

## Isolation and Identification of Fungal Endophytes of the Cowpea in Khuzestan Province

**Sahar Jonbozorgi**

M.Sc. Student, Plant Protection Department, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran, kobraheidari.pap@gmail.com

**Mehdi Mehrabi-Koushki**\*

Assistant professor, Department of Plant Protection, Agriculture Faculty, Biotechnology and Life Sciences Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, mhdmhrb@scu.ac.ir

**Reza Farokhinejad**

Professor, Plant Protection Department, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, farokhi\_reza@yahoo.com

### Abstract

**Introduction:** Endophytes are microorganisms that colonize internal tissues of plants without causing obvious symptoms. This study was conducted to isolate and identify endophytic fungi of the cowpea in Khuzestan province.

**Materials and methods:** During 2016, eight healthy samples of the cowpea plants were collected from the important areas under cultivation in the northern Khuzestan province. The small parts of the roots, stems, leaves and pods were deeply surface sterilized for each samples and plated on Potato-Dextrose-Agar. Sixty fungal isolates obtained in this study were purified by single spore method. Based on morphological characteristics, 21 out of 60 isolates were selected for molecular study. The isolates were grown in Potato-Dextrose-Broth and mycelial biomass was recovered by passing through filter paper. DNA extraction was performed using a phenol- and chloroform- based organic method. The parts of the nrRNA gene (ITS and 28S-D1/D2 regions) were amplified using appropriate primer pair and then sequenced.

**Results:** The isolates were analyzed on the basis of morphological characteristics in combination with BLASTn search algorithm and ITS sequence-based phylogeny. Accordingly, the isolates were identified as follows: *Alternaria destruens*, *Alternaria* sp., *Curvularia mosaddeghii*, *Curvularia* sp., *Fusarium chlamyosporum*, *F. nygamai*, *F. falciforme*, *F. proliferatum*, *Fusarium* sp. *Macrophomina phaseolina* and *Penicillium oxalicum*.

**Discussion and conclusion:** *Alternaria*, *Fusarium* and *Curvularia* genera were the most abundant fungal endophytes into cowpea plants, growing in warm climate of the Khuzestan Province. To the best of our knowledge, this is the first study to report endophytic growth of *A. destruens*, *Alternaria* sp., *M. phaseolina*, *F. chlamyosporum*, *F. nygamai*, *F. falciforme*, *F. proliferatum* and *P. oxalicum* within cowpea plants.

**Key words:** Fungal Endophyte, Cowpea, *Alternaria*, *Fusarium*, *Curvularia*, *Macrophomina*, *Penicillium*

---

\* Corresponding author

**Received:** November 1, 2018 / **Accepted:** December 31, 2018

فصلنامه علمی - پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها  
سال هشتم، شماره ۲۹، بهار ۱۳۹۸، صفحه ۹۷-۱۱۵  
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۸/۱۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۰/۱۰

## جداسازی و شناسایی اندوفیت‌های قارچی لویا چشم‌بلبلی در استان خوزستان

**سحر جانبرزگی:** دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، kobraheidari.pap@gmail.com  
**مهدی مهربانی کوشکی\*:** استادیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، mhdmhrb@scu.ac.ir  
**رضا فرخی‌نژاد:** استاد گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران، farokhi\_reza@yahoo.com

### چکیده

**مقدمه:** اندوفیت‌ها ریزجاندارانی هستند که بدون هیچ‌گونه نشانه آشکاری در بافت‌های داخلی گیاهان ساکن می‌شوند. مطالعه حاضر با هدف شناسایی و جداسازی قارچ‌های اندوفیت لویا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) در استان خوزستان انجام شد.

**مواد و روش‌ها:** در سال ۱۳۹۵، هشت نمونه گیاهی سالم از مناطق مهم زیرکشت لویا چشم‌بلبلی در شمال استان خوزستان جمع‌آوری شدند. قطعه‌های کوچکی از ریشه، ساقه، برگ و غلاف هر نمونه ضدعفونی سطحی عمیق و روی محیط‌غذایی سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت شدند. ۶۰ جدایه قارچی حاصل به روش تک‌اسپور خالص‌سازی و ۲۱ جدایه بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی برای بررسی‌های مولکولی انتخاب شدند. جدایه‌ها در محیط سیب‌زمینی دکستروز پراثر رشد کردند و زیست‌توده میسلیومی با کاغذ صافی جمع‌آوری شد. استخراج DNA با استفاده از روش ارگانیک مبتنی بر فنل و کلروفرم انجام شد. بخش‌هایی از ژن nrRNA (نواحی ITS و 28S-D1/D2) با استفاده از آغازگرهای مناسب تکثیر و سپس توالی‌یابی شدند.

**نتایج:** جدایه‌های بررسی‌شده بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی، نتایج جستجوی BLASTn و فیلوژنی مبتنی بر ناحیه ITS تجزیه و تحلیل شدند و بر اساس آن گونه‌های *Alternaria destruens*، *Alternaria* sp.، *Curvularia*، *F. falciforme*، *F. nygamai*، *Fusarium chlamydosporum*، *Curvularia* sp.، *amosaddeghii*، *F. proliferatum*، *Macrophomina phaseolina* و *Penicillium oxalicum* شناسایی شدند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** جنس‌های *Curvularia* و *Fusarium*، *Alternaria* فراوان‌ترین اندوفیت‌های قارچی در گیاه لویاچشم‌بلبلی در زیست‌بوم گرم استان خوزستان هستند. بر اساس دانش ما، این نخستین مطالعه‌ای است که حضور اندوفیتی قارچی‌های *Alternaria destruens*، *Alternaria* sp.، *Curvularia*، *F. falciforme*، *F. proliferatum*، *F. nygamai*، *Penicillium oxalicum* را در گیاه لویاچشم‌بلبلی گزارش می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** اندوفیت قارچی، لویا چشم‌بلبلی، *Macrophomina*، *Curvularia*، *Fusarium*، *Alternaria*، *Penicillium*

\* نویسنده مسئول مکاتبات، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ایران

## مقدمه

لوبیا چشم‌بلبلی (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) گیاهی مخصوص مناطق گرمسیر و نیمه‌گرمسیر است که در سطح اقتصادی در استان خوزستان کشت می‌شود. اندوفیت‌ها مجموعه‌ای از ریزجانداران (قارچ یا باکتری) هستند که بدون ایجاد نشانه و با رشد درون سلولی یا بین سلولی در بافت‌های گیاهان زندگی می‌کنند و منابعی غنی از ترکیبات زیستی فعال هستند (۱ و ۲). قارچ‌های اندوفیت ریزجاندارانی هستند که در بافت‌های داخلی گیاهان زنده ساکن هستند و هیچ‌گونه آثار منفی فوری و آشکاری را در میزبان‌های خود ایجاد نمی‌کنند (۳). تمام گیاهان آوندی و غیرآوندی خشکی‌زی و دریازی زیستگاه اندوفیت‌ها هستند (۴ و ۵). حضور ریزجانداران اندوفیت در بافت‌های علفی و چوبی تمام اندام‌های گیاهی از جمله بافت‌های ریشه، ساقه، شاخه، پوست، برگ، دمبرگ، گل، میوه و دانه ثابت شده است (۶). فلور اندوفیتی از نظر جمعیت و تنوع در میزبان‌های مختلف متفاوت است و به موقعیت جغرافیایی رشد میزبان بستگی دارد (۷ و ۸). حدود ۳۰۰۰۰۰ گونه گیاهی روی زمین وجود دارد و هر گیاه منحصرأ میزبان یک تا تعداد بیشتری اندوفیت است (۲). دهقان‌پور<sup>۱</sup> و همکاران (۹) قارچ‌های اندوفیت را از غلاف برگ و بذرها میزبان‌های گیاهی *Festuca arundinaceae*، *F. ovina*، *F. pratensis*، *Melica persica* و *Lolium preenne domentellus* جداسازی کردند. بیشتر جدایه‌های بررسی شده در این پژوهش از نظر ریخت‌شناسی با توصیف عمومی جنس *Acremonium* و *Neotyphodium* شباهت داشتند. هاشم‌لو<sup>۲</sup> و همکاران (۱۰) قارچ‌های اندوفیت درختان میوه هسته‌دار را در استان آذربایجان غربی بررسی کردند و گونه‌های مختلفی از جنس‌های *Aspergillus*

*Alternaria*، *Ulocladium*، *Stemphylium*، *Trichoderma*، *Trichothecium*، *Penicillium*، *Sordaria*، *Fusarium*، *Phoma*، *Epicoccum* و *Cladosporium* را بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی شناسایی کردند. خرسندی<sup>۳</sup> و همکاران (۱۱) تنوع قارچ‌های اندوفیت را در شاخه و پوست درختان چنار بررسی کردند. در این مطالعه، قارچ‌های *Cochliobolus victoriae*، *F. avenaceum*، *Ulocladium* sp.، *Cyclothyrium* sp.، *Chaetomium* sp. و *Humicola* sp. دارای بیشترین فراوانی در درختان چنار بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی بودند. هرقلی<sup>۴</sup> و همکاران (۱۲) ۱۵ گونه متعلق به ۱۰ جنس قارچی را از درختان انگور جداسازی و شناسایی کردند.

باتوجه به اینکه تاکنون مطالعه کافی روی اندوفیت‌های ساکن در گیاه لوبیا چشم‌بلبلی انجام نشده است، پژوهش حاضر می‌کوشد تنوع گونه‌ای قارچ‌های اندوفیت را در این گیاه بررسی کند.

## مواد و روش‌ها

**نمونه‌برداری و جداسازی اندوفیت‌های قارچی از گیاه لوبیا چشم‌بلبلی:** بخش‌های مختلف ریشه، ساقه و برگ بوته‌های کاملاً سالم و بدون نشانه بیماری از هشت منطقه لوبیاکاری شمال استان خوزستان جمع‌آوری شدند (جدول ۱). نمونه‌های گیاهی به قطعه‌های ۰/۵ تا ۱ سانتی‌متری تقسیم و به مدت ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس، به مدت ۲ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد غوطه‌ور شدند و در نهایت، سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو شدند. پس از خشک شدن قطعه‌های گیاهی روی کاغذ صافی سترون، نمونه‌ها به محیط‌غذایی سیب‌زمینی دکستروز آگار

منتقل شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش تک‌اسپور انجام شد (۱۳).

(PDA) منتقل و به مدت ۵ تا ۱۰ روز در انکوباتوری با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و شرایط تاریکی نگهداری شدند. قارچ‌های رشد کرده به تشتک‌های پتری جدید

جدول ۱- ویژگی‌های توالی‌های به‌دست‌آمده در مطالعه حاضر و شماره دسترسی آنها در بانک ژن

نام گونه	نام جدایه	محل جمع‌آوری	شماره توالی‌ها در بانک ژن	
			ITS	28S-D1/D2
<i>Alternaria destruens</i>	SCUA-8Sd	شاوور	MG971296	MG971383
<i>A. destruens</i>	SCUA-1Sc	مزارع پس از پلیس‌راه اهواز، اندیمشک	MG971274	MG971365
<i>A. destruens</i>	SCUA-6Se	صفی‌آباد، پس از مرکز تحقیقات	MG971290	MG971379
<i>Alternaria sp.</i>	SCUA-4Rh	اکیوش	MG971282	MG971372
<i>Alternaria sp.</i>	SCUA-8Rb	شاوور	MG971295	-
<i>Curvularia mosaddeghii</i>	SCUA-1Rb2	مزارع پس از پلیس‌راه اهواز، اندیمشک	تحت ثبت	تحت ثبت
<i>Curvularia sp.2</i>	IRAN 3121C; SCUA-4Sc	اکیوش	MG971283	MG971373
<i>Curvularia sp.2</i>	IRAN 3125C; SCUA-1Ra	مزارع پس از پلیس‌راه اهواز، اندیمشک	MG971269	MG971361
<i>Curvularia sp.2</i>	IRAN 3124C; SCUA-1Rh	مزارع پس از پلیس‌راه اهواز، اندیمشک	MG971272	MG971364
<i>Curvularia sp.1</i>	IRAN 3120C; SCUA-1Sb	مزارع پس از پلیس‌راه اهواز، اندیمشک	MG971273	-
<i>Fusarium nygamai</i>	SCUA-7Rs	روبه‌روی بیمارستان نظام مافی شوش	MG971293	MG971381
<i>F. chlamydosporum</i>	SCUA-2Sc	روستای مراونه بیت صحین	MG971277	MG971368
<i>F. falciforme</i>	SCUA-3Ra	عشاره کوچک	MG971278	MG971369
<i>F. proloferatum</i>	SCUA-2Rd	روستای مراونه بیت صحین	MG971276	MG971367
<i>Fusarium sp.</i>	SCUA-1Rc	مزارع پس از پلیس‌راه اهواز، اندیمشک	MG971271	MG971363
<i>Fusarium sp.</i>	SCUA-2Rc	روستای مراونه بیت صحین	MG971275	MG971366
<i>Fusarium sp.</i>	SCUA-7Rf	روبه‌روی بیمارستان نظام مافی شوش	MG971292	MG971380
<i>Fusarium sp.</i>	SCUA-4Rb	اکیوش	MG971280	-
<i>Fusarium sp.</i>	SCUA-4Rd	اکیوش	MG971281	MG971371
<i>Macrophomina phaseolina</i>	SCUA-8Ra	شاوور	MG971294	MG971382
<i>Pecicillium oxalicum</i>	SCUA-6Sd	صفی‌آباد، پس از مرکز تحقیقات	MG971289	MG971378

**بررسی مولکولی جدایه‌ها:** جدایه‌های قارچی در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروزبراث (PDB) به مدت ۱۰ روز در شرایط تاریکی مطلق و دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد درون شیکر انکوباتور رشد داده شدند. توده میسلیومی رشدیافته با پمپ خلأ، کیف و کاغذ صافی سترون جمع‌آوری شد و پس از شستشو، در لوله‌های سانتریفیوژ ۵۰ میلی‌لیتری در دستگاه فریزدرایر

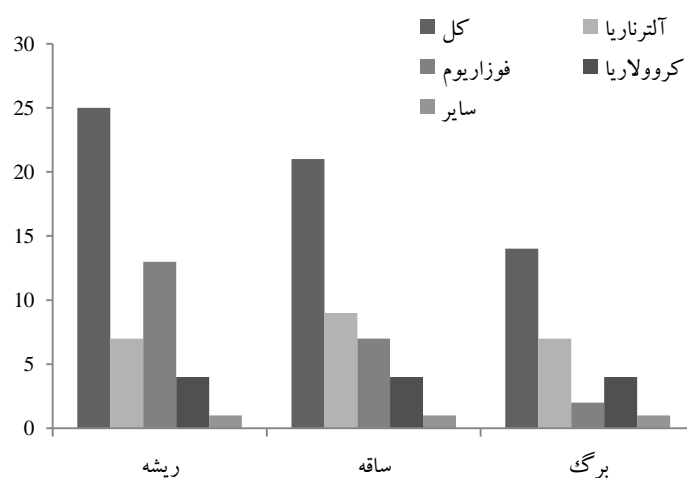
**بررسی ریخت‌شناسی:** شکل ظاهری پرگنه و رنگ آن، ویژگی‌های رشدی، ریخت‌شناسی اندام‌های تولیدمثلی، کنیدیوم‌ها و کلامیدوسپورها به‌منظور بهره‌گیری در شناسایی جدایه‌ها بررسی شدند. تصاویر با میکروسکوپ نوری (OLYMPUS BX51 متصل به دوربین دیجیتال OLYMPUS DP12) تهیه شدند.

DNA Baser نسخه 3.5.0 (www.DnaBaser.com) ویراستاری و مونتاژ شدند. توالی‌ها به پایگاه اطلاعات ژنوم NCBI معرفی و با استفاده از الگوریتم BLASTn برای شناسایی هیتهای بلاست و توالی‌های شناخته‌شده مرتبط جستجو شدند. درختان فیلوژنتیکی با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه و با نرم‌افزار مگا نسخه ۷.۶ ترسیم شدند (۲۰).

### نتایج

در پژوهش حاضر، در مجموع ۶۰ جدایه قارچی از بخش‌های مختلف (۲۵ جدایه از ریشه، ۲۱ جدایه از ساقه و ۱۴ جدایه از برگ) هشت نمونه گیاه سالم لوییا چشم‌بلبلی جمع‌آوری شده از هشت منطقه لویاکاری در اهواز و شمال استان خوزستان جداسازی، خالص‌سازی و بررسی شدند (شکل ۱). در این طبقه‌بندی، ۲۳ جدایه از جنس *Alternaria*، ۲۲ جدایه از جنس *Fusarium*، ۱۲ جدایه از جنس *Curvularia*، ۲ جدایه از جنس *Macrophomina* و ۱ جدایه از جنس *Penicillium* به دست آمد (جدول ۲).

(Freeze-Dryer, Alpha 1-2LD Plus, Christ) خشک انجمادی شد. زیست‌توده در هاون چینی حاوی ازت مایع پودر و تا زمان استخراج DNA در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج DNA به روش ریدر و برودا<sup>۵</sup> (۱۴) با اندکی تغییر انجام شد (۱۵). جفت آغازگر عمومی ITS1-F و NL4-R برای تکثیر حدود ۱۲۰۰ جفت باز از نواحی 18S، ITS1، 5.8S، ITS2 و 28s-D1/D2 مربوط به rDNA هسته‌ای استفاده شد (۱۶ و ۱۷). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از ترموسایکلر مدل‌های Biometra و Biorad انجام شد. مخلوط واکنش زنجیره‌ای پلیمرز و برنامه حرارتی برای تکثیر این نواحی ژنی بر اساس روش پیشنهادی حیدری و همکاران (۱۸) تهیه و انجام شد. پس از انجام الکتروفورز، باندهای با اندازه حدود ۱۲۰۰ جفت باز برش داده شدند و خالص‌سازی DNA با استفاده از کیت تجاری Vivantis GF-1 Gel DNA Recovery Kit و دستورعمل ارائه‌شده در آن انجام شد. شرکت ماکروژن محصولات PCR را با آغازگرهای استفاده‌شده در تکثیر توالی‌یابی کرد. توالی‌ها با نرم‌افزار بیوادیت نسخه 4.0.6.2<sup>۶</sup> (۱۹) و



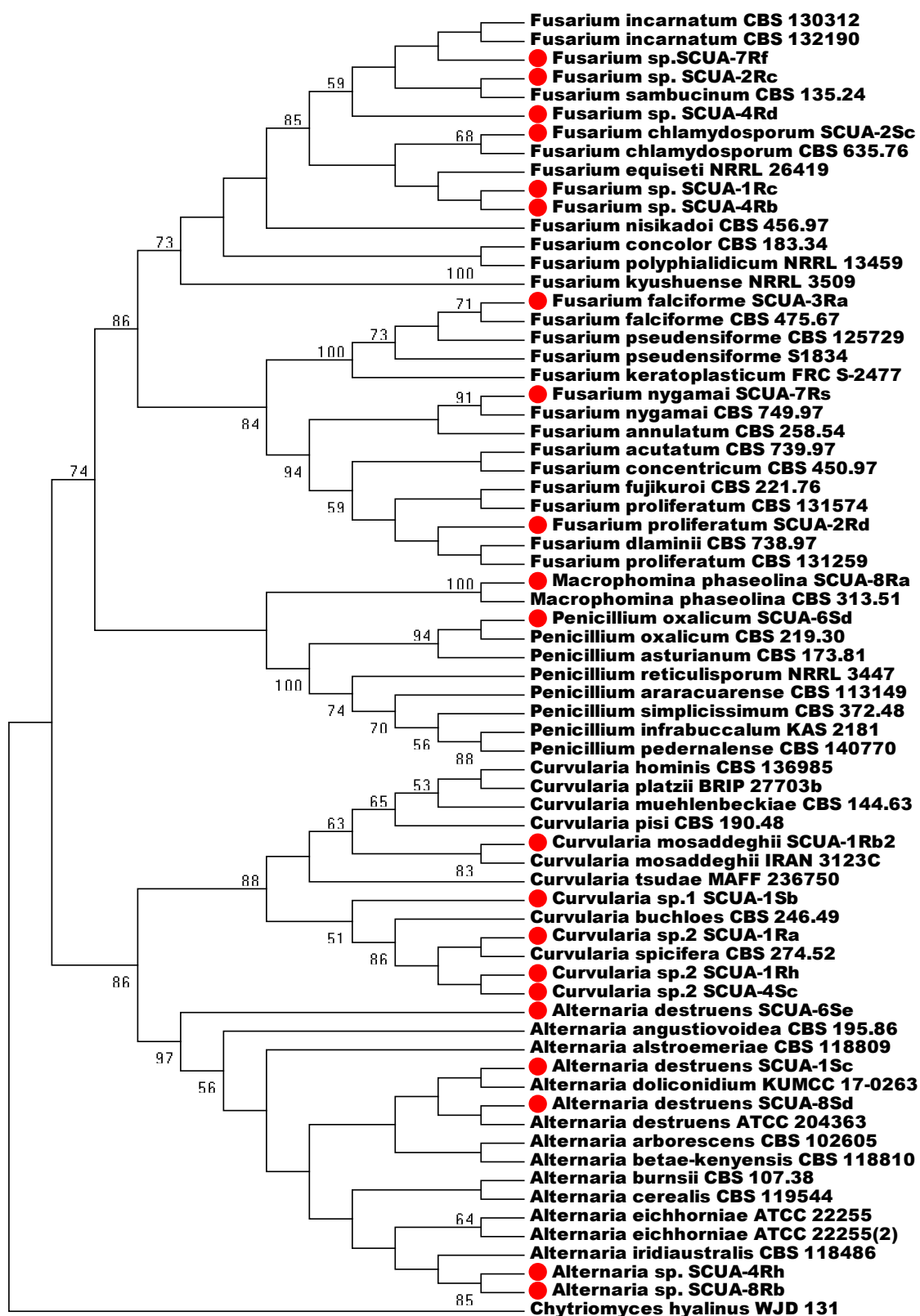
شکل ۱- نمودار فراوانی جدایه‌های قارچی به دست آمده از بخش‌های ریشه، ساقه و برگ

جدول ۲- گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس صفت‌های ریخت‌شناسی

گروه ریخت‌شناسی	تعداد جدایه	برخی ویژگی‌های مهم ریخت‌شناسی
<i>Alternaria destruens</i>	۱۵	کنیدیوم‌ها با اندازه حدود ۱۱/۵-۳۱/۸×۱۰/۳-۲۸/۲ میکرومتر، تعداد دیواره عرضی در آنها ۱ تا ۷ (بیشتر دارای ۳ تا ۵ دیواره) و تعداد دیواره طولی ۱ تا ۴
<i>Alternaria sp.</i>	۸	کنیدیوم‌ها با اندازه حدود ۱۵-۱۳/۸×۲×۳۹/۷-۳۳/۷ میکرومتر، تعداد دیواره عرضی در آنها ۳ تا ۷ و تعداد دیواره طولی ۱ تا ۳
<i>Curvularia mosaddeghii</i>	۱	کنیدیوم‌زایی زیگزاگی (سیمپودیال)، کنیدیوم‌ها چهارحجره‌ای، دو سلول انتهایی کنیدی‌ها روشن و دو سلول میانی تیره‌تر، حجره سوم بزرگ و انحنادار و اندازه آنها ۱۰/۵-۲۳/۵×۹/۸-۲۱/۸ میکرومتر
<i>Curvularia sp.1</i>	۶	کنیدیوم‌زایی زیگزاگی، کنیدیوم‌ها راست و بدون انحنا، بیشتر چهارحجره‌ای و گاهی سه‌حجره‌ای، استوانه‌ای تا تخم‌مرغی شکل، قهوه‌ای روشن و اندازه آنها ۹/۶-۲۴/۳×۱۳/۲ میکرومتر
<i>Curvularia sp.2</i>	۵	کنیدیوم‌زایی زیگزاگی، کنیدیوم‌ها بیضوی شکل، بیشتر راست و به ندرت کمی انحنادار، چهارحجره‌ای و اندازه آنها ۸/۷-۲۳/۸×۸/۱-۲۲/۷ میکرومتر
<i>Fusarium nygamai</i>	۷	پرگنه کامل ارغوانی تیره، کنیدیوم‌ها کوتاه، سلول‌های کنیدیوم‌زایی بیشتر مونوفیالید، کوتاه و غیرمنشعب و کنیدیوم‌ها روی آنها به‌طور مجتمع هستند، ماکروکنیدی‌ها راست یا دارای کمی خمیدگی، میکروکنیدی‌ها یک سلولی، خمیده و اندازه آنها ۳/۱-۳۶/۳×۱۳/۶-۴/۸ میکرومتر، کلامیدوسپورها فراوان و انفرادی یا زنجیری
<i>F. chlamydosporum</i>	۲	پرگنه کامل قهوه‌ای روشن، کنیدیوم‌ها شفاف و پلی‌فیالید، ماکروکنیدیوم‌ها با ۳ تا ۶ دیواره عرضی، خمیده یا هلالی و اندازه آنها ۴/۵-۳۹/۶×۲۷/۲ میکرومتر، میکروکنیدیوم‌ها بیضوی شکل، معمولاً تک سلولی و اندازه آنها ۳/۶-۱۸×۲/۱-۶ میکرومتر، کلامیدوسپورها زنجیری
<i>F. falciforme</i>	۵	پرگنه کامل کرمی، سلول‌های کنیدی‌ها به‌طور انتهایی و غیرقابل تمیز از کنیدیوم‌ها، ماکروکنیدیوم‌ها استوانه‌ای یا بیضوی شکل و ابعاد آنها ۲/۸-۲/۵×۶۹/۱۷-۱۳/۵۶ میکرومتر؛ میکروکنیدیوم‌ها اکثراً یک سلولی، تخم‌مرغی و کاماشکل و اندازه آنها ۲/۵-۲/۲×۲/۳-۶/۷ میکرومتر
<i>F. proloferatum</i>	۳	پرگنه کامل نارنجی، سلول‌های کنیدیوم‌ها باریک و مونوفیالید یا پلی‌فیالید، ماکروکنیدیوم‌ها راست، ۳ تا ۴ دیواره عرضی و اندازه آنها ۲/۹-۲۳/۲×۱۹/۶-۱۳/۶ میکرومتر، میکروکنیدیوم‌ها تخم‌مرغی یا دوکی شکل، صفر یا ۱ دیواره عرضی و ابعاد آنها ۳-۲×۲/۸-۶/۸
<i>Fusarium sp.</i>	۵	پرگنه کامل نارنجی، سلول‌های کنیدیوم‌ها غالباً مونوفیالید، کوتاه و غیرمنشعب و کنیدیوم‌ها روی آنها به‌طور مجتمع، ماکروکنیدیوم‌ها غالباً داسی شکل، ۳ تا ۶ دیواره عرضی و اندازه آنها ۴/۳-۳۱/۸×۳/۵-۲۳/۵ میکرومتر، میکروکنیدیوم‌ها تقریباً کلیوی تا دوکی شکل، اغلب یک تا دو سلولی، اندازه آنها ۳/۶-۱۰/۸×۲/۷-۹ میکرومتر، کلامیدوسپورها انفرادی یا زنجیری
<i>Macrophomina phaseolina</i>	۲	پرگنه دارای رشد سریع، در مرکز دودی و تیره و در حاشیه سفید مایل به خاکستری، تولید سختینه‌های سیاه‌رنگ به‌طور پراکنده و به اشکال گرد، بیضوی و نیمه کروی
<i>Pecicillium oxalicum</i>	۱	پرگنه در مرکز سبز و در حاشیه سفید مایل به کرم، کنیدیوم‌ها غالباً Biverticillate، فیالیدها استوانه‌ای تا نيزه‌ای و ابعاد آنها ۱-۴/۱×۳-۱۸ میکرومتر، کنیدیوم‌ها تخم‌مرغی شکل و اندازه آنها ۳/۳-۲/۹×۵/۶-۴/۷ میکرومتر

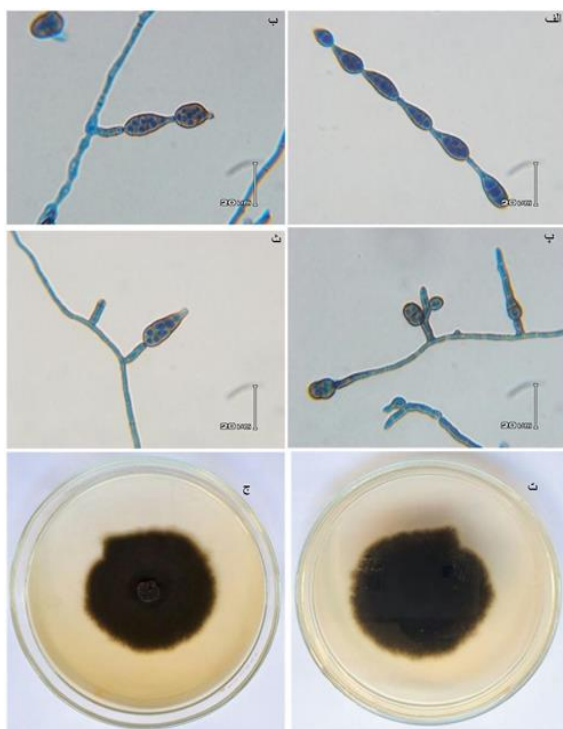
جدایه‌های بررسی شده ترسیم شد (شکل ۲) و جداسازی فیلوژنتیکی جدایه‌ها با نزدیک‌ترین گونه‌های خویشاوند تجزیه و تحلیل شد. ناحیه 28S-D1/D2 در جستجوی BLASTn و رسم درخت فیلوژنتیکی به شناسایی گونه‌ها کمک نکرد و نتایج آن ارائه نشده‌اند و فقط شماره دسترسی آن در بانک ژن آورده شده است (جدول ۱).

**بررسی مولکولی:** ۲۱ جدایه در بررسی مولکولی استفاده شدند و توالی‌های به دست آمده در بانک ژن ثبت شدند (جدول ۱). میزان شباهت توالی‌های هر ژن از هر جدایه با سویه‌های شناخته شده از طریق انجام جستجوی BLASTn آشکار شد. درختی تