

## کمک به شناسائی برخی درون‌زی‌های قارچی مرتبط با زیست‌بوم‌های خشن آبادان و اهواز

صدیقه خدادادی پورارپنایی<sup>۱</sup>، مهدی مهربایی کوشکی<sup>۲\*</sup> و رضا فرخی‌نژاد<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشیار قارچ‌شناسی و بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران.

۳- استاد قارچ‌شناسی و بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

\* نویسنده مسئول: mhdmhrb@scu.ac.ir و mhdmhrb@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۹

### چکیده

در این پژوهش، ۲۵ نمونه حاوی ریشه، ساقه و برگ گیاهان فاقد علائم متحمل به شوری و گرما در اطراف آبادان و اهواز، جمع‌آوری و قارچ‌های درون‌زی آن‌ها روی محیط غذائی سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) جداسازی شدند. از بین ۳۵ جدایه بدست آمده، تعداد ۱۱ جدایه براساس ریخت‌شناسی ساختارهای جنسی و غیرجنسی جهت شناسایی مولکولی انتخاب شدند. در ارزیابی مولکولی، هویت جدایه‌های انتخابی با استفاده از توالی ژن‌های ITS-rDNA و GAPDH (برای جدایه‌های *Curvularia*) تعیین گردید. بر اساس ترکیبی از داده‌های ریخت‌شناسی و مولکولی، جدایه‌های انتخابی به شرح ذیل شناسایی و توصیف شدند: *Chaetomium A. phragmospora* *Alternaria chlamydospora*؛ *Fusarium sp.* بر اساس دانش ما، این اولین گزارش از قارچ‌های درون‌زی شناسائی شده ساکن در گونه‌های گیاهی *Atriplex Aeluropus littoralis* *Scirpus maritimus* و *Salicornia subterminalis* *Carthamus oxyacantha lentiformis* می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: درون‌زی‌های قارچی، گیاهان متحمل به شوری، شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی، استان خوزستان.

### مقدمه

زنده می‌شوند. درون‌زی‌ها بدون ایجاد علائم با رشد درون سلولی یا بین‌سلولی در بافت‌های گیاهان عالی زندگی می‌کنند و منابع غنی از ترکیبات زیستی فعال هستند (Liu et al., 2008; Tan and Zou, 2001). حضور درون‌زی‌ها در بافت‌های علفی و چوبی ریشه، ساقه، شاخه، پوست، برگ، دمبرگ، گل، میوه و دانه‌ی بسیاری از گیاهان مشاهده شده است (Surette et al. 2003). تنوع زیستی میکروارگانیزم‌های درون‌زی هم از لحاظ فراوانی و هم از لحاظ تنوع، در میزبان‌های مختلف، متفاوت است و بستگی به موقعیت جغرافیایی رشد میزبان نیز دارد (Gange et al., 2007; Arnold and Herre, 2003).

درون‌زی‌های قارچی اکولوژی گیاهان را از طریق فرایندهایی مثل افزایش ظرفیت گیاهان میزبان جهت بقا و مقاومت در برابر تنش‌های محیطی و بیولوژیکی تحت

درون‌زی‌ها موجودات زنده‌ی ساکن اندام‌های گیاهی است که در بخشی از چرخه‌ی زندگی خود می‌توانند بافت‌های داخلی گیاهان میزبان خود را کلونیزه کنند، بدون اینکه باعث بروز علائم آشکاری در میزبان خود شوند (Petrini, 1991). (Wilson, 1995). درون‌زی‌ها را بصورت قارچ‌ها یا باکتری‌هایی تعریف کرده است که تمام یا بخشی از چرخه‌ی زندگی خود را در حمله به بافت‌های گیاهان زنده تعریف کرده و آلودگی بدون علائم را در داخل بافت‌های گیاهی ایجاد می‌کنند. Bacon and White, (2000) تعریف جامع عامه پسندی را ارائه کرده و عنوان می‌دارند که درون‌زی‌ها میکروبهایی هستند که بافت‌های داخلی و زنده‌ی گیاهان میزبان را بدون هرگونه علائم آشکار کلونیزه می‌کنند که تقریباً شامل همه موجودات زنده ساکن در داخل گیاه

al., 2002; Saikkonen et al., 2004; Rodriguez et al., 2004, 2008, 2009; Kogel et al., 2006; Helander et al., 2006; Novas et al., 2007; Rodriguez and Redman, 2008). بنابراین، شناخت درون‌زی‌های بالقوه ساکن در زیست‌بوم‌های خشن حائز اهمیت است. در این مطالعه نیز با توجه به اینکه تاکنون مطالعات کافی روی درون‌زی‌های ساکن در این گیاهان انجام نگرفته است، سعی شد قارچ‌های درون‌زی همراه با بعضی از گونه‌های گیاهی موجود در بیابان‌ها و تالاب‌های نمکی مناطق فوق‌العاده گرم اطراف آبادان و اهواز، بعنوان یکی از سخت‌ترین اکوسیستم‌ها در جهان، شناسائی شود.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌برداری

طی خردادماه ۱۳۹۵، از بیابان‌ها، تالاب‌ها و زمین‌های مخروطه اطراف اهواز و آبادان (اراضی مجاور جاده اهواز-آبادان) بازدید بعمل آمد. از گونه‌های گیاهی مختلف که علائم بیماری نداشتند، ۲۵ نمونه‌ی کامل حاوی ریشه، ساقه و برگ جمع‌آوری شد. این گیاهان که متحمل به شوری و گرما می‌باشند، شامل گونه‌های *Atriplex* (Gramineae) *Aeluropus littoralis* *Carthamus* (Chenopodiaceae) *lentiformis* *Salicornia subterminalis* (Compositae) *oxyacantha* *Schanginia aegyptiaca* (Chenopodiaceae) *Scirpus maritimus* (Cyperaceae) و یک گیاه شناسائی نشده بودند (شکل‌های ۳ تا ۹). از قسمت‌های ریشه، ساقه و برگ، قطعاتی به اندازه ۱-۰/۵ سانتی‌متر جدا و به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰٪ و دو دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲٪ ضدعفونی سطحی و سپس با آب مقطر سترون سه‌بار شستشو شدند. قطعات گیاهی پس از خشک شدن روی کاغذ صافی سترون به محیط غذایی سیب‌زمینی-دکستروز آگار (PDA)<sup>۱</sup> منتقل و در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس و تاریکی به مدت ۱۰-۵ روز نگهداری شدند (Petrini et al., 1986). با مشاهده پراکنه‌های ظاهر شده روی محیط کشت، از هر تیپ پراکنه بر اساس ظاهر

تاثیر قرار می‌دهند (Ahlholm et al., 2002; Kogel et al., 2006). درون‌زی‌ها نقش مهمی در حفاظت گیاه در برابر حشرات و عوامل بیماری‌زا دارند و همچنین ممکن است مقاومت گیاهان را به بیمارگرها، تنش‌های زنده و غیرزنده افزایش دهند (Ahlholm et al., 2002; Kogel et al., 2006). قارچ‌های درون‌زی نقش فیزیولوژیک و اکولوژیکی مهمی را در زندگی میزبان خود ایفا می‌کنند (Tintjer and Rudger, 2006) و متابولیت‌های ثانویه زیستی با ساختار منحصر بفرد مانند آلکالوئیدها، بنزوپیرانول‌ها، کینون‌ها، اسیدهای فنولی، کوئینون‌ها، استروئیدها، ترپنوئیدها، تترالون‌ها و زانتون‌ها را تولید می‌کنند. درون‌زی‌ها رشد میزبان را با سازوکارهای مختلفی همچون القای مقاومت سیستمیک به بیمارگرها، تثبیت نیتروژن، تولید تنظیم‌کننده‌های رشد، تولید ترکیبات ضد میکروبی و آنزیمی و افزایش جذب آب و مواد معدنی، تحریک می‌کنند (Ryan et al., 2008).

بیابان‌های با خاک شور و اراضی باتلاقی خشک‌شده به علت داشتن نمک زیاد از خشن‌ترین زیست‌بوم‌ها در جهان هستند. در این زیست‌بوم‌ها غنای گونه‌ای و جمعیت گیاهی اغلب محدود شده است (Suryanarayanan et al., 2002; Helander et al., 2006; Novas et al., 2007). یکی از این زیست‌بوم‌ها که در آن گیاهان متحمل به شوری و گرما رشد می‌کنند، زمین‌های باتلاقی خشک اطراف آبادان و اهواز است. در این زیست‌بوم گیاهان محدودی، از جمله *Aeluropus littoralis* (Gouan) *Jagopoides* (L.) Thwaites *Atriplex Alhagi mannifera* Jaub. & Spach Parl. *Carthamus oxyacantha lentiformis* (Torrey) S. Watson *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steud. M. Bieb. *Salicornia Polypogon monspeliensis* (L.) Desf. *Salicornia subterminalis* Parish *europaea* L. *Scirpus Schanginia aegyptiaca* (Hasselq.) Aellen و *Suaeda aegyptiaca* (Hasselq.) Zohary *maritimus* L. *Dinarvand and S. fruticose* Forssk. رشد می‌کنند (Sharifi, 2008). این باور وجود دارد که بخشی از سازگاری این گونه‌ها با این زیست‌بوم‌های تحت تنش ناشی از حضور درون‌زی‌ها در آن‌ها می‌باشد (Stone et al., 2000; Omacini et al., 2001; Suryanarayanan et

