Alternaria* توسط Nees در سال ۱۸۱۶ بر اساس *A. tenuis* به‌عنوان تنها گونه آن شرح داده شد (Simmons, 2002). طبقه‌بندی این جنس در طول دوره‌های زمانی مختلف دچار تغییرات فراوانی شده است. از جمله این تغییرات می‌توان به سه جنس جدید *Alternariaster*, *Chalastospora* و *Teretispora*، اشاره کرد که از جنس *Alternaria* جدا شدند و خود جنس *Alternaria* را در دو بخش و ۱۴ گروه قرار داد (Simmons, 2002). این مجموعه آلترناریا در حال حاضر بر اساس مطالعات Woudenberg و همکاران در سال ۲۰۱۳ به ۲۴ بخش تقسیم می‌شود. بخش *Ulocladioides* شبیه بخش *Ulocladium* است و اکثر گونه‌های موجود در این بخش، از بخش *Ulocladium* وارد آن شده است (Wang et al., 2010). این بخش قبلاً به‌عنوان یک جنس جدا از *Alternaria* بود و گونه‌های آن در جنس *Ulocladium* قرار داشتند. جنس *Ulocladium* برای اولین بار توسط پرئوس (Preuss) بنا نهاده شد ولی هم‌اکنون به‌عنوان یک بخش از *Alternaria* طبقه‌بندی می‌شود (Woudenberg et al., 2013).

از گونه *C. subaffine* ۲۵ جدایه از تنه، شاخه و برگ درخت بلوط گونه *Q. brantii* جداسازی گردید. جنس

*Chaetomium* برای اولین بار توسط Kunze و بر اساس گونه تیپ آن *C. globosum* توصیف شد. این جنس جز آسکومیست‌ها بوده و بر اساس آسکوکارپ‌های سطحی و معمولاً با موهای پوشیده شده مشخص می‌شود (Hess et al., 1967; Millner et al., 1977). Winter برای اولین بار این جنس را در خانواده *Chaetomiaceae* (*Sordariales*) قرار داد. مطالعات مولکولی که بعداً صورت گرفت مطالعات مورفولوژیکی را تایید کرد. این خانواده یک رابطه خوهری با دیگر خانواده‌های *Sordariales* به‌خصوص *Lasiosphaeriaceae* دارد. تاکنون ۱۵۵ گونه در این جنس توصیف شده است (Asgari & Zare, 2011). این قارچ با صفات مورفولوژیکی مانند موهای سطح آسکوکارپ که ماریج بود و غیرمنشعب هستند و بسیار نزدیک به گونه‌های *C. coarctatum* و *C. undulatum* قرار می‌گیرد و تنها تفاوت‌های جزئی در اندازه آسک‌ها و آسکوسپورها دارند (Asgari & Zare, 2011). این جدایه بر اساس تجزیه فیلوژنتیکی نزدیک به گونه *C. subaffine* قرار می‌گیرد و از لحاظ تشابه نوکلئوتیدی این جدایه یک نوکلئوتید با این گونه تفاوت دارد. در این تحقیق ۲۵ جدایه از نمونه‌های بلوط جداسازی شد.

گوینیچ (Goinich) در سال ۱۹۴۶ جنس جدید *Peyronellaea* را برای قارچ‌های *phomaceous* بر اساس گونه تیپ *P. veronensis* ایجاد کرد که او آن را به‌عنوان یک بیمارگر از سیب جدا کرد. بعد از آن تا سال ۱۹۶۱ چهار گونه دیگر نیز به آن اضافه شد که همه این گونه‌ها به‌عنوان بیمارگر از گیاهان مختلف یافت شدند (Deshpande & Mantri, 1966). قارچ *Peyronellaea* به‌عنوان یک جنس جدید پیشنهاد شده است که در اصل شامل گونه‌هایی می‌باشد که توسط Boerema و همکاران در جنس *Phoma* طبقه‌بندی می‌شد. بر اساس مورفولوژی، *Peyronellaea* به‌عنوان یکی از نه بخش جنس *Phoma* در نظر گرفته شده است و با توجه به داشتن یک ساختار کلامیدوسپور چند سلولی، که ممکن است در طبقه بندی بر اساس کلامیدوسپور



نوکلئوتید با این گونه تفاوت داشتند. در این تحقیق سه جدایه از این قارچ جداسازی شد.

