فصلنامهٔ علمی پژوهش و توسعه جنگل
جلد ۸، شماره ۴، صفحه ۴۲۴-۴۱۵، (۱۴۰۱)

DOI: 10.30466/jfrd.2022.54176.1602
DOR: 20.1001.1.24763551.1401.8.4.6.0

مقالهٔ پژوهشی

تنوع ژنتیکی قارچ‌های اندوفیت درختچه شیرخشت (*Cotoneaster integerrimus* Medik.) ارسباران

سحر سعیدی[۱]، یوسف محمدی*[۲] و محمدرضا مشایخی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه زیست شناسی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران. (saeedi.sa2022@gmail.com)
۲- استادیار، دکترای تخصصی اصلاح نباتات، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران. (y.mohamadi@rifr-ac.ir)
۳- استادیار، دکترای تخصصی ژنتیک مولکولی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران. (mashayekhi.mrz@gmail.com)

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۵/۰۱

چکیده

قارچ‌های اندوفیت گیاهی نقش مهمی در فعل و انفعالات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی گیاهان در پاسخ به شرایط محیطی ایفا می‌کنند. در همین راستا، شناسایی قارچ‌های اندوفیت گونه شیرخشت در ارسباران هدف‌گذاری شد. نمونه‌های برگ و ساقه از گیاه مذکور جداسازی و پس از ضدعفونی سطحی، در محیط کشت PDA حاوی استرپتومایسین کشت شدند. پس از رشد هیف‌های قارچی و واکشت کردن آن‌ها، از محیط کشت PDB برای ادامه کار استفاده شد. برای شناسایی ایزوله‌های قارچی رشدکرده، استخراج DNA و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با استفاده از آغازگرهای نواحی فاصله‌انداز رونویسی‌شونده داخلی (Internal Transcribed Spacer) انجام شد. نتایج حاصل از PCR، نشان داد که از ۱۵ ایزوله جداسازی-شده، در ۹ ایزوله قطعه ITS تکثیر شد. به‌طوری که ۳ ایزوله در گونه *Penicillium sizovae*، ۳ ایزوله در گونه *Alternaria alternate*، ۲ ایزوله در جنس *Penicillium* و ایزوله آخر به‌دلیل شباهت کم توالی ITS آن با داده پایگاه، نامگذاری نشد و احتمالا گونه جدیدی باشد و نیاز به پژوهش‌های تکمیلی دارد. تجزیه-وتحلیل فیلوژنتیک، ۴ گونه مورد نظر را در ۲ کلاد کاملا متمایز قرار داد، به‌طوری که کمترین فاصله ژنتیکی بین ۲ گونه *Penicillium* و بیشترین فاصله نیز بین ۲ ایزوله *Penicillium* sp و *Fungal* sp وجود دارد. این بررسی اولین گزارش در ارتباط با قارچ‌های اندوفیت شیرخشت بوده و نشان می‌دهد که این گونه گیاهی میزبان تعداد و طیف کمی از قارچ‌های اندوفیت است.

واژه‌های کلیدی: ارسباران، رابطه همزیستی، متابولیت ثانویه، نواحی فاصله‌انداز رونویسی‌شونده داخلی

* نویسنده مسئول شمارهٔ تماس: ۰۹۱۴۳۰۸۹۸۷۱

مقدمه

قارچ‌های اندوفیت میکروارگانیسم‌هایی هستند که تمام طول عمر یا بخشی از آن را در قسمت‌های داخلی گیاهان زندگی کرده و علایم ظاهری قابل مشاهده‌ای در میزبان خود ایجاد نمی‌کنند. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که این موجودات نقش‌های ویژه‌ای در گیاه میزبان بر علیه آفات و بیماری‌ها دارند (Taechowisan et al., 2003). قارچ‌های اندوفیت در تمامی گونه‌های گیاهی حضور داشته و روابط متقابل محیط با گیاه و گیاه با پاتوژن را تحت تأثیر قرار داده، در نتیجه در کنترل پاتوژن‌ها و بهبود فعالیت گیاهان نیز ایفای نقش می‌کنند (Clay and Schardl, 2002; Arnold and Herre, 2003).

قارچ‌های اندوفیت منبع غنی برای تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند مانند تاکسول، وین کریستین، وین بلاستین و غیره هستند که در پاسخ به شرایط محیطی و یا حملات میکروبی و آفات تولید می‌شوند. تنوع ژنتیکی قارچ‌های اندوفیت به روابط متقابل بین میکروارگانیسم-گیاه بستگی داشته و به‌وسیله عوامل فیزیولوژیکی و جغرافیایی تعیین می‌شود. قارچ‌های اندوفیت جداشده از گیاهان آنژیوسپرم و ژیمنوسپرم توانایی تولید طیف وسیعی از متابولیت‌های ثانویه ضدباکتری، ضدقارچ، ضدویروس، ضدسرطان، آنتی‌اکسیدان و ضدحشره‌کش را دارند (Patil et al., 2016). بر اساس سن، سلامت گیاه و نوع قارچ اندوفیت، ترکیبات زیست فعال متفاوتی تولید می‌شود (Meena et al., 2019).

تاکنون قارچ‌های اندوفیت متعددی از درختان و درختچه‌های جنگلی ایران گزارش شده است. Nasiri Madiseh et al. (2010) ۸۰ ایزوله قارچی را از ساقه گونه سرخدار (*Taxus baccata*) شمال ایران جداسازی کردند که ۵ ایزوله توانایی تولید تاکسول را داشت. در پژوهشی دیگر ۲۵ گونه قارچی از بافت‌های پوست و شاخه بلوط سیاه ارسباران (*Quercus* macranthera) جداسازی و شناسایی شد (Ghasemi Esfahlan et al., 2019). تحقیقات پژوهشگران ایرانی روی قارچ‌های اندوفیت، منجر به شناسایی ۲۳ جدایه (۵ گونه) اندوفیت Trichoderma از تنه و شاخه‌های بلوط ارسباران شد(Ghasemi Esfahlan et al., 2017). Hajizadeh et al. (2015) در پژوهش‌های خود بر روی تنه، شاخه و برگ‌های سالم درختان بلوط (گونه‌های *Quercus* infectoria و *Quercus* brantii) در استان کردستان موفق به شناسایی ۶۷ جدایه (۵ گونه) قارچ اندوفیت شدند.

Roughanian et al. (2012) ۳۵ جدایه قارچی از ۵۰ نمونه تنه درخت بلوط ایرانی (*Quercus persica*) را جداسازی و شناسایی کردند، به‌طوری که ۱۵ جدایه متعلق به گونه *Drechslera triseptata* بود. ناحیه رویشی ارسباران تحت تأثیر اقلیم خزری، اقلیم‌های قفقازی و مدیترانه‌ای است. درواقع تأثیرپذیری از اقلیم‌های مختلف و وجود شرایط فیزیوگرافی متنوع موجب شکل‌گیری جوامع گیاهی بسیار متنوعی شده و این رویشگاه را از دیگر مناطق رویشی کشور متمایز کرده است (Janatbabaei et al., 2019). به‌طوری که جنگل‌های منطقه ارسباران با ۱۳۰ گونه درختی و درختچه‌ای، پتانسیل بالایی برای پژوهش های تنوع زیستی دارد (Ghanbari, 2021). با توجه به اهمیت قارچ‌های اندوفیت در ارتباطات بین گیاه با پاتوژن و محیط پیرامونی آن از یک طرف و همچنین اهمیت این موجودات در تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند، شناسایی قارچ‌های اندوفیت دارای اهمیت است. با توجه به اینکه تاکنون بررسی کافی روی قارچ‌های اندوفیت شیرخشت انجام نشده است، بنابراین هدف این بررسی بررسی این است که آیا تنوع قارچ‌های

اندوفیت و جامعه قارچ‌های اندوفیت مرتبط با گونه شیر خشت ارسباران وجود دارد. این بررسی اولین گزارش در مورد قارچ‌های اندوفیت گونه شیرخشت است.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ‌های اندوفیت از شیرخشت

نمونه‌های برگی و ساقه گونه شیرخشت (*Cotoneaster integerrimus* Medik.) از جنگل‌های ارسباران جمع آوری شد. نمونه‌ها از نواحی سالم و فاقد نشانه‌های بیماری انتخاب و در پاکت‌های کاغذی به آزمایشگاه بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد تبریز منتقل شد. ریزنمونه‌های برگ و ساقه به اندازه نیم سانتی‌متر توسط اسکالپل بریده شد و با استفاده از اتانول ۷۵ درصد (یک دقیقه)، هیپوکلریت سدیم ۲/۵ درصد (دو دقیقه) ضدعفونی سطحی شدند. سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. قطعات فوق در محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) حاوی ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر استرپتومایسین قرار داده شدند تا امکان رشد برای قارچ‌های اندوفیت فراهم شود. محیط‌های کشت به‌مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه نگهداری شدند. برای تأیید درستی ضدعفونی سطحی، دو میلی‌لیتر از آبی که در آخرین مرحله برای شستشوی نمونه‌ها استفاده شد، نیز در محیط کشت PDA کشت شد. ظهور کلنی قارچ در این حالت، نشان‌دهنده عدم ضدعفونی سطحی نمونه‌های برگ و ساقه است. پس از رشد کلنی‌های قارچی، تمامی ایزوله‌ها در گلیسرول ۱۵ درصد در فریزر در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