<sup>1</sup>Potato Dextrose Agar

اختصاصی *gpd1* و *gpd2* (Berbee et al., 1999) تکثیر شد. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز محتوی مواد ذیل بود: ۵ میکرولیتر بافر 10x Taq buffer، ۴ میکرولیتر  $MgCl_2$  (25mM)، ۲ میکرولیتر آغازگر مستقیم (10 $\mu$ m)، ۲ میکرولیتر آغازگر معکوس (10 $\mu$ m)، ۲ میکرولیتر از مخلوط dNTP (2.5 $\mu$ m each)، ۰/۶ میکرولیتر آنزیم Taq DNA Polymerase (5u/ $\mu$ l) (GenBio، کره جنوبی)، ۲/۵ میکرولیتر DNA الگو (حدود ۵۰۰ نانوگرم) و آب مقطر دوبار تقطیر شده میلی‌کیو تا حجم ۵۰ میکرولیتر. برنامه حرارتی واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز شامل یک مرحله‌ی واسرشته‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس به مدت سه دقیقه، ۳۵ چرخه تکراری (شامل یک مرحله‌ی ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس، ۳۰ ثانیه‌ای در دمای ۵۱-۵۶ درجه‌ی سلسیوس برای ITS و ۵۶ درجه‌ی سلسیوس برای GAPDH و ۹۰ ثانیه‌ای در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس) و یک مرحله‌ی طولیل شدن نهائی در ۷۲ درجه‌ی سلسیوس به مدت پنج دقیقه در دستگاه ترموسیکلر (مدل MJ Mini<sup>TM</sup> Gradient Thermal Cycler) انجام شد.

#### توالی‌یابی و تجزیه و تحلیل توالی‌ها

پس از انجام الکتروفورز، باندهای هدف استخراج و قطعات تکثیری با استفاده از کیت تجاری Vivantis GF- 1 Gel DNA Recovery Kit و منطبق با دستورالعمل ارائه شده خالص‌سازی شد. توالی‌یابی با استفاده از آغازگرهای مورد استفاده در تکثیر توسط شرکت ماکروژن (کره جنوبی) انجام شد. از نرم‌افزارهای DNABaser ver 4.0.6.2 (Hall, 1999)، BioEdit ver 3.5.0 (www.DnaBaser.com) و MEGA ver 6.0 (Tamura et al., 2013) برای تجزیه و تحلیل توالی، تلفیق خوانش‌های نوکلئوتیدی پیشرو و معکوس و بررسی‌های فیلوژنی استفاده گردید. توالی‌های حاصله در بانک ژن با استفاده از الگوریتم BLASTn جستجو شدند و نزدیکترین سویه‌های شناخته شده با جدایه‌های مورد بررسی بدست آمد. تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مبتنی بر ITS برای همه جدایه‌ها و ITS-GAPDH برای جدایه‌های *Curvularia* با استفاده از الگوریتم درست‌نمائی بیشینه

پرگنه و مشاهده سطحی ساختارهای قارچی (کنیدیوفورها، سلول‌های کنیدیوم‌زایی و کنیدیوم‌ها)، یک جدایه انتخاب و به محیط جدید مایه‌زنی شدند.

#### خالص‌سازی و بررسی‌های ریخت‌شناسی

خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک‌اسپور انجام شد (Ainsworth, 1971; Babaahmadi et al., 2018). ریخت‌شناسی و ریخت‌سنجی قارچ‌های رشدیافته روی PDA، شامل ساختارهای جنسی و غیرجنسی (حداقل ۵۰ عدد کلأمیدوسپور، کنیدیوم، کنیدیوفور و آسکوسپور) با استفاده از عدسی شیئی 40x و 100x میکروسکوپ نوری مدل Leitz wetzlar, SM-LUX انجام شد. تصاویر ساختارهای مختلف قارچی با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل OLYMPUS BX51 متصل به یک دوربین دیجیتال (OLYMPUS DP12) بدست آمد.

#### استخراج DNA و تکثیر نواحی ژنی

استخراج DNA به روش ریدر و برودا (Raeder and Broda, 1985) با کمی تغییر (Ahmadpour et al, 2017) انجام شد. جدایه‌های قارچی به محیط مایع سیب‌زمینی - دکستروز (PDB) مایه‌زنی و در شرایط مناسب رشدی، به مدت یک تا دو هفته در شرایط دمائی ۲۸ درجه‌ی سلسیوس و با سرعت ۱۲۰ تکان در دقیقه، از آن‌ها زیست‌توده میسیلیومی تهیه شد. زیست‌توده میسیلیومی با فیلتراسیون روی کاغذ صافی و شستشو با آب مقطر سترون جمع‌آوری و در فریزدرایر خشک-انجمادی (Freeze-Dryer, Alpha 1-2LD Plus, Christ) شده‌ی حاصله در ازت مایع پودر و در داخل لوله‌های فالكون مسدود شده (پارافیلیم شده) تا زمان استخراج DNA در دمای ۲۰- درجه‌ی سلسیوس نگهداری شد. در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز<sup>۱</sup> ناحیه‌ی ITS دی‌ان‌ای ریبوزومی و 28S-D1/D2 برای تمام جدایه‌ها با استفاده از جفت‌آغازگر عمومی ITS1 و NL4 (White et al., 1990) تکثیر شد. برای جدایه‌های *Curvularia* ناحیه‌ی GAPDH<sup>۲</sup> با جفت‌آغازگر

<sup>۱</sup> Polymerase chain reaction

<sup>۲</sup> Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase

*Curvularia*، *Chaetomium olivaceum*، *A.phragmospora*، *Fusarium Chlamydosporum*، *Curvularia* sp. *ahvazensis* و *Fusarium* sp. بعنوان قارچ‌های درون‌زی بدست آمده از گیاهان متحمل به شوری، ارائه شدند. توالی‌های بدست آمده در بانک ژن ثبت گردیدند (جدول ۱) و با انجام جستجوی BLASTn، میزان شباهت توالی‌های ITS و GAPDH آن‌ها با سویه‌های شناخته شده آشکار شد. برای تشخیص گونه‌ها، علاوه بر ریخت‌شناسی، از یک تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی مبتنی بر ناحیه‌ی ژنومی ITS (شکل ۱) و ترکیب دو ناحیه‌ی ITS و GAPDH برای جدایه‌های *Curvularia* (شکل ۲) استفاده شد. درختان فیلوژنتیکی تک‌ژنی و دوژنی با استفاده از الگوریتم درست‌نمائی بیشینه ترسیم شدند و جداسازی فیلوژنتیکی جدایه‌ها با نزدیک‌ترین گونه‌های خویشاوند تجزیه و تحلیل شدند. توالی‌های ناحیه‌ی 28S-D1/D2 به علت حفاظت‌شوندگی بالا در جستجوی BLASTn و رسم درخت فیلوژنتیکی وارد نشدند (جدول ۱). جزئیات بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی ذیل هر گونه آورده شده است.

MEGA ver با کمک نرم‌افزار (maximum likelihood) با کمک نرم‌افزار 6.0 انجام شد. تلفیق توالی‌های دو ناحیه‌ی ITS و GAPDH با کمک نرم‌افزار BioEdit ver 4.0.6.2 انجام شد و شکاف‌ها (Gaps) بعنوان اطلاعات گم‌شده در نظر گرفته شد. انتخاب مدل تکاملی با استفاده از الگوریتم ML Model Test در همین نرم‌افزار انجام شد. برای کشف ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی، از سویه‌های شناخته شده‌ی (برای گونه‌های *Curvularia*، *Chytriumyces*، *hyalinus* و *Curvularia shahidehamranensis* به عنوان آرایه‌های خارج از گروه به ترتیب برای درختان تک‌ژنی و دوژنی استفاده شدند.

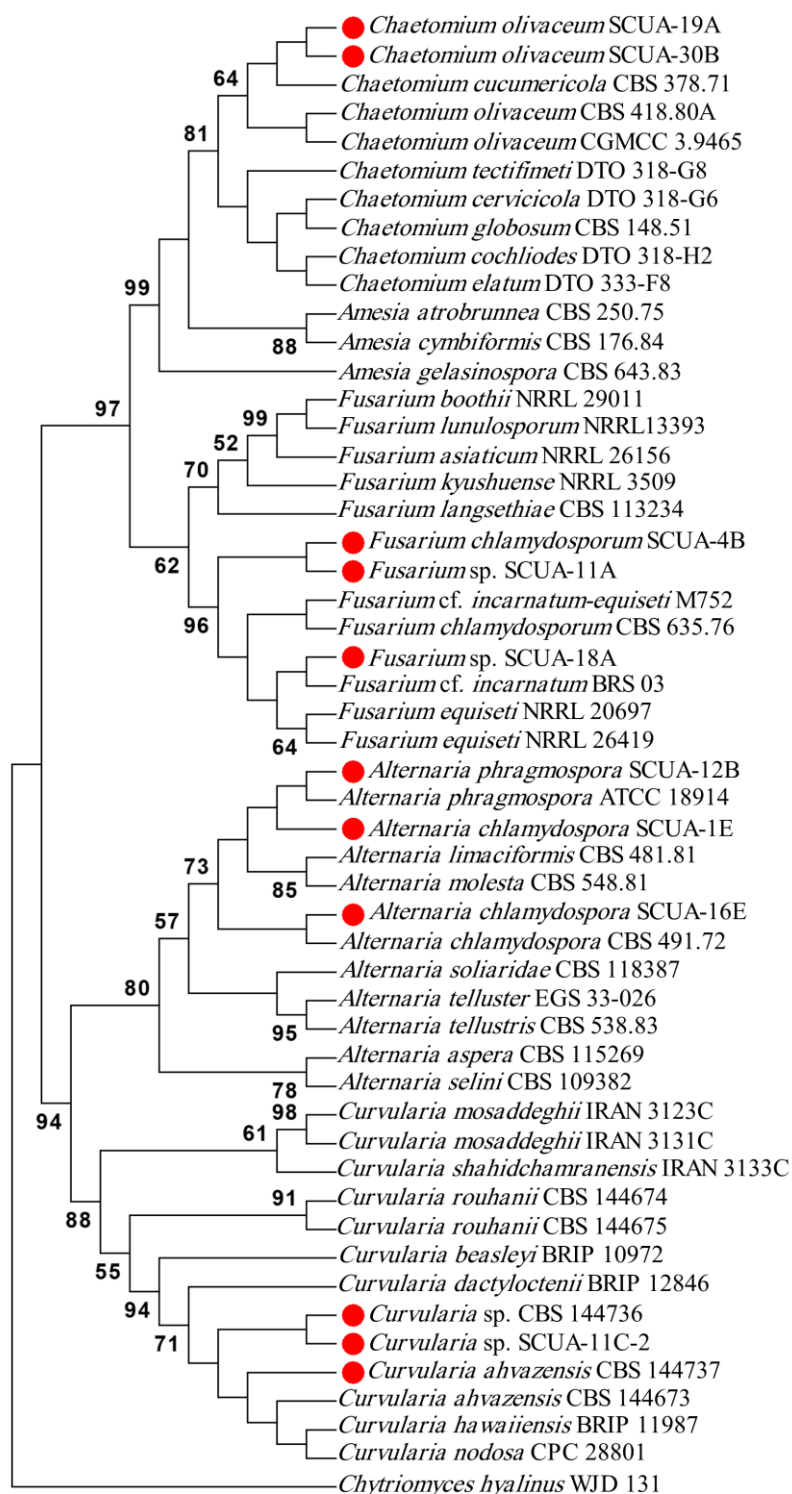
### نتایج

در این پژوهش، ۳۵ جدایه‌ی قارچی بدست آمد که از بین آنها ۱۱ جدایه بر اساس ریخت‌شناسی ساختارهای جنسی و غیرجنسی، برای بررسی‌های مولکولی انتخاب شدند. ریخت‌شناسی ۱۱ جدایه‌ی قارچی از گونه‌های *Alternaria chlamydospora*

جدول ۱- شماره‌ی دسترسی توالی‌ها مربوط به جدایه‌های مورد بررسی در بانک ژن NCBI

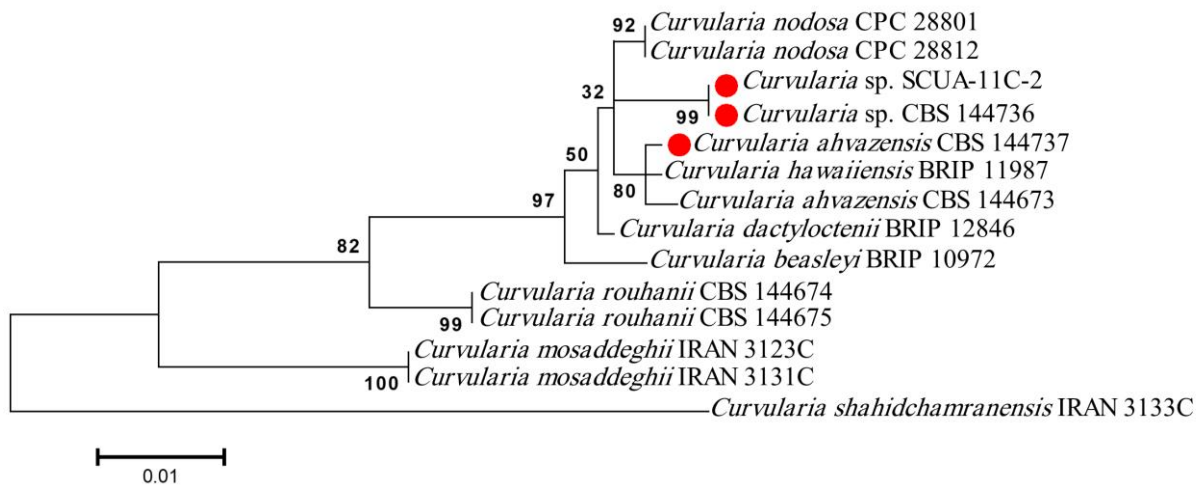
**Table 1. Accession numbers of the sequences in GenBank (NCBI) belonging to isolates under survey.**

| Species (نام گونه)              | Isolates (نام جدایه)             | Accession numbers of the sequences in GenBank (شماره دسترسی توالی‌ها در بانک ژن) |           |           |
|---------------------------------|----------------------------------|--|-----------|-----------|
|                                 |                                  | ITS1   | 28S-D1/D2 | GAPDH     |
| <i>Alternaria chlamydospora</i> | SCUA-1E                          | MH715161   | MH715228  | -         |
| <i>A. chlamydospora</i>         | SCUA-16E                         | MH715165   | MH715233  | -         |
| <i>A. phragmospora</i>          | SCUA-12B                         | MH715164   | MH715232  | -         |
| <i>Curvularia ahvazensis</i>    | CBS 144737; IRAN 3134C; SCUA-2C  | MH688042   | MH715229  | MH6888041 |
| <i>Curvularia</i> sp.           | SCUA-11C-2                       | MH688046   | -         | MH688045  |
| <i>Curvularia</i> sp.           | CBS 144736; IRAN 3135C; SCUA-11C | MH688044   | -         | MH688043  |
| <i>Fusarium chlamydosporum</i>  | SCUA-4B                          | MH715162   | MH715230  | -         |
| <i>Fusarium</i> sp.             | SCUA-11A                         | MH715163   | MH715231  | -         |
| <i>Fusarium</i> sp.             | SCUA-18A                         | MH715166   | MH715234  | -         |
| <i>Chaetomium olivaceum</i>     | SCUA-19A                         | MH715171   | MH715236  | -         |
| <i>C. olivaceum</i>             | SCUA-30B                         | MH715172   | MH715237  | -         |



شکل ۱ - درخت تک‌ژنی بر اساس توالی ITS (بدون مقیاس) با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه و مدل K2+G ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی (دایره توپر قرمز) فقط با گونه‌های نزدیک آن نشان داده شده است. ارزش بوت‌استرپ زیر ۵۰٪ حذف شده است. درخت با استفاده از سویه‌ی *Chytriumyces hyalinus* WJD 131 ریشه‌دار شده است.

**Figure 1.** Single-locus tree based on ITS sequence (scale free) obtained from a maximum likelihood analysis under K2+G model. Phylogenetic relation of the isolates under survey (red-color filled circle) is shown with their closely related species. Bootstrap values lower than 50% have been deleted. The tree was rooted with *Chytriumyces hyalinus* WJD 131.



شکل ۲-درخت دوژنی بر اساس توالی نواحی ژنی ITS- و GAPDH جدایه‌های مورد مطالعه و انتخاب شده‌ی *Curvularia* ترسیم شده با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه و مدل K2+G. ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های مورد بررسی (دایره توپر قرمز) فقط با گونه‌های نزدیک آن نشان داده شده است. ارزش بوت‌استرپ زیر ۵۰٪ حذف شده است. درخت با استفاده از سویه‌ی *Curvularia shahidchamranensis* IRAN 3133C ریشه‌دار شده است.

**Figure 2.** Two-locus tree based on ITS and GAPDH sequences of *Curvularia* isolates under study and selected from GenBank, constructed from a maximum likelihood analysis under K2+G model. Phylogenetic relation of the isolates under survey (red-color filled circles) is only shown with their closely related species. Bootstrap values lower than 50% have been deleted. The tree was rooted with *Curvularia shahidchamranensis* IRAN 3133C.

و ۶-۲ سلولی است. طول و عرض آن‌ها،  $۷/۸-۵ \times ۳۰-۱۶$  میکرومتر می‌باشد.