جنس *Truncatella* برای اولین بار در سال ۱۹۴۹ توسط Steyart معرفی شد (Steyart, 1949). در ابتدا *Ervazzt* نظریه جدا بودن *Truncatella* و *Pestalotiopsis* از *Pestalotia* را مطرح کرد اما در سال ۱۹۵۵ گجبا (Gtjba)، جدایی این جنس‌ها بر اساس تعداد سلول‌های رنگی را رد کرد. اما بعداً این نظریه توسط ساتون در سال ۱۹۶۹ پذیرفته شد. تعداد سلول‌های رنگی و تعداد دیواره عرضی در سلول‌ها و کنیدیوفورها از ویژگی‌های مهم در طبقه‌بندی این گروه از قارچ‌ها می‌باشند (Hughes, 1953; Ellis, 1960; Sutton, 1964). گونه‌هایی که در جنس *Truncatella* قرار می‌گیرند دارای اسپورهای چهار سلولی هستند که دو سلول میانی به رنگ قهوه‌ای یا قهوه‌ای تیره بوده، دیواره عرضی آنها ضخیم و آپاندیج‌های رأسی منشعب می‌باشند (Guba, 1961). بر اساس فرضیه مورفولوژیکی Guba در سال ۱۹۶۱، *Truncatella* و *Pestalotiopsis* با همدیگر هم‌جنس بودند بعداً Arx اظهار داشت که *Truncatella* به‌عنوان مترادف *Seimatosporium* و *Pestalotia* است (Arx, 1981)، که براساس نتایج جدید Jeewon و همکاران در سال ۲۰۰۲، پشتیبانی نشده و *Truncatella* به‌همراه *Bartalinia* در یک گروه *paraphyletic* قرار گرفت (Jeewon et al., 2002). در این تحقیق ۵ جدایه از این قارچ جداسازی شد که هم از لحاظ مورفولوژیکی و هم بر اساس توالی نواحی ITS با گونه *T. angustata* مطابقت داشت.

گونه‌های جنس *تری‌کودرما* از جمله هیفومیست‌های خاکزی هستند که در سراسر دنیا یافت می‌شوند (Muthumeenakshi, 1996). گونه‌های این جنس دارای پراکنش جهانی بوده و قارچ‌های خاکزی و پوساننده چوب هستند (Klein & Eveleigh, 1998). تحقیقات سال‌های گذشته نشان می‌دهد که گونه‌های جنس *تری‌کودرما*، همزیست‌های گیاهی غیربیماری‌زا و مفیدی هستند که به‌خوبی از طریق مکانیسم‌های رقابت و تسخیر فراریشه،

تک‌سلولی صورت بگیرد، مشخص می‌شود. پیکنیدها و کلامیدوسپورها که بسته به شرایط رشد در پرگنه رخ می‌دهند به‌عنوان دو فرم غیرجنسی متفاوت در نظر گرفته می‌شوند (Deng et al., 2011). در این تحقیق ۸ جدایه از گونه *P. glomerata* جداسازی و مطالعه گردید.

جنس *Microsphaeropsis* در سال ۱۹۱۷ توسط هونل (Hönel) بنا نهاده شد و در رده‌بندی‌های اولیه در خانواده *Didymosphaeriaceae* (هم‌نام با *Montagnulaceae*) قرار داده شد. جنس *Microsphaeropsis* در سال ۲۰۰۹ به خانواده *Didymellaceae* منتقل شد (Wijayawardene et al., 2016; Wijayawardene et al., 2018; De Gruyter et al., 2009; Hyde et al., 2013).