استخراج DNA ژنومی

برای استخراج DNA ژنومی ابتدا هیف‌های ایزوله منفرد قارچ‌های رشد کرده، در محیط کشت جدید PDA واکشت شدند و به‌مدت دو هفته در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از تخلیص، هیف‌های مورد نظر در ارلن‌های ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محیط PDB (Potato Dextrose Broth) کشت شدند. ارلن‌ها به‌مدت یک هفته روی شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و ۲۰۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. پس از گذشت این مدت، نیم الی یک گرم از هیف‌ها با استفاده از نیتروژن مایع کاملا پودر شد و استخراج DNA ژنومی به روش SDS-CTAB (Kim et al., 1990) انجام شد. در آخر کمیت و کیفیت DNA استخراجی با استفاده از ژل آگارز ۰/۸ درصد و اسپکتروفتومتری با نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo Fisher Scientific, USA) انجام شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و شناسایی قارچ‌ها

برای تعیین جنس و گونه قارچ‌های اندوفیت، توالی پرایمرهای Internal Transcribed Spacer (ITS) از منابع معتبر (Xiong et al., 2013) استخراج و با استفاده از پرایمر بلاست (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) مورد تأیید قرار گرفت. سپس پرایمرها با توالی ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) با دمای اتصال ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای سنتز به شرکت متابیون آلمان فرستاده شد. PCR در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Mastercycler gradient)(اپندورف، آلمان) و در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر به‌مدت پنج دقیقه در ۹۴ درجه و سپس ۳۰ چرخه در ۹۴ درجه به‌مدت یک دقیقه، ۵۷ درجه به‌مدت ۴۵ ثانیه،۷۲ درجه به‌مدت یک دقیقه و در نهایت ۷۲ درجه به‌مدت پنج دقیقه انجام شد. تجزیه‌وتحلیل محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. پس از تکثیر قطعات ITS و اطمینان از صحت PCR (مطابق با اندازه تقریبی محصول

PCR)، تک باندهای شفاف به‌منظور تعیین توالی به شرکت Macrogen (کره جنوبی) ارسال شدند. پس از توالی‌یابی، برای شناسایی جنس و گونه قارچ‌های جداشده، کروماتوگرام ها با استفاده از نرم‌افزار Bioedit، ویرایش وسپس توالی های مورد اشاره با استفاده از برنامه BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) داده پایگاه مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ایالات متحده آمریکا (NCBI) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای تمامی توالی‌ها، آستانه شباهت بیش از ۹۸ درصد برای نامگذاری قارچ‌ها استفاده شد.

ترسیم درخت فیلوژنتیکی

پس از نامگذاری قارچ‌ها، هم‌ردیفی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار CLUSTAL X (Larkin et al., 2007) انجام و تجزیه و تحلیل فیلوژنتیک قارچ‌ها با روش اتصال همسایه (Neighbor-Joining) و UPGMA نرم‌افزار MEGA5 انجام شد. برای قابلیت اعتماد درخت فیلوژنتیک رسم شده از بوت استرپ ۱۰۰۰ استفاده شد.

دریافت شماره دسترسی توالی‌های ژنی ثبت‌شده

توالی کامل قطعات نوکلئوتیدی rDNA 5.8s، ITS2 و همچنین توالی ناقص قطعات نوکلئوتیدی ITS1 و rDNA 28s قارچ‌های *Penicillium* sp، *Fungal* sp، *Penicillium sizovae* و *Alternaria alternata* با شماره دسترسی‌های OM021439.1، OM021438.1، OM021437.1 و OM021435.1 در مرجع بین المللی اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا ثبت شده است.

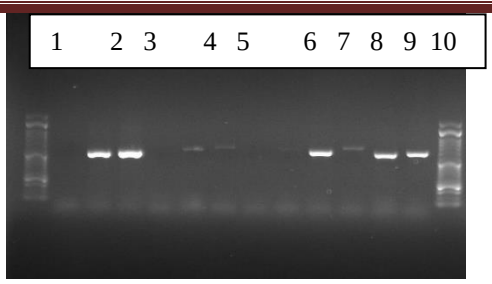
نتایج

شناسایی ایزوله‌های قارچی

پس از خالص‌سازی قارچ‌ها، ۱۵ ایزوله قارچی از شیرخشت جداسازی شد (شکل ۱). اکثر ایزوله‌های جداسازی‌شده با سرعت متفاوت در محیط کشت جامد PDA به‌خوبی رشد کردند. دادهای حاصل از نانودراپ DNA استخراج شده از قارچ‌ها نشان‌دهنده کمیت و کیفیت بالای DNA استخراجی بود و با توجه به تکثیر قطعه ITS، ۹ ایزوله توالی‌یابی شد (شکل ۲). نتایج نشان داد که ۹ ایزوله قارچی جدا شده، در ۴ گونه مختلف قرار گرفتند. به‌طوری که ۳ ایزوله در گونه *Penicillium sizovae*، ۳ ایزوله در گونه *Alternaria alternata*، ۲ ایزوله درجنس *Penicillium* و ایزوله آخر به‌دلیل شباهت کم توالی ITS آن با داده پایگاه، نامگذاری نشد و احتمالا گونه جدیدی باشد و نیاز به پژوهش‌های تکمیلی دارد.

شکل ۱- نمونه ای از قارچ اندوفیت جداشده از سرخدار

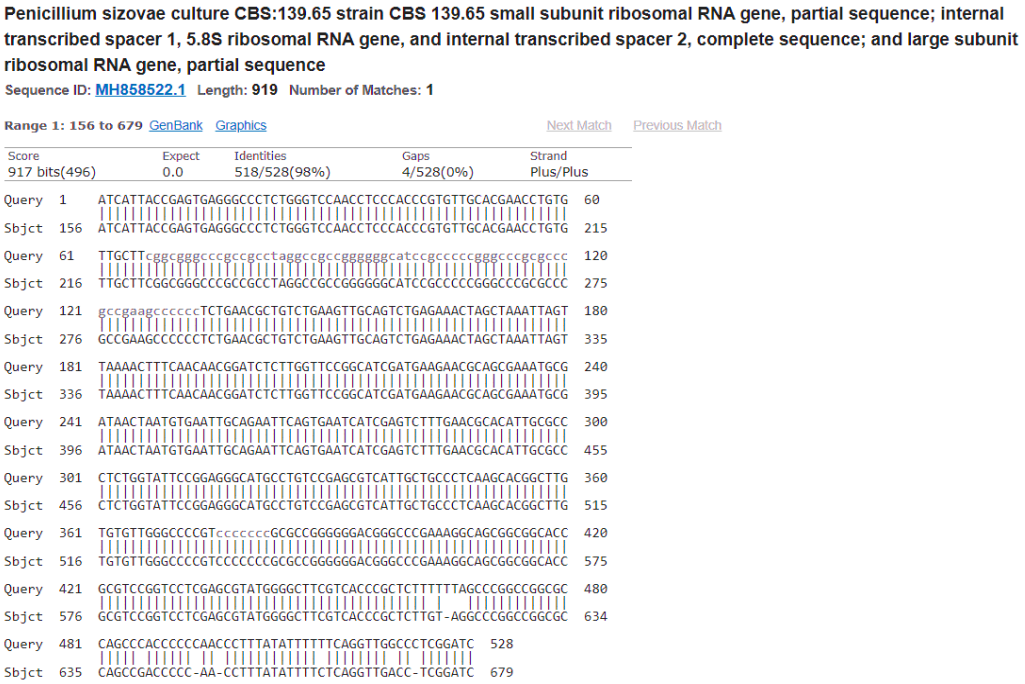
Figure 1. An example of an endophytic fungus isolated from a yew



شکل ۲- وجود قطعه تکثیرشده برای ناحیه ITS با لدر 50 bp (از ۵۰ جفت باز تا ۱۵۰۰ جفت باز)، چاهک ۱، لدر ۵۰ جفت بازی، چاهک ۲، ۳ و ۷ مربوط به قارچ *Penicillium sizovae*، چاهک ۹ و ۱۰ مربوط به قارچ *Penicillium*، ۵، ۶ و ۸ مربوط به *Alternaria alternata* و چاهک ۴ مربوط به *Fungal sp*

Figure 2. Figure 2 - Existence of amplified fragment for ITS region with 50 bp ladder (from 50 bp to 1500 bp), well 1, 50 bp ladder, well 2, 3 and 7 related to *Penicillium sizovae*, wells 9 and 10 *Penicillium*, 5, 6 and 8 related to *Alternaria alternate* and well 4 related to *Fungal* sp.

در تمامی نامگذاری گونه‌ها، شباهت بیشتر از ۹۸ درصد توالی نوکلئوتیدی مبنا قرار گرفت (شکل ۳). مشخصات توالی‌های نوکلئوتیدی قارچ‌های ثبت شده در مرکز اطلاعات بیوتکنولوژی آمریکا در جدول ۱ آمده است. تجزیه‌وتحلیل توالی‌های نوکلئوتیدی ایزوله‌های قارچی نشان می‌دهد که توالی‌ها شامل قطعات rDNA 5.8s، ITS1، ITS2 و rDNA 28s است.



Penicillium sizovae culture CBS:139.65 strain CBS 139.65 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: MH858522.1 Length: 919 Number of Matches: 1

Range 1: 156 to 679 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
917 bits(496)	0.0	518/528(98%)	4/528(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    ATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTGCACGAACCTGTG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  156  ATCATTACCGAGTGAGGGCCCTCTGGGTCCAACCTCCCACCCGTGTTGCACGAACCTGTG  215

Query  61   TTGCTTcggcgggcccgccgcctaggccgccgggggcatccgcccccgggcccgcgccc  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  216  TTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCCTAGGCCGCCGGGGGGCATCCGCCCCCGGGCCCGCGCCC  275

Query  121  gccgaagccccccTCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGAAACTAGCTAAATTAGT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  276  GCCGAAGCCCCCCTCTGAACGCTGTCTGAAGTTGCAGTCTGAGAAACTAGCTAAATTAGT  335

Query  181  TAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  336  TAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCG  395

Query  241  ATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  396  ATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCC  455

Query  301  CTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  456  CTCTGGTATTCCGGAGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTG  515

Query  361  TGTGTTGGGCCCCGTcccccccGCGCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACC  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  516  TGTGTTGGGCCCCGTCCCCCCCGCGCCGGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACC  575

Query  421  GCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTTTTTAGCCCGGCCGGCGC  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |   |||||||||||||
Sbjct  576  GCGTCCGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTTGT-AGGCCCGGCCGGCGC  634

Query  481  CAGCCCACCCCCCAACCCTTTATATTTTTTCAGGTTGGCCCTCGGATC  528
            ||||| |||||| || |||||||||||| |||||||| || |||||||
Sbjct  635  CAGCCGACCCCC-AA-CCTTTATATTTTCTCAGGTTGACC-TCGGATC  679
```

شکل ۳- نمونه‌ای از بلاست توالی نوکلئوتیدی ایزوله جداشده در داده پایگاه NCBI

Figure 3. An example of nucleotide blast in the NCBI database

تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیکی قارچ‌های شناسایی‌شده

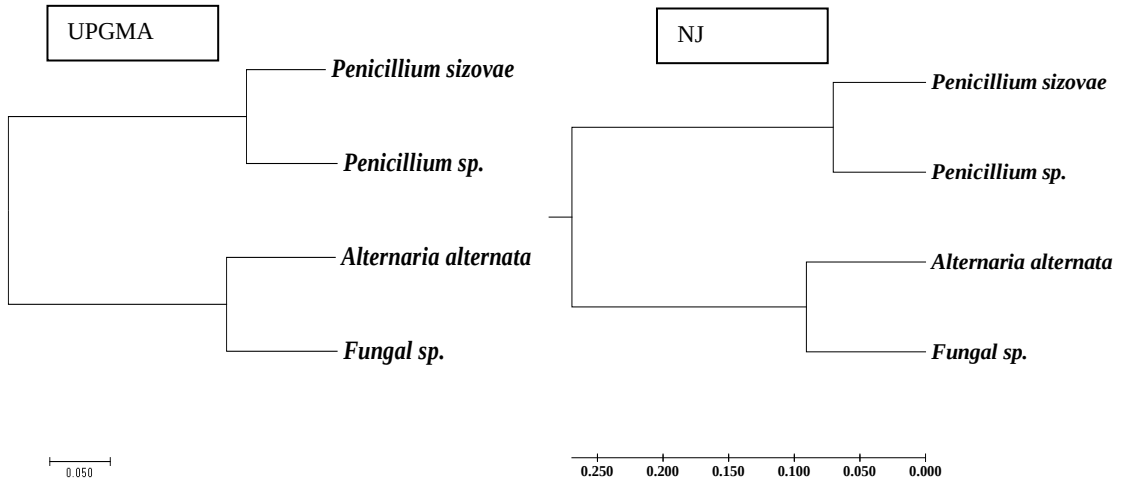
تجزیه‌وتحلیل فیلوژنتیک قارچ‌های اندوفیت جدا شده از شیرخشت ارسباران با استفاده از دو روش UPGMA و NJ نشان داد که ۴ ایزوله در۲ کلاد کاملا جداگانه قرار گرفتند (شکل ۴). به‌طوری که کلاد I شامل ۲ گونه *Penicillium sizovae* و *Penicillium* sp و کلاد II نیز

از ۲ گونه *Fungal* sp و *Alternaria alternate* تشکیل شده است. ماتریس ضرایب فاصله بین ایزوله‌های جداشده در جدول ۲ ذکر شده است. ضرایب نشان می‌دهد که کمترین فاصله ژنتیکی بین ۲ گونه *Penicillium* و بیشترین فاصله نیز بین ۲ ایزوله *Penicillium* sp و *Fungal* sp وجود دارد.

جدول ۱- مشخصات توالی نوکلئوتیدی ایزوله‌های قارچی ثبت‌شده در NCBI

Table 3. Nucleotide sequence profile of fungal isolates registered in NCBI

رمزینه پاسخ سریع QR code	شماره دسترسی Accession number	طول توالی (جفت باز) Sequence length (bp)	نام ایزوله قارچی Fungal name
	OM021437	545	*Penicillium sizovae*
	OM021435.1	684	*Alternaria alternata*
	OM021436.1	620	*Fungal* sp
	OM021439.1	540	*Penicillium sp*



شکل ۴- درخت فیلوژنتیک ایزوله‌های جداشده

Figure 4. Phylogenetic tree of isolated fungi

جدول۲- ماتریس فاصله بین ایزوله‌های جداشده

Table 4. The distance matrix between the isolated fungi

	Penicillium_sp	*Fungal_sp*	*Alternaria_alternata*	*Penicillium_sizovae*
Penicillium_sp		0.377	0.377	0.126
Fungal_sp	0.377		0.159	0.375
Alternaria_alternata	0.377	0.159		0.373
Penicillium_sizovae	0.126	0.375	0.373	

بحث

با توجه به استفاده از نمونه‌های برگی و ساقه گیاهان سالم و عاری از بیماری، قارچ‌های اندوفیت رشد کرده و ضدعفونی سطحی نیز منجر به حذف قارچ‌های اپیفیت و پاتوژن شد. بر اساس ۱۵ ایزوله قارچی جدا شده از شیرخشت ارسباران، چنین به‌نظر می‌رسد که گونه مذکور میزبان طیف و تعداد وسیعی از قارچ‌های اندوفیت نیست. نتایج این بررسی نشان می‌دهد که تنها ۴ گونه قارچی توانایی داشتن ارتباط همزیستی با شیرخشت را داشته و دلایل متعددی برای این امر می‌تواند دخیل باشد که جوان‌بودن درختچه‌های شیرخشت ارسباران، نامناسب‌بودن گونه شیرخشت برای ایجاد ارتباطات متقابل بین میزبان-قارچ و تنوع زیاد گونه‌های گیاهی میزبان در ارسباران را می‌توان نام برد.

Ghasemi Esfahlan et al. (2019) در بررسی خود روی قارچ‌های اندوفیت بافت‌های پوست و شاخه بلوط ارسباران، موفق به شناسایی ۲۵ گونه قارچی *Alternaria alternata*، *Arthrinium arundinis*، *Aspergillus flavus*، *Biscogniauxia mediterranea*، *Chaetomium globosum*، *Cladosporium cladosporioides*، *Clonostachys rosea*، *Curvularia spicifera*، *Daldinia loculata*، *D. palmensis*، *D. vernicosa*، *Discula quercina*، *Epicoccum nigrum*، *Fusarium oxysporum*، *F. proliferatum*، *F.* solani، *Nigrospora oryzae*، *Ochrocladosporium elatum*، *Paecilomyces formosus*، *Penicillium commune*، *P. spinulosum*، *Pyronema domesticum*، *Sordaria fimicola*، *S. sibutii* و *Trichothecium roseum* شدند که نشان‌دهنده وجود گونه مشترک *Alternaria alternata* و مطابقت با این پژوهش است. Hajizadeh et al. (2015) در پژوهش های خود روی تنه، شاخه و برگ‌های سالم درختان بلوط در استان کردستان موفق به شناسایی ۵ گونه قارچ اندوفیت *Cladosporium tenellum*، *Paecilomyces formosus*، *Petriella guttulata*، *Preussia australis* و *Sordaria sibutii* شدند که گونه مشترکی با این بررسی ندارد.

Roopa et al. (2015) موفق به جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلف قارچ اندوفیت از گیاه *Salacia oblonga* شدند که در بین آن‌ها قارچ اندوفیت *Alternaria* نیز حضور داشت که با این پژوهش مطابقت دارد. البته حضور گونه‌های مختلف جنس *Alternaria* به‌عنوان قارچ اندوفیت در گیاهان مختلف مانند سیاه شور پرپشت، سیاه‌شور مصری، خار شتر، چمن شور، سالیکورنیا، آفتابگردان، جو، بادنجان و انبه گزارش شد (Jonbozorgi et al., 2019). Chauhan et al. (2019) در بررسی خود بر روی درخت موز اتیوپی، ۱۰۸ سویه قارچی از ۱۷ جنس را شناسایی کردند که جنس *Alternaria* و *Penicillium* نیز در بین جنس‌های شناسایی شده مشاهده شدند.

محققین در پژوهشی موفق به شناسایی قارچ اندوفیت *Penicillium aurantiogriseum* از درخت فندق شدند که توانایی تولید تاکسول را داشت (Yang et al., 2014). در این بررسی نیز گونه‌های قارچی جنس *Penicillium* جداسازی و شناسایی شد. قارچ اندوفیت *Fusarium solani* در طی پژوهش Deng et al. (2009) از درخت سرخدار جداسازی شده و توانایی تولید تاکسول را دارد. همچنین در بررسی‌ای ۸۰ ایزوله قارچی از درخت سرخدار جداسازی شد، که ۵ ایزوله توانایی تولید تاکسول را داشتند (Nasiri Madiseh et al., 2010). در این بررسی برای اولین بار قارچ‌های اندوفیت گونه شیرخشت جداسازی و معرفی شده‌اند که برای تکمیل کلکسیون قارچ‌های اندوفیت استفاده خواهد شد. همچنین ثبت ژن آرایه‌های مربوط به قارچ‌های *Penicillium* و *Alternaria* در داده پایگاه NCBI برای تکمیل اطلاعات داده پایگاه و پژوهش‌های بعدی قابل استفاده خواهد بود. پیشنهاد می‌شود که در پژوهش‌های بعدی، شناسایی متابولیت‌های ثانویه قارچ‌های اندوفیت شناسایی شده برای تولید جایگزین آن‌ها انجام شود.

References

Arnold, A. E.; Herre, E. A., Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in Theobroma cacao (Malvaceae). *Mycologia* **2003,** *95* (3), 388-398.

Chauhan, N. M.; Gutama, A. D.; Aysa, A., Endophytic fungal diversity isolated from different agro-ecosystem of Enset (Ensete ventericosum) in Gedeo zone, SNNPRS, Ethiopia. *BMC Microbiology* **2019,** *19* (1), 1-10.

Clay, K.; Schardl, C., Evolutionary origins and ecological consequences of endophyte symbiosis with grasses. *The American Naturalist* **2002,** *160* (S4), S99-S127.

Deng, B. W.; Liu, K. H.; Chen, W. Q.; Ding, X. W.; Xie, X. C., Fusarium solani, Tax-3, a new endophytic taxol-producing fungus from Taxus chinensis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2009,** *25* (1), 139-143.

Ghanbari, S., Study on bio-economic aspects of reddish blackberry (Ribes biberistentii Berl. & DC) in Ilgene chay watershed of the Arasbaran forests *Iran Journal of Forest Research and Development* **2021,** *7* (1), 45-62. (In Persian)

Ghasemi Esfahlan, S.; Arzanlou, M.; Babayahri, A.; Torbati, M.; Narmani, A., Morphological and molecular characterization of endophytic fungi from oak trees in Arasbaran forests. Journal *of Applied Research in Plant Protection* **2019**, *8* (1), 1-17. (In Persian)

Ghasemi Esfahlan, S.; Arzanluou, M.; Babaei Ahari, A., Identification of endophytic Trichoderma species from oak trees in Arasbaran forests using morphological and molecular characteristics. *Journal of Applied Research in Plant Protection* **2017**, *6* (3), 53-66. (In Persian)

Hajizadeh, A.; Amini, J.; Abdollahzadeh, J., New records of endophytic fungi isolated from oak trees in Kurdistan province (Iran) *Rostaniha* **2015**, *16* (1), 109-122. (In Persian)

Janatbabaei, M.; Moradi, G.; Feghhi, J., Effect of soil and topography characteristics on distribution of plant types in the Arasbaran forests, Iran. *Forest Research and Development* **2019,** *5* (4), 583-597.

Jonbozorgi, S.; Mehrabi-Koushki, M.; Farokhinejad, R., Isolation and identification of fungal endophytes of the cowpea in Khuzestan province. *Biological Journal of Microorganism* **2019,** *8* (29), 97-115.

Kim, W.; Mauthe, W.; Hausner, G.; Klassen, G., Isolation of high molecular weight DNA and double-stranded RNAs from fungi. *Canadian Journal of Botany* **1990,** *68* (9), 1898-1902.

Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; McGettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R., Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **2007,** *23* (21), 2947-2948.

Meena, H.; Hnamte, S.; Siddhardha, B., Secondary metabolites from endophytic

fungi: chemical diversity and application. In *Advances in Endophytic Fungal Research*, Springer: 2019; pp 145-169.

Nasiri Madiseh, Z.; Mofid, M.; Ebrahimi, M.; Khyam Nekouee, S.M.; Khosravi Ahahli, M., Isolation of Taxol-producing endophytes fungi from Iranian yew (*Taxus baccata* L.) *Journal of Shahrekord Uuniversity of Medical Sciences* **2010**, *11* (4), 101-106. (In Persian)

Patil, R. H.; Patil, M. P.; Maheshwari, V. L., Bioactive secondary metabolites from endophytic fungi: a review of biotechnological production and their potential applications. *Studies in Natural Products Chemistry* **2016,** *49*, 189-205.

Roopa, G.; Madhusudhan, M.; Sunil, K.; Lisa, N.; Calvin, R.; Poornima, R.; Zeinab, N.; Kini, K.; Prakash, H.; Geetha, N., Identification of Taxol-producing endophytic fungi isolated from Salacia oblonga through genomic mining approach. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* **2015,** *13* (2), 119-127.

Roughanian, M.; Amini, J.; Zafari, D.; Abdollahzadeh, J., Drechslera triseptata, a new record for Iranian mycoflora. *Rostaniha* **2012,** *13* (1), 109-110.

Taechowisan, T.; Peberdy, J. F.; Lumyong, S., Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and their antifungal activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2003,** *19* (4), 381-385.

Xiong, Z.-Q.; Yang, Y.-Y.; Zhao, N.; Wang, Y., Diversity of endophytic fungi and screening of fungal paclitaxel producer from Anglojap yew, Taxus x media. *BMC Microbiology* **2013,** *13* (1), 1-10.

Yang, Y.; Zhao, H.; Barrero, R. A.; Zhang, B.; Sun, G.; Wilson, I. W.; Xie, F.; Walker, K. D.; Parks, J. W.; Bruce, R., Genome sequencing and analysis of the paclitaxel-producing endophytic fungus Penicillium aurantiogriseum NRRL 62431. *BMC Genomics* **2014,** *15* (1), 1-14.

Genetic diversity of endophytic fungi of Arasbaran *Cotoneaster integerrimus*

S. Saidi[1], Y. Mohammadi[*2] and M. R. Mashayekhi[3]

1- MSc of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad university, Tabriz, I. R. Iran. (saeedi.sa2022@gmail.com)
2- Assitant Professor, Plant breeding, Research institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, I. R. Iran. (y.mohamadi@rifr-ac.ir)
3- Assitant Professor, Molecular Genetics, Department of Biology, Tabriz Branch, Islamic Azad university, Tabriz, I. R. Iran. (mashayekhi.mrz@gmail.com)

Received: 27.04.2022 Accepted: 23.07.2022

Abstract

Plant endophytic fungi play an important role in the physiological and biochemical interactions of plants in response to environmental conditions and by producing specific secondary metabolites. In addition to preserving the host plant, they also gain economic importance. In this regard, the identification of endophytic fungi of Arasbaran *Cotoneaster integerrimus* shrub was targeted. Leaf and stem samples were isolated from the plant and, after surface disinfection, were cultured in a PDA medium containing Streptomycin. After growing fungal hyphae and culturing them, the PDB medium was used to continue the work. To identify the grown fungal, DNA extraction was performed and Polymerase Chain Reaction was performed using Internal Transcribed Spacer (ITS) primers. PCR results showed that out of 15 isolated isolates, the ITS fragment was amplified in 9 isolates. As 3 isolates in *Penicillium sizovae*, three isolates in *Alternaria alternate*, two isolates in *Penicillium* and the last isolate were not named due to the low similarity of its ITS sequence with the database data and it is probably a new species and needs further studies. Phylogenetic analysis identified the four species in two completely distinct clades, so that the lowest genetic distance observed between the two *Penicillium* species and the maximum distance observed between the *Penicillium* sp and *Fungal* sp. The present study is the first report on *Cotoneaster integerrimus* endophytic fungi and shows that this plant hosts a small number and range of endophytic fungi.

Keywords: Arasbaran, Symbiotic relationship, Secondary metabolites, ITS.

[*] Corresponding author Tel: +989143089871