نتایج حاصل از جستجوی BLASTn جدایه‌ی *Curvularia ahvazensis* CBS 144737 توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته شده از گونه‌های *Curvularia ahvazensis* (Acc. no. HE792913) *C. hawaiiensis* (KX139029) (Acc. no. NR\_154865) *C. nodosa*، *beasleyi* (Acc. no. NR\_158442) به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰، ۹۹ و ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. بر اساس توالی نوکلئوتیدی ناحیه‌ی GAPDH، بیشترین شباهت این جدایه با یک سویه شناخته شده از گونه‌ی *Curvularia ahvazensis* (Acc. no. MG428693) با ۹۹ درصد شناسائی بود. در درخت دوژنی ترسیمی مبتنی بر نواحی ترکیبی ITS و GAPDH (شکل ۲)، این جدایه با سویه‌های شناخته شده از گونه‌های *Curvularia ahvazensis* و *C. hawaiiensis* خوشه‌بندی شد و یک

- بررسی ریخت‌شناسی و مولکولی گونه‌های شناسایی شده

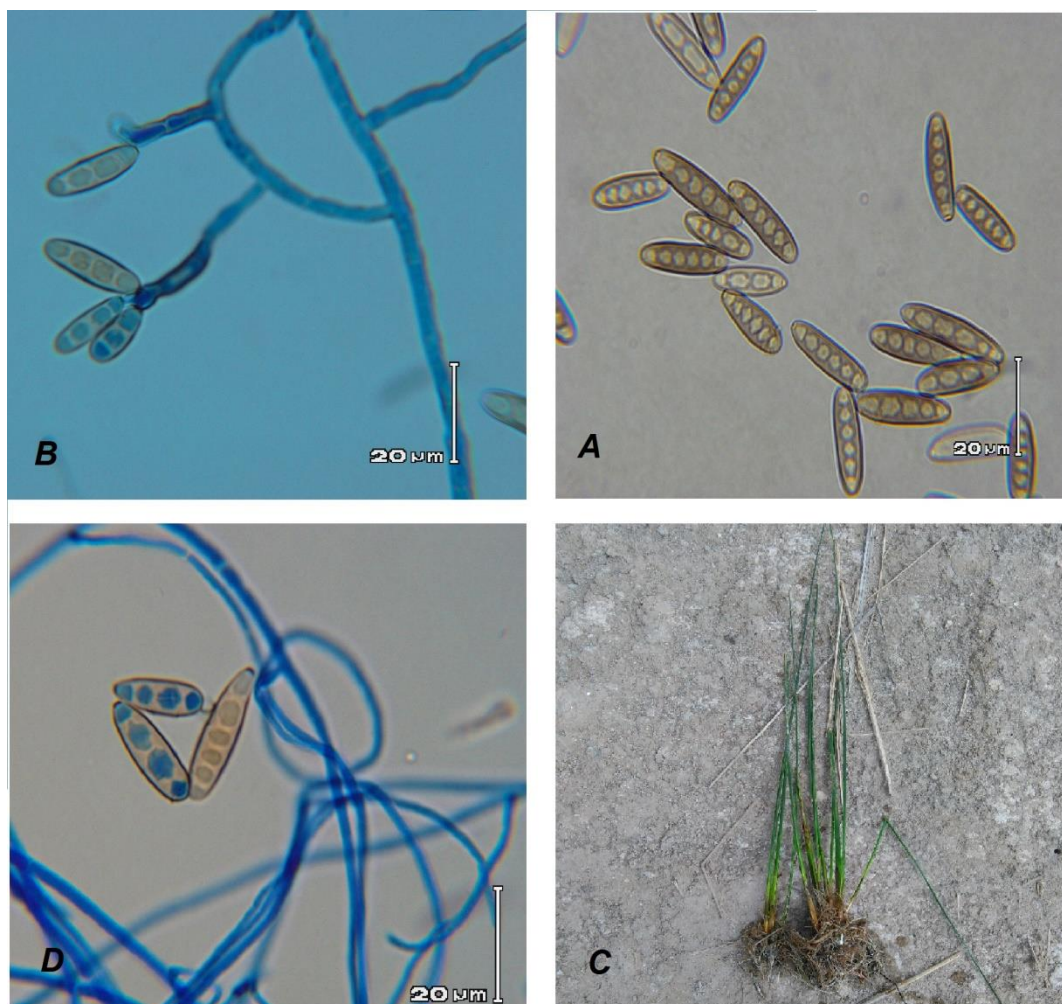
۱- گونه‌ی *Curvularia ahvazensis* Mehr.- Koushk. & Babaahm., Mycosphere 9 (6): 1175 (2018) (شکل ۳)

یک جدایه از این گونه با نام *Curvularia ahvazensis* CBS 144737 از برگ گیاه متحمل به شوری (*Scirpus maritimus*) (شکل ۳)، جمع‌آوری شده از باتلاق‌های نمکی اطراف شادگان، بدست آمد.

در مراحل اولیه‌ی رشد، رنگ پرگنه از سطح رویی تشک‌های پتری سبز تیره با حاشیه روشن و از سطح پشتی تشک پتری سیاه رنگ است. ریشه‌ها منشعب و به صورت سطحی یا فرورفته در محیط غذایی رشد می‌کنند و قطر آن‌ها  $۱/۷-۳/۸$  میکرومتر است. کنیدیوفورها قهوه‌ای رنگ بوده و طول و قطر آن‌ها  $۲/۵-۴/۸-۸۷$  میکرومتر می‌باشد. کنیدیوم‌ها قهوه‌ای رنگ، دوکی شکل

گونه‌های نزدیک *Curvularia beasleyi*، *C. hawaiiensis* و *C. nodosa dactyloctenii* همراه شد و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ ۹۴ درصد ایجاد کرد.

کلاد با ارزش بوت‌استرپ ۸۰ درصد ایجاد کرد. در درخت تک‌زنی مبتنی بر ناحیه‌ی ITS (شکل ۱)، این جدایه با *Curvularia ahvazensis* و سویه‌های شناخته شده از



شکل ۳- ریخت‌شناسی گونه‌ی *Curvularia ahvazensis* (جدایه‌ی CBS 144737). A، B و D) کنیدیوفورها، سلول‌های کنیدیوم‌زایی و کنیدیوم‌ها. C) گیاه میزبان (*Scirpus maritimus*).

**Figure 3.** *Curvularia ahvazensis* (CBS 144737): A, B and D) Conidiophores, conidiogeneous cells and conidia. C) Host (*Scirpus maritimus*).

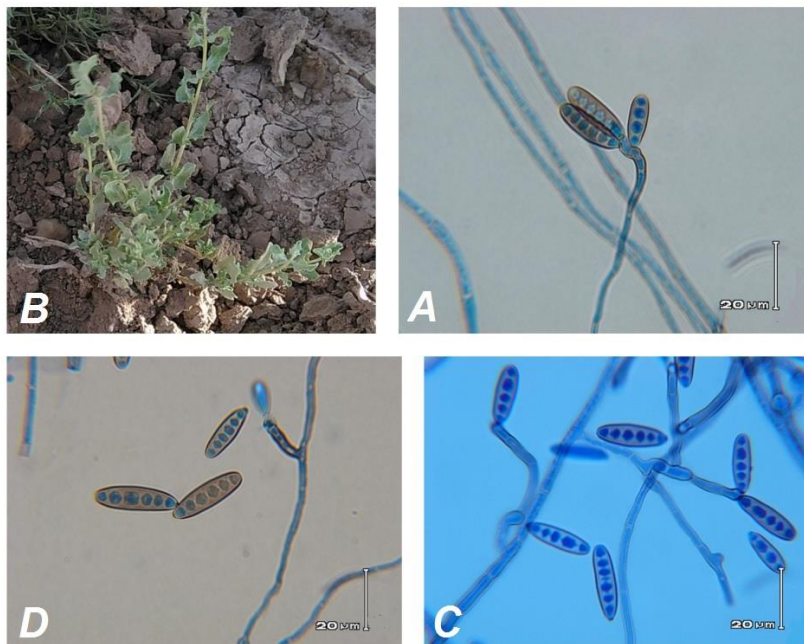
پرگنه‌ها پس از شش روز نگهداری در ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد در حدود ۷۵-۸۰ میلی‌متر رشد قطری داشتند. رنگ پرگنه سیاه متمایل به سبز است. ریشه‌های هوایی به فراوانی دیده می‌شود. ریشه‌ها نیمه‌روشن تا قهوه‌ای روشن، منشعب، دارای دیواره‌ی عرضی، دیواره‌ی صاف و کم‌قطر و قطر آن تا ۴/۳ میکرون می‌باشد. کنیدیوفورها به طور جداگانه ظاهر می‌شوند و

۲- گونه‌ی *Curvularia* sp. (شکل ۴)

دو جدایه‌ی CBS 144736 *Curvularia* sp. و SCUA-11C-2 *Curvularia* sp. در استان خوزستان، منطقه‌ی کوزریا جداسازی شد. این گونه به عنوان درون‌زی از گیاه متحمل در برابر شوری (*Atriplex lentiformis*) بدست آمد (شکل ۴).

می‌باشد. ناف مشخص و بیرون‌زده، ضخیم و تیره و عرض آن ۲-۲/۲ میکرومتر است. مقایسه‌ی توالی ITS این قارچ با استفاده از الگوریتم جستجوی BLASTn نشان داد که جدایه‌های این گونه با سویه‌های تیپ مربوط به گونه‌های *C. beasleyi*, (Acc. no. NR\_154865) *C. nodosa* (Acc. no. ) *C. hawaiiensis* و (Acc. no. NR\_158442) HE792910)، ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارند. در آنالیز جستجوی BLASTn بر اساس ناحیه‌ی *GAPDH*، این قارچ با گونه‌های *C. Beasleyi* (Acc. no. ) *C. dactyloctenii*, (MH433638) (Acc. no. KJ415401) *C. nodosa* (Acc. no. MF490838) *C. hawaiiensis*, (Acc. no. ) *C. buchloes* و (Acc. no. KJ415399) KM061789)، ۹۸-۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی نشان دادند. در درخت فیلوژنتیکی دوژنی ترسیمی مبتنی بر توالی ITS و *GAPDH* (شکل ۲)، هر دو جدایه‌ی مورد بررسی یک کلاد معتبر با ارزش بوت‌استرپ ۹۹ درصد متفاوت از سایر گونه‌های نزدیک شناخته شده ایجاد کردند.

دارای دیواره‌ی عرضی است؛ رنگ آن‌ها قهوه‌ای و در قسمت بالایی تیره‌تر است؛ قطر قسمت‌های پایه و میانی تقریباً برابر است اما در قسمت فوقانی پهن‌تر است؛ دیواره‌های سلولی صاف و ضخیم‌تر از ریشه‌های رویشی هستند و اندازه‌ی کنیدیوفورها  $(۶/۸) - (۵/۴) \times ۲/۲$  (۱۰۸-۹۹) میکرومتر، بازه‌ی اطمینان ۹۵٪ اندازه‌ها  $۴/۲ - ۳/۴ \times ۶۸/۱ - ۴۶/۳$  میکرومتر و میانگین با انحراف معیار  $۳۲/۱ \pm ۵۷/۲ \times ۳/۸ \pm ۱/۲$  میکرومتر است. سلول‌های کنیدیوم‌زائی تلفیق‌شده، ناصاف و دارای گره‌های بسیار ریز برجسته، انتهائی یا میانی؛ به روش زیگزاک یا سیمپودیال تولید کنیدیوم می‌کند؛ محل اتصال کنیدیوم‌ها ضخیم و تیره‌تر است و رنگ آن‌ها قهوه‌ای و نیمه‌استوانه‌ای تا کمی متورم است. کنیدیوم‌ها دارای دیواره‌ی صاف، بیضوی تا دوکی‌شکل، مستقیم، ۳-۵ دیواره‌ی عرضی، در انتها گرد هستند و جوانه‌زنی دوقطبی است؛ اندازه‌ی آن‌ها  $(۸/۶) - (۷/۶) \times ۴/۳$  (۳۱-) ۲۸-۹) میکرومتر، بازه اطمینان ۹۵ درصد اندازه‌ها  $۱۹/۱ - ۲/۲۲ \times ۵/۸ - ۶$  میکرومتر و میانگین آن‌ها با انحراف معیار  $۵/۸ \pm ۶/۱ \times ۷/۲۰ \pm ۱/۱$  میکرومتر



شکل ۴- ریخت‌شناسی گونه‌ی *Curvularia* sp. (جدایه CBS 144736). A، C و D) کنیدیوفورها، سلول‌های کنیدیوم‌زائی و کنیدیوم‌ها. B) گیاه میزبان (*Atriplex lentiformis*).

**Figure 4. *Curvularia* sp. (CBS 144736): A, C and D) Conidiophores, conidiogenous cells and conidia. B) Host (*Atriplex lentiformis*).**

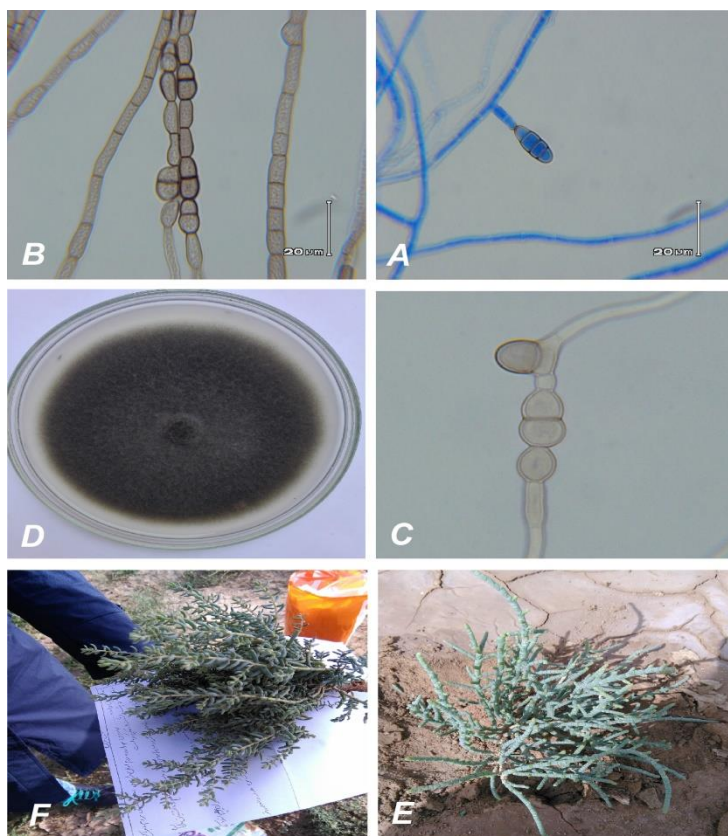


دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۲/۸ سانتی‌متر است. اندازه طول و عرض کنیدیوم‌ها ۱۱-۶ × ۲۷-۱۷/۲ میکرومتر است.

نتایج حاصل از جستجوی BLASTn این جدایه نشان داد که توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته شده *A.chlamydospora* (از جمله *Schangania aegyptiaca subterminalis*) (Acc. no. *A.chlamydospora* CBS 491.72 MH860542) ۱۰۰٪ شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی مبتنی بر ناحیه‌ی ITS (شکل ۱)، این جدایه با سویه‌های شناخته شده‌ی *A.chlamydospora*، *A.phragmospora* و چند گونه‌ی دیگر خویشاوند همراه شد و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ ۷۳ درصد ایجاد کرد.

۳- گونه‌ی *Alternaria chlamydospora* Mouch., *Mycopathologia et Mycologia Applicata* 50 (3): 217 (1973) (شکل ۵)

دو جدایه‌ی *A. chlamydospora* SCUA-1E و *A. chlamydospora* SCUA-16E از برگ و ساقه سالم دو گیاه فاقد علائم متحمل به گرما و شوری (*Salicornia*) جمع‌آوری شده از شهرستان آبادان، جداسازی شد (شکل ۵). در مراحل اولیه‌ی رشد، رنگ پرگنه از سطح پشتی تشنگ‌های پتری مایل به سیاه و در سطح رویی سبز - رنگ است و به تدریج رنگ پرگنه در مرکز آن نسبت به حاشیه‌ها تیره تر می‌شود. ریشه‌ها به صورت کرکی رشد کرده و قطر آن‌ها ۵/۴-۱/۸۳ میکرومتری باشد. رشد پرگنه آهسته بوده و پس از گذشت پنج روز، در



شکل ۵- ریخت‌شناسی گونه‌ی *Alternaria chlamydospora* (جدایه‌ی SCUA-1E). (A) کنیدیوم. (B و C) تورم ریشه و کلایدوسپورها. (D) پرگنه در سطح رویی PDA (E و F) گیاهان میزبان (*Salicornia subterminalis* و *Schangania aegyptiaca*).

Figure 5. *Alternaria chlamydospora* (SCUA-1E): A) Conidia. B and C) Hyphal swelling and chlamydospores. D) Colony on PDA (top). E and F) Hosts (*Salicornia subterminalis* and *Schangania aegyptiaca*).

شناخته شده‌ی *A.phragmospora* ATCC 18914 (Acc. no. NR\_135960)، ۱۰۰٪ شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی مبتنی بر ناحیه‌ی ITS (شکل ۱)، این جدایه با سویه‌ی شناخته شده از گونه‌ی *A.phragmospora* (ATCC 18914) و چندین گونه‌ی خویشاوند (از جمله *A.chlamydospora*) خوشه‌بندی شد و یک کلاد با ارزش بوتاستراپ ۷۳ درصد ایجاد کرد.



شکل ۶- گیاه میزبان *Alternaria phragmospora* SCUA-12B

Figure 6. Host of *Alternaria phragmospora* SCUA-12B

ریسه‌ها ۳/۷-۱/۵ میکرومتر می‌باشد. سلول‌های کنیدیوم‌زایی انتهایی است. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn این جدایه نشان داد که توالی ITS آن با سویه شناخته شده‌ی *F. chlamydosporum* CBS 635.76 (Acc. no. MH861016)، ۹۹٪ شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت ترسیمی مبتنی بر ناحیه‌ی ITS (شکل ۵-۹)، این جدایه با سویه‌های شناخته شده از این گونه *F. chlamydosporum* CBS635.76) و گونه‌های نزدیک *Fusarium* cf. *Fusarium* cf. *incarnatum* و *incarnatum-equiseti* همراه شد و یک کلاد با ارزش بوتاستراپ ۹۶ درصد ایجاد کرد (شکل ۱).

۴- گونه‌ی *Alternaria phragmospora* Emden, Acta Botanica Neerlandica 19: 393 (1970)

جدایه‌ی *Alternaria phragmospora*-SCUA-12B

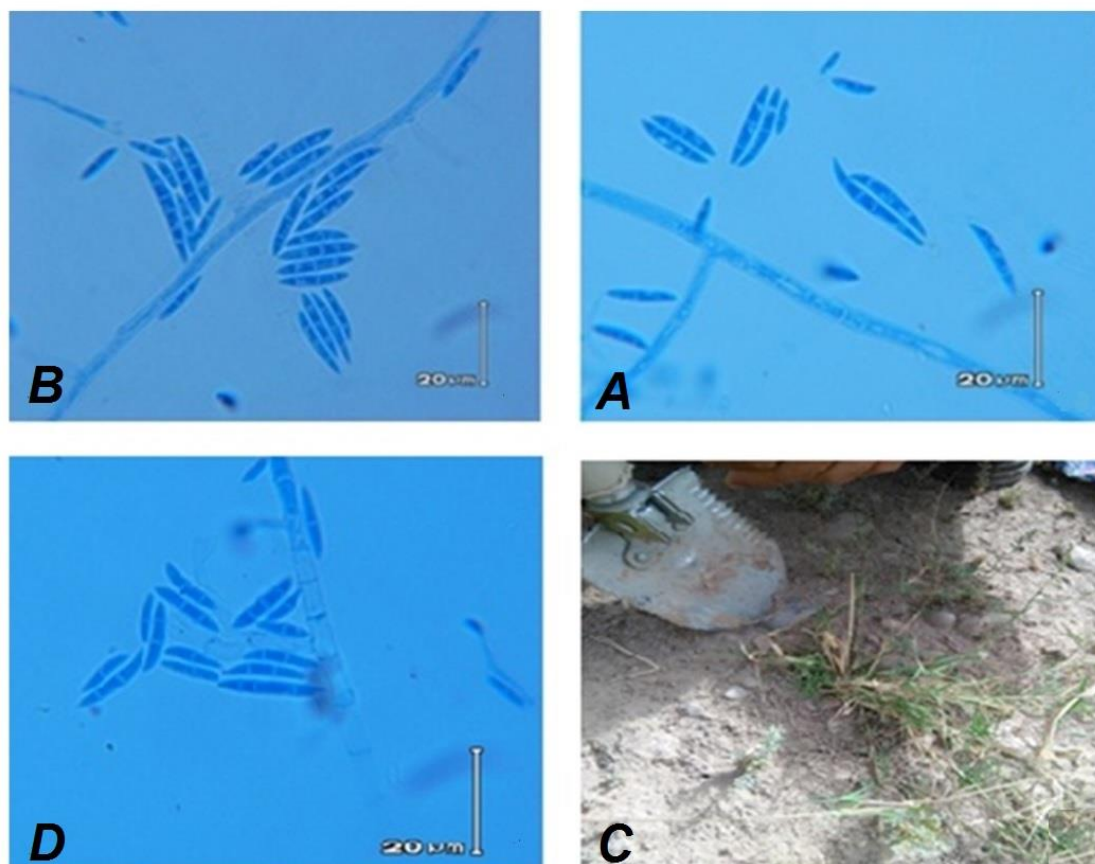
از ساقه‌ی سالم گیاه متحمل به گرما و شوری و بدون علائم جمع‌آوری شده از اطراف آبادان، جداسازی شد (شکل ۶).

در مراحل اولیه‌ی رشد، رنگ پرگنه سبز روشن بوده و به تدریج تیره‌تر می‌شود. رشد ریسه‌ها به صورت کرکی است. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn این جدایه نشان داد که توالی ITS این جدایه با سویه‌ی

۵- گونه‌ی *Fusarium chlamydosporum* Wollenw. & Reinking, Phytopathology 15 (3): 156 (1925) (شکل ۷)

یک جدایه از این گونه با نام *F. chlamydosporum* SCUA-4B از برگ سالم یک گیاه متحمل به گرما و شوری (*Aeluropus littoralis*)، جمع‌آوری شده از بیابان‌های اطراف آبادان، جداسازی شد (شکل ۷).

رشد ریسه حالت هوایی داشته و رنگ پرگنه سفید و پس از گذشت چند روز متمایل به نارنجی می‌شود. رشد ریسه‌ها در شرایط دمایی ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد پس از گذشت پنج روز حدود ۲۱ میلی‌متر است. میکروکنیدیوم‌ها دو سلولی و ماکروکنیدیوم‌ها داسی شکل، خمیده و چند سلولی می‌باشند. اندازه‌ی طول ماکروکنیدیوم‌ها ۲/۹-۴/۲ × ۱۸-۳۳/۵ میکرومتر، اندازه میکروکنیدیوم‌ها ۲-۳/۷ × ۷-۱۴ میکرومتر و قطر



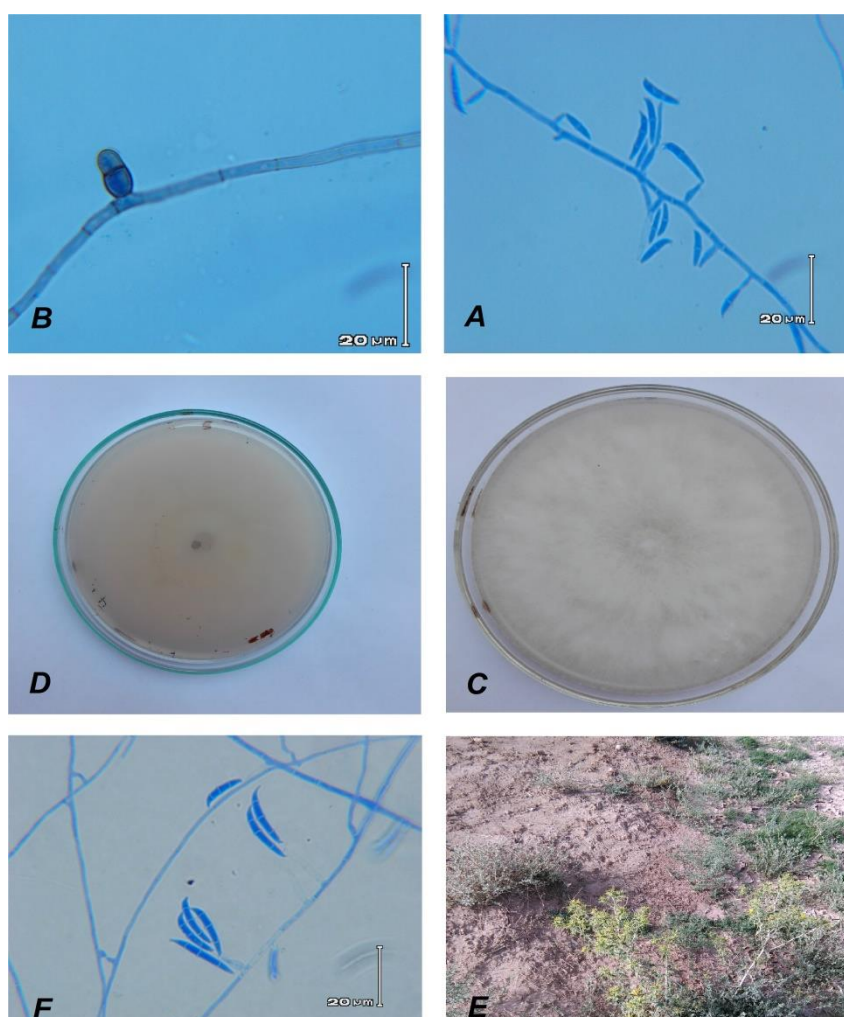
شکل ۷- ریخت‌شناسی گونه‌ی *Fusarium chlamydosporum* (جدایه‌ی SCUA-4B). A، B و D) ماکروکنیدیوم‌ها. C) گیاه میزبان (*Aeluropus littoralis*)

Figure 7. *Fusarium chlamydosporum* (SCUA-4B): A, B and D) Macroconidia. C) Host (*Aeluropus littoralis*).

نتایج حاصل از جستجوی BLASTn این دو جدایه نشان داد که توالی ITS آن‌ها با سویه‌های شناخته شده‌ی *F. equiseti* NRRL 26419 (Acc. no. NR\_121457) و *F. chlamydosporum* var. *fuscum* CBS (Acc. no. MH861016) 635.76٪ شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی درست‌نمایی بیشینه ترسیم شده مبتنی بر ناحیه‌ی ITS (شکل ۱)، دو جدایه‌ی مورد بررسی با سویه‌های شناخته‌شده از گونه‌های خویشاوند *Fusarium* *F. chlamydosporum* و *Fusarium* cf. *incarnatum-equiseti* cf. *incarnatum* همراه شدند و یک کلاد با ارزش ۹۶ درصد ایجاد کردند.

#### ۶- گونه‌ی *Fusarium* sp. (شکل ۸)

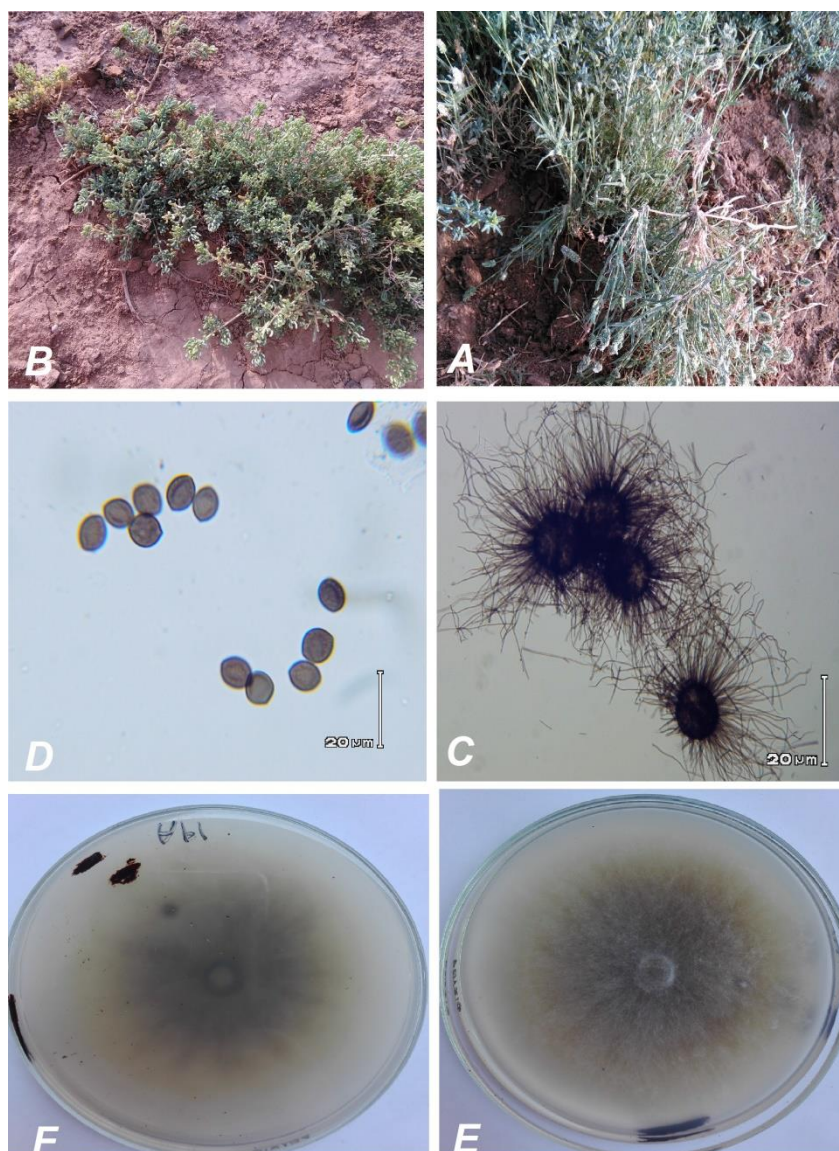
دو جدایه‌ی SCUA-18A *Fusarium* sp. و SCUA-11A *Fusarium* sp. از دو گیاه متحمل به شوری در آبادان (*Schanginia aegyptiaca* و *Carthamus oxyacantha*) جداسازی شدند (شکل ۸). رشد ریشه حالت کرکی و رشد هوایی داشته و رنگ پرگنه سفید است. رشد ریشه‌ها در شرایط دمایی ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد پس از گذشت شش روز حدود ۳۶ میلی‌متر است. میکروکنیدیوم‌ها ۲-۳ سلولی و ماکروکنیدیوم‌ها داسی شکل، خمیده و ۳-۶ سلولی می‌باشند. اندازه‌ی ماکروکنیدیوم‌ها ۲/۲-۳ × ۱۶/۵-۳۰/۵ میکرومتر و میکروکنیدیوم‌ها ۱/۷-۲/۳ × ۸-۱۳ میکرومتر هستند. سلول‌های کنیدیوم‌زایی انتهایی است.



شکل ۸- ریخت‌شناسی گونه‌ی *Fusarium sp.* (جدایه‌ی SCUA-18A). A، B و F) کنیدیوفورها، سلول‌های کنیدیوم‌زائی و کنیدیوم‌ها. C و D) سطح رویی و پشتی پرگنه روی PDA. E) گیاهان میزبان (*Carthamus oxyacantha*).  
**Figure 8.** *Fusarium sp.* (SCUA-18A): A, B and F) Conidiophores, conidiogenous cells and conidia. C and D) Colony on PDA (top and reverse). E) Host (*Carthamus oxyacantha*).

می‌باشد. آسکوسپورها قهوه‌ای زیتونی، لیموئی‌شکل و اندازه‌ی آن  $9-12 \times 2-5$  میکرومتر است. نتایج حاصل از جستجوی BLASTn این جدایه نشان داد که توالی ITS آن با سویه‌ی تیپ *C. cucumericola* CBS 378.71 (Acc. no. NR\_144858)، ۱۰۰٪ شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی درست‌نمائی بیشینه ترسیم شده مبتنی بر ناحیه‌ی ITS (شکل ۹)، دو جدایه‌ی مورد بررسی با گونه‌ی *C. cucumericola* و *C. olivaceum* خوشه‌بندی شده و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ ۶۴ درصد ایجاد کردند.

۷- گونه‌ی *Chaetomium olivaceum* (شکل ۹) دو جدایه SCUA-30B *C. olivaceum* و SCUA-19A *C. olivaceum* از گیاهان خاک‌های شور مناطق بیابانی آبادان (*Schanginia aegyptiaca* و *Aeluropus littoralis*) جداسازی شدند (شکل ۹). رنگ پرگنه کرمی مایل به زرد روشن بوده و در سطح پشتی تیره‌تر است. قطر پرگنه در شرایط دمایی ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد پس از گذشت هفت روز، حدود ۷۶ میلی‌متر است. تشکیل آسکوکارپ‌ها بیشتر در مرکز پرگنه و رنگ آن‌ها خاکستری تیره است که در ادامه تیره‌تر می‌شود. قطر آسکوکارپ‌ها ۲۱۶-۱۰۸ میکرومتر



شکل ۹: ریخت‌شناسی گونه‌ی *Chaetomium olivaceum* (جدایه‌ی SCUA-30B). A) گیاه میزبان (*Aeluropus littoralis*). B) گیاه میزبان (*Schanginia aegyptiaca*). C و D) آسکوکارپ‌ها و آسکوسپورها. E و F) سطح رویی و پشتی پرگنه روی PDA.

**Figure 9.** *Chaetomium olivaceum* (SCUA-30B): A) Host (*Aeluropus littoralis*). B) Host (*Schanginia aegyptiaca*). C and D) Ascumata and ascospores. E and F) Colony on PDA (top and reverse).

#### بحث

مهمی داشت. این اولین مطالعه‌ای است که حضور *Alternaria chlamyospora* درون‌زی قارچ‌های *Chaetomium olivaceum*، *A. phragmospora*، *Fusarium*، *Curvularia* sp.، *Curvularia ahvazensis*، *Chlamyosporum* و *Fusarium* sp. را در گونه‌های گیاهی *Atriplex lentiformis*، *Aeluropus littoralis*، *Salicornia subterminalis*، *Carthamus oxyacantha* و *Scirpus maritimus* گزارش می‌کند. برخی از این

در این مطالعه، گونه‌های مختلف از جنس‌های *Alternaria*، *Chaetomium*، *Curvularia* و *Fusarium* بر اساس بررسی مولکولی و مقایسه‌ی ریخت‌شناسی آن‌ها با سویه تپ از هرگونه، بعنوان درون‌زی از تعدادی گیاهان متحمل به شوری شناسائی شدند. با توجه به عدم جداسازی معتبر فیلوژنتیکی گونه‌ها در درخت تک‌زنی، بررسی‌های ریخت‌شناسی نقش بسیار

شرایط همزیستی توانستند دماهای بیش از ۶۵ درجه‌ی سلسیوس را نیز تحمل کنند. قارچ درون‌زی *Curvularia sp.* در گیاهان میزبان *Dachanthelium lanuginosum* مقاومت به تنش گرما را افزایش داده است (Rodriguez et al., 2009). قارچ‌های درون‌زی با تولید ترکیبات تاثیر گذار در فشار اسمزی مانند مانیتول و آرابیتول، مقاومت به شوری را افزایش می‌دهند. ضمن اینکه برخی ترکیبات محافظ غشا مانند تری‌هالوزها نیز توسط درون‌زی‌ها تولید می‌شوند (پارسائیان ۱۳۸۲). جذب کمتر سدیم و کلر توسط ریشه در گیاهان حاوی درون‌زی، گیاه را در مقابل سمیت عناصر در شرایط شوری مقاوم می‌کند. نتایج پژوهشی در خاک‌های شور آرژانتین نشان داد که گیاهان موجود در این نواحی حاوی درون‌زی‌هایی هستند که مقاومت به شوری را در این گیاهان افزایش می‌دهند. گیاهان دارای درون‌زی در شرایط تنش خشکی، آب کمتری به روزه‌ها می‌رسانند که این سازوکار سبب از دست دادن آب کمتر در مقایسه با گیاهان عاری از درون‌زی می‌شود.

شناسایی تعدادی قارچ درون‌زی در گونه‌های گیاهی متحمل به شوری و گرما در این مطالعه، ذخیره‌ی ژنتیکی ارزشمندی از میکروارگانیسم‌های مفید را در مطالعات اصلاح گیاهان زراعی فراهم می‌کند. همچنین، انجام بررسی‌های مقاومت ارقام زراعی، مایه‌زنی شده با این میکروارگانیسم‌ها، به تنش‌های زنده یا غیرزنده می‌تواند به معرفی عوامل کنترل زیستی جدید در عرصه کشاورزی پایدار کمک کند و نویددهندی تولید محصولات سالم در آینده باشد.

#### سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز جهت حمایت مالی این تحقیق قدردانی می‌شود.

گونه‌ها (مانند *Fusarium Chlamydosporum*) قبلاً بعنوان بیمارگر نیز شناخته شده‌اند. تعریفی که از درون‌زی‌های قارچی بیشتر پذیرفته است، اینست که آن‌ها موجوداتی هستند که در بافت‌های زنده گیاهی ساکن بوده، بدون اینکه باعث ایجاد اثرات منفی در میزبان شوند (Aly et al., 2011). بعضی قارچ‌های درون‌زی به صورت نهفته در بافت میزبان خود باقی و بعد از مدتی به حالت بیماری‌زا تبدیل می‌شوند. بنابراین مرز بین درون‌زی‌ها و بیمارگرها مبهم است (Debbab et al., 2011). مقایسه‌ی قارچ‌های درون‌زی نشان می‌دهد که مناطق گرمسیری نسبت به مناطق شمالی سردسیری و یا معتدل، تنوع درون‌زی بیشتری را از خود نشان می‌دهند. تنوع قارچ‌های درون‌زی همچنین تحت تأثیر عوامل زیست اقلیمی مانند عرض جغرافیایی، متوسط دما و بارش سالانه که تا حدی مرتبط با جغرافیای منطقه هستند، نیز قرار دارد (Gonzalez and Tello, 2011).

گیاهان مورد بررسی در خاک‌های تحت تنش شوری و در اقلیمی که دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد را نیز تجربه می‌کنند، سازگاری یافته‌اند. شناسایی تعدادی گونه‌ی قارچی در آن‌ها، این فرضیه را تایید می‌کند که بخشی از این سازگاری احتمالاً ناشی از حضور این درون‌زی‌هاست (Suryanarayanan et al., 2002; Helander et al., 2006; Novas et al., 2007). تنش‌هایی که به یک جامعه گیاهی وارد می‌شود، تنوع قارچ‌های درون‌زی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Gonzalez and Tello, 2011). در گیاهان آلوده به درون‌زی، افزایش تحمل به خشکی، گرما، سمیت مواد، pH پایین و شوری بالا گزارش شده است (Rodriguez et al., 2004; Waller et al., 2005). درون‌زی‌ها این توانایی را دارند که میزبان خود را در برابر تنش‌های محیط سازگار کنند. رودریگز و همکاران (Rodriguez et al., 2009) بیان کرده‌اند که در شرایطی که گیاه و قارچ به طور جداگانه قادر به تحمل دماهای بیش از ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نبودند، طی

#### منابع

پارسائیان م، ۱۳۸۲. تأثیر اندوفیت در بروز مقاومت به سرما در دو گونه فستوکا. پایان‌نامه کارشناسی ارشد در رشته اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ۱۱۹ صفحه.

- Ahlholm JU, Helander M, Henriksson J, Metzler M and Saikonen K, 2002. Environmental conditions and host genotype direct genetic diversity of *Venturia ditricha*, a fungal endophyte of birch trees. *Evolution* 56(8): 1566–1573.
- Ahmadpour SA, Mehrabi-Koushki M and Farokhinejad R, 2017. *Neodidymelliopsis farokhinejadii*, a new fungal species from dead branches of trees in Iran. *Sydowia* 69: 171–182.
- Ainsworth GC, 1971. Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi. 6th ed. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, England. 663 pp.
- Aly AH, Debbab A and Proksch P, 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology* 90(6): 1829–1845.
- Arnold AE and Herre EA, 2003. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: Ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 95: 388–398.
- Babaahmadi G, Mehrabi-Koushki M and Hayati J, 2018. *Allophoma hayatii* sp. nov., an undescribed pathogenic fungus causing dieback of *Lantana camara* in Iran. *Mycological Progress* 17(3): 365–379.
- Bacon CW and White JF, 2000. Physiological adaptations in the evolution of endophytism in the Clavicipitaceae. *Microbial Endophytes* 10: 237–261.
- Berbee M, Pirseyedi M and Hubbard S, 1999. *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycologia* 91: 964–977.
- Debbab A, Aly AH and Proksch P, 2011. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. *Fungal Diversity* 49 (1): 1–12.
- Dinarvand M and Sharifi M, 2008. An outlook on vegetation of habitats in South West of Iran (Khuzestan province). *Pajouhesh Va Sazandegi* 81: 77–86.
- Gange AC, Dey S, Currie AF and Sutton BVC, 2007. Site- and species-species differences in endophyte occurrence in two herbaceous plant. *Ecology* 95: 614–622.
- Gonzalez V and Tello ML, 2011. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity* 47(1): 29–42.
- Hall TA, 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- Helander M, Wali P, Kuuluvainen T and Saikonen K, 2006. Birch leaf endophytes in managed and natural boreal forests. *Canadian Journal of Forest Research* 36: 3239–3245.
- Kogel KH, Franken P and Huckelhoven R, 2006. Endophyte or parasite-what decides? *Current Opinion in Plant Biology* 9: 358–363.
- Liu X, Dong M and Chen X, 2008. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX 28 and identification of its antimicrobial compound methylcoimarin". *Applied Microbiology and Biotechnology* 78: 241–247.
- Novas VM, Collantes M and Cabral D, 2007. Environmental effects on grass-endophyte associations in the harsh conditions of south Patagonia. *FEMS Microbiology Ecology* 61: 164–173.
- Omacini M, Chaneton EJ, Ghera CM and Muller CB, 2001. Symbiotic fungal endophytes control insect host-parasite interaction webs. *Nature* 409: 78–81.
- Petrini O, 1986. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues, pp. 175–187 in Fokkema NJ and van den Heuvel J. (editors), *Microbiology of the Phyllosphere*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Petrini O, 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In *Microbial ecology of leaves*. Springer New York. PP: 179–197.

- Raeder U and Broda P, 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1: 17–20.
- Rodriguez RJ, Redman RS and Henson JM, 2004. The role of fungal symbionts in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 9: 261–272.
- Rodriguez RJ and Redman RS, 2008. More than 400 million years of evolution and some plants still can't make it on their own: plant stress tolerance via fungal symbiosis. *Journal of Experimental Botany* 59: 1109–1114.
- Rodriguez RJ, Henson J, Van Volkenburgh E, Hoy M and Wright L et al. 2008. Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *International Society for Microbial Ecology* 2(4): 404–416.
- Rodriguez RJ, White JF, Arnold AE and Redman RS, 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314–330.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ and Dowling DN, 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *FEMS Microbiology Letters* 278: 1–9.
- Saikkonen K, Wali P, Helander M and Faeth SH, 2004. Evolution of endophyte-plant symbioses. *Trends in Plant Science* 9: 275–280.
- Stone JK, Bacon CW and White JF. 2000. An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In Bacon CW and White JF. (eds), *Microbial endophytes*. pp. 3–29. New York: Marcel Dekker.
- Surette MA, Sturz AV, Lada RR and Nowak J, 2003. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant Soil* 253: 381–390.
- Suryanarayanan TS, Murali TS and Venkatesan G, 2002. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany* 80: 818–826.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A and Kumar S, 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725–2729.
- Tan RX and Zou WX, 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 18: 448–459.
- Tintjer T and Rudger AJ, 2006. Grass herbivore interaction altered by strains of a native endophyte. *New Phytologist* 170: 513–521.
- Waller F, Achatz B and Baltruschat H, 2005. The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms Barley to salt-stress tolerance, disease resistance and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 13386–13391.
- White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ and White TJ. (eds) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, New York, pp 315–322.
- Wilson D, 1995. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 73: 274–276.



## Contribution to Identification of Some Fungal Endophytes Associated with the Harsh Ecosystems of Abadan and Ahvaz

S Khodadi-Pourarpanayi<sup>1</sup>, M Mehrabi-Koushki<sup>2\*</sup> and R Farokhinejad<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Former MSc Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

<sup>2</sup>Associate Professor of Mycology and Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

<sup>3</sup>Professor of Mycology and Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

\*Corresponding author: mhdmhrb@scu.ac.ir; mhdmhrb@gmail.com

Received: 20 January 2019

Accepted: 9 June 2019

### Abstract

In this study, 25 samples containing root, stem and leaf of the asymptomatic, salt- and heat-tolerant plants growing around Abadan and Ahvaz, were collected and their endophytic fungi were isolated on potato-dextrose-agar (PDA). Thirty five isolates were obtained, 11 out of them were selected based on the morphology of sexual and asexual structures for molecular identification. In molecular assay, the identity of representative isolates was determined using the sequence data of ITS-rDNA and GAPDH (for *Curvularia* isolates). Based on a combination of morphological and molecular data, the representative isolates were identified and described as following; *Alternaria chlamydospora*, *A. phragmospora*, *Chaetomium olivaceum*, *Curvularia ahvazensis*, *Curvularia* sp., *Fusarium chlamydosporum* and *Fusarium* sp. To the best of our knowledge, these fungal endophytes are here reported from *Aeluropus littoralis*, *Atriplex lentiformis*, *Carthamus oxyacantha*, *Salicornia subterminalis* and *Scirpus maritimus* for the first time.

**Keywords:** Fungal endophytes, Salt-tolerant plants, Morphological and molecular identification, Khuzestan province.