خانواده *Didymellaceae* همچنین شامل گونه‌های مربوط به جنس *phoma* و جنس‌های نزدیک به *phoma* هم شناخته می‌شد (Aveskamp et al., 2010). اما در مطالعات فیلولژتیکی که در سال ۲۰۱۵ توسط Chen و همکارانش صورت گرفت مشخص شد که از لحاظ تکاملی، جنس *Microsphaeropsis* از خانواده *Didymellaceae* فاصله زیادی دارد. بنابراین Chen و همکاران یک خانواده جدید با نام *Microsphaeropsidaceae* را ایجاد کردند و جنس *Microsphaeropsis* را نیز در این خانواده قرار دادند (Hyde et al., 2013; Ariyawansa et al., 2014; Thambugala et al., 2015). جنس *Microsphaeropsis* از لحاظ ویژگی‌های ریخت‌شناختی دارای کنیدی‌های کوچک، سبز مایل به قهوه‌ای و اغلب جدا می‌باشند که در پیکنیدهای دارای فیالید شکل می‌گیرند و بسیار مشابه جنس‌های *Coniothyrium* و *phoma* می‌باشند (Carisse & Bernier, 2002). کنیدی‌های جنس *Microsphaeropsis* با توجه به تزیینات سطحی و رنگ تیره‌تر با خانواده *Didymellaceae* فرق دارند (Chen et al., 2015). جدایه‌های بدست آمده در این تحقیق از لحاظ ریخت‌شناسی با گونه *Microsphaeropsis olivacea* تا حدودی مشابه بود. از لحاظ مولکولی و توالی ناحیه ITS دو



دانشگاه کردستان برای پشتیبانی در انجام پژوهش قدردانی شود.

### منابع مورد استفاده

- Abdollahzadeh, J., Goltapeh, E.M., Javadi, A., Shams-Bakhsh, M., Zare, R. and Phillips, A.J.L. 2009. *Barriopsis iraniana* and *Phaeobotryon cupressi*: two new species of the *Botryosphaeriaceae* from trees in Iran. *Persoonia*, 23: 1-8.
- Amal, H.A., Debbab, A. and Proksch, P. 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90: 1820-1845.
- Ariyawansa, H.A., Tanaka, K., Thambugala, K.M., Phookamsak, R., Tian, Q., Camporesi, E., Hongsanan, S., Monkai, J., Wanasinghe, D.N., Mapook, A. and Chukeatirote, E. 2014. A molecular phylogenetic reappraisal of the *Didymosphaeriaceae* (= *Montagnulaceae*). *Fungal Diversity*, 68(1): 69-104.
- Arnold, A.E., Maynard, Z. and Filbert, G.S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous neotropical trees: Patterns of abundance and diversity. *Mycological Research*, 105: 1502-1507.
- Arx, Von. J.A. 1981. The genera of fungi sporulating in culture, third ed. J. Cramer, Vaduz.
- Asgari, B. and Zare, R. 2011. The genus *Chaetomium* in Iran, a phylogenetic study including six new species. *Mycologia*, 103(4): 863-882.
- Aveskamp, M.M., De Gruyter, J., Woudenberg, J.H.C., Verkley, G.J.M. and Crous, P.W. 2010. Highlights of the *Didymellaceae*: a polyphasic approach to characterize *Phoma* and related pleosporalean genera. *Studies in mycology*, 65: 1-60.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B. 1973. *Illustrated General of Imperfect Fungi*. Burgess publishing company, 241p.
- Bisby, G.R. 1939. *Trichoderma Viride* Pers. Exfries, and notes on *Hypocrea*. *Transactions of The British Mycological Society*, 23(2): 149-168.
- Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62: 924-931.
- Błaszczuk, L., Popiel, D., Chelkowski, J., Koczyk, G., Samuels, G.J., Sobieralski, K. and Siwulski, M. 2011. Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *Journal of applied genetics*, 52(2): 233-243.
- Boerema, G.H., De Gruyter, J., Noordeloos, M.E. and Hamers, M.E. 2005. *Phoma identification manual*. G *Phoma* sect. *Plenodomus*, CABI Publishing, UK,

میکوبارازیتیسیم، تولید آنتی‌بیوتیک و آنزیم، القاء پاسخ‌های دفاعی در گیاه و تحریک رشد گیاهی روی اکثر عوامل بیماریزای قارچی در گیاهان به‌ویژه در فرا ریشه، تأثیرات بیوکنترلی دارند (De Souza *et al.*, 2016). این جنس برای اولین بار توسط Persoon معرفی شد (Persoon, 1794). سپس به‌طور دقیق در آن زمان بود که تریکودرما معرفی و نام‌گذاری شد. Bisby مرحله جنسی قارچ تریکودرما را تحت عنوان *Hypocrea* معرفی کرد (Bisby, 1939). این جنس متعلق به شاخه *Ascomycota* و رده *Sordariomycetes* راسته *Hypocreales* و خانواده *Hypocreaceae* می‌باشد (Lumbsch & Huhndorf, 2007).

Bissett طبقه‌بندی جنس تریکودرما را به‌طور دقیق بررسی کرده و آن را به پنج بخش *Trichoderma* و *Pachybasium* *Saturnisporum* *Longibrachiatum* و *Hypocreanum* تقسیم نمود (Bissett, 1984).

کنیدیوفور در جدایه‌های این گونه نسبت به سایر گونه‌های بخش *Trichoderma* متفاوت و بسیار شبیه *T. viride* است. کنیدیوفورها کم تراکم و قابل انعطاف هستند. این گونه از لحاظ شکل و اندازه فیالیدها و کنیدیوفورها و نیز میزان شعاع رشد پرگنه که بعد از ۷۲ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد روی محیط PDA از ۱۵ میلی‌متر تجاوز نمی‌کند، از سایر گونه‌های شبیه در بخش *Trichoderma* به‌ویژه *T. harzianum* قابل تفکیک است. بزرگ‌تر بودن اندازه کنیدیوم‌ها و فیالیدها و رنگ سبز تیره کنیدیوم‌ها و همچنین میزان رشد در ۳۵ درجه سانتی‌گراد، این گونه را از *T. harzianum* f. sp. *T. aggressivum* و *T. aggressivum* f. sp. *europaeum* متمایز می‌کند. در این تحقیق ۹ جدایه از گونه *T. atroviride* جداسازی گردید که از نظر کنترل بیولوژیکی دارای اهمیت زیادی است (Błaszczuk *et al.*, 2011).

### سپاسگزاری

لازم است از گروه گیاه‌پزشکی و دانشکده کشاورزی

- Gazis, R. and Chaverri, P. 2010. Diversity of fungal endophytes in leaves and stems of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) in Tambopata, Peru. *Fungal Ecol* (In press).
- Ghahramany, L., Shakeri, Z., Ghalavand, E. and Ghazanfari, H. 2017. Does diameter increment of Lebanon oak trees (*Quercus libani* Oliv.) affected by pollarding in Northern Zagros, Iran ?. *Agroforest Systems*, 91: 741-748.
- Gond, S.K., Verma, V.C., Kumar, A., Kumar, V. and Kharwar, R.N. 2007. Study of endophytic fungal community from different parts of *Aegle marmelos* Correae (Rutaceae) from Vanasi (India). *World Journal Microbiology Biotechnology*, 23: 1371-1375.
- Gonthier, P., Gennaro, M. and Nicolotti, G. 2006. Effect of water stress on the endophytic mycota of *Quercus robur*. *Fungal Diversity*, 21: 69-80.
- Guba, E.F. 1961. Monograph of *Pestalotia* and *Monochaetia*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Hajjzadeh, A., Amini, J. and Abdollahzadeh, J. 2015. New records of endophytic fungi isolated from oak trees in Kurdistan Province (Iran). *Rostaniha*, 16(1): 109-122 (In Persian).
- Hashemloo, E., Jamali, A.H. and Ghosta, Y. 2013. Isolation and identification of endophytic fungi from stone fruit trees in West Azerbaijan province. 1th Iranian Mycological Congress, 3-5 September, Rasht, Iran (In Persian).
- Hess, W.M., Müller, E. and Aue, R. 1967. Germ pores of *Chaetomium* ascospores. *Naturwissenschaften*, 54(19): 521-522.
- Hillis, D.M. and Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for Assessing confidence phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, 42(2): 182-192.
- Hosseini, A., Moayeri, M.H. and Haidari, H. 2008. Effect of site elevation on natural regeneration and other characteristics of oak (*Quercus brantii*) in the Hyanan's Forest, Ilam. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources*, 15(1): 27-42.
- Hughes, S.J. 1953. Conidiophores, conidia, and classification. *Canadian Journal Botany*, 31: 577-659.
- Huzefa, A.R., Amninder K., Tamam E. and Mario, F. 2015. Phylogenetic and chemical diversity of fungal endophytes isolated from *Silybum marianum* (L) Gaertn. (milk thistle). *Mycology*, 6(1): 8-27.
- Hyde, K.D., Jones, E.G., Liu, J.K., Ariyawansa, H., Boehm, E., Boonmee, S., Braun, U., Chomnunti, P., Crous, P.W., Dai, D.Q. and Diederich, P. 2013. Families of dothideomycetes. *Fungal Diversity*, 63(1): 1-313.
- 364-366.
- Brugemann, N. and Schnitzer, J.P. 2001. Influence of powdery mildew (*Microsphaera alphitoides*) on isoprene biosynthesis and emission of pedunculate oak (*Quercus robur* L.) leaves. *Journal of Applied Botany*, 75(3-4): 91-96.
- Cao, L.X., You, J.L. and Zhou, S.N. 2002. Endophytic fungi from *Musa acuminatum* leaves and roots in South China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 169-171.
- Carisse, O. and Bernier, J. 2002. *Microsphaeropsis ochracea* sp. nov. associated with dead apple leaves. *Mycologia*, 94(2): 297-301.
- Chaverri, P. and Gazis, R.O. 2011. *Trichoderma amazonicum*, a new endophytic species on *Hevea brasiliensis* and *H. guianensis* from the Amazon basin. *Mycologia*, 103(1): 139-151.
- Chen, Q., Jiang, J.R., Zhang, G.Z., Cai, L. and Crous, P.W. 2015. Resolving the Phoma enigma. *Studies in mycology*, 82: 137-217.
- Debbab A., Amal, H.A. and Proksch, P. 2011. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. *Fungal Diversity*, 49: 1-12.
- De Gruyter, J., Aveskamp, M.M., Woudenberg, J.H., Verkley, G.J., Groenewald, J.Z. and Crous, P.W. 2009. Molecular phylogeny of Phoma and allied anamorph genera: towards a reclassification of the Phoma complex. *Mycological research*, 113(4): 508-519.
- Deng, J.X., Paul, N.C., Li, M.J., Seo, E.Y., Sung, G.H. and Yu, S.H. 2011. Molecular characterization and morphology of two endophytic *Peyronellaea* species from *Pinus koraiensis* in Korea. *Mycobiology*, 39(4): 266-271.
- Deshpande, K.B. and Mantri, J.M. 1966. A new species of *peyronellaea* from Indian soil. *Mycopathologia et mycologia applicata*, 30(3-4): 341-344.
- De Souza, J.T., Trocoli, R.O. and Monteiro, F.P. 2016. Plant from the Caating biome harbor endophytic *Trichoderma* species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. *Biological Control*, 94: 25-32.
- Ellis, M.B. 1960. Dematious Hyphomycetes.1 *Mycological Paper C.M.I.*, 76:1-36.
- Fernando, E.V., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F. and Rehner, S.A. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological Control*, 46: 72-82.
- Gams, W. and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. pp. 3-34. - In C. P. Kubieek and G. E. Harman (eds.), *Trichoderma and Gliocladium*. Taylor & Francis Ltd., London, U.K.

- phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*, 12: 357-358.
- Persoon, C.H. 1794. *Disposita methodica fungorum*. Römers Neues Mag Bot, 1: 81-128.
  - Ragazzi, A., Moricca, S., Capretti, P., Dellavalle, I., Mancini, F. and Turco, E. 2001. Endophytic fungi in *Quercus cerris*: isolation frequency in relation to phenological phase, tree health and the organ affected. *Phytopathologia Mediterranea*, 40: 165-171.
  - Roughanian, M., Amini, J., Zafari, D. and Abdollahzadeh, J. 2012. *Drechslera triseptata*, a new record for Iranian mycoflora. *Rostaniha*, 13(1): 109-110 (In Persian).
  - Simmons E.G. 2002. *Alternaria* themes and variations (287-304). Species on *Caryophyllaceae*. *Mycotaxon*, 82: 1-40.
  - Steyart, R.L. 1949. Contribution a l'étude monographique de *Pestalotia* de Not. Et *Monochaetia* SACC (*Truncatella* gen. Nov. et *Pestalopsis* gen. Not.). *Bulletin du Jardin Botanique de l'Etat a Bruxelles*, 19(3): 285-354.
  - Strobel, G.A. 2002. Rainforest endophytes and bioactive products. *Critical Reviews in Biotechnology*, 22: 315-333.
  - Sutton, B.C. 1964. *Phoma* and related genera. *Transactions of the British Mycological Society*, 47: 497-509.
  - Sutton, B.C. 1980. *The Coelomycetes*. Fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. *Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England*, 696p.
  - Swofford, D.L. 2003. PAUP Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
  - Thambugala, K.M., Hyde, K.D., Tanaka, K., Tian, Q., Wanasinghe, D.N., Ariyawansa, H.A., Jayasiri, S.C., Boonmee, S., Camporesi, E., Hashimoto, A. and Hirayama, K. 2015. Towards a natural classification and backbone tree for Lophiostomataceae, Floricolaceae, and Amorosiaceae fam. nov. *Fungal Diversity*, 74(1): 199-266.
  - Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. 1997. The CLUSTAL\_X windows interface: Flexible Strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Research*, 25: 4876-4882.
  - Vannini, A. and Anselmi, N. 1997. Endofitismo e deperimen todello querece: il modello *Hypoxylon mediterraneum*. In: *Atti del V Convegno Annuale SIPaV*. 18-19 Settem bre 1997, Agripolis, Legnaro (Padova), Italy, n 19.
  - Jeewon, R., Liew, E.C. and Hyde, K.D. 2002. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25(3): 378-392.
  - Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16: 11-120.
  - Klein, D. and Eveleigh, D.E. 1998. Ecology of *Trichoderma*. In: Kubicek, C.P. and Harman, G.E. (eds.). *Trichoderma and Gliocladium* Basic biology, taxonomy and genetics. London, UK., 67: 57-74.
  - Larran, S., Monaco, C. and Alippi, H.E. 2001. Endophytic fungi in leaves of *Lycopersicon esculentum* Mill. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 181-184.
  - Larran, S., Perello, A. and Simon, M.R. 2007. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 565-572.
  - Larran, S., Perello, A., Simon, M.R. and Moreno, V. 2002a. Isolation and analysis of endophytic microorganisms in wheat (*Triticum aestivum* L.) leaves. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18: 683-685.
  - Larran, S., Rollan, C., Bruno, Angeles, H., Alippi, H.E. and Urrutia, M.I. 2002b. Endophytic fungi in healthy soybean leaves. *Investigation Agararia: Produccion y Proteccion de Vegetales*, 17: 173-177.
  - Li, H.Y., Wei, D.Q., Shen, M. and Zhou, Z.P. 2012. Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Diversity*, 54(1): 11-18.
  - Linaldeddu, B.T., Sirca, C., Spano, D. and Franceschini, A. 2011. Variation of endophytic cork oak-associated fungal communities in relation to plant health and water stress. *Forest Pathology*, 41(3): 193-201.
  - Lumbsch, H.T. and Huhndorf, S.M. 2007. Outline of Ascomycota-2007. *Myconet*, 13: 1-58.
  - Marvie, M. 2005. *Silviculture*. University of Tehran Press, Tehran, 387p.
  - Millner, P.D., Motta, J.J. and Lentz, P.L. 1977. Ascospores, germ pores, ultrastructure, and thermophilism of *Chaetomium*. *Mycologia*, 26: 720-733.
  - Muthumeenakshi, S. 1996. Molecular taxonomy of the genus *Trichoderma*. Ph.D. thesis, The Queen's University of Belfast, United Kingdom.
  - Nixon, K.C. 2002. The oak (*Quercus*) biodiversity of California and adjacent regions. *New World*, 7: 190-202.
  - Page, R.D. 1996. *Tree View: an application to display*

- Wijayawardene, N.N., Hyde, K.D., Wanasinghe, D.N., Papizadeh, M., Goonasekara, I.D., Camporesi, E., Bhat, D.J., McKenzie, E.H., Phillips, A.J., Diederich, P. and Tanaka, K. 2016. Taxonomy and phylogeny of dematiaceous coelomycetes. *Fungal Diversity*, 77(1): 1-316.
- Wilson, D. 1995. Endophyte-the evolution of a term and clarification of its use and definition. *Oikos*, 73: 274-276.
- Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M. and Crous, P.W. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in mycology*, 75(1): 171-212.
- Zabalgoitia, I. 2008. Fungal endophytes and their interaction with plant pathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research*, 6: 138-146.
- Zhang, Y., Crous, P.W., Schoch, C.L. and Hyde, K.D. 2012. *Pleosporales*. *Fungal Diversity*, 53(1): 1-221.
- Verkley, G.J.M., Dukik, K., Renfurm, R., Göker, M. and Stielow, J.B. 2014. Novel genera and species of coniothyrium - like fungi in Montagnula ceae (Ascomycota). *Persoonia*, 32: 25-51.
- Wang, Y., Pei, Y.F., O'Neill, N.R. and Zhang, X.G. 2010. *Ulocladium cantlosus* sp. nov. isolated from northwestern China: its morphology and molecular phylogenetic position. *Mycologia*, 102(2): 374-383.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A.,elfand D.H, Sninsky J.J, White T.J (eds) *PCR protocols: a guide to methods and application*. Academic, San Diego, 315-322.
- Wijayawardene, N.N., Hyde, K.D., Lumbsch, H.T., Liu, J.K., Maharachchikumbura, S.S., Ekanayaka, A.H., Tian, Q. and Phookamsak, R. 2018. Outline of Ascomycota: 2017. *Fungal Diversity*, 88(1): 167-263.

## The endophytic fungi isolated from oak trees (*Quercus brantii* Lindl and *Quercus infectoria* Oliv.)

A. Hajizadeh<sup>1</sup>, J. Amini<sup>2\*</sup> and J. Abdollahzadeh<sup>1</sup>

1- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran

2\*- Corresponding author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Kurdistan, Iran  
E-mail: jamini@uok.ac.ir

Received: 31.07.2018

Accepted: 13.01.2019

### Abstract

Fungal endophytes are a known part of biodiversity associated with plants. They can colonize all parts of the host plant tissues and play an important role in enhancing plant health. Also, they can compete with the pathogens for the same niches and thereby reduce disease severity in plant. In order to identify endophytic fungi of oak trees, healthy plant samples including twigs, stems and leaves were collected from forest regions of Kurdistan province. Samples were cut into 2-cm-long segments. Then, pieces of samples were surface sterilized in 5% sodium hypochlorite and 70% ethanol and rinsed with sterile water three times. Then, samples blotted dry on sterilized filter paper and were cultured on Potato Dextrose Agar (PDA) medium amended with Doxycycline antibiotic 25 °C. A total number of 75 isolates were obtained. Based on morphological characteristics and ITS- rDNA regions sequence data, seven different fungal species including *Peyronellaea glomerata*, *Truncatella angustata*, *Ulocladium botrytis*, *Microsphaeropsis olivacea*, *Chaetomium subaffine*, *Trichoderma citrinoviride* and *Trichoderma atroviride* were identified as endophytic fungi of oak trees in Kurdistan Province. *Chaetomium subaffine* and *Ulocladium botrytis* were among the fungi showing the highest colonization frequency (CF%) in all the tissues analysed. The number of isolated taxa was greater in the stem and trunk of oak trees respectively than those in the other organs analyzed.

**Key words:** Oak, fungal endophytes, *Truncatella*, *Peyronellaea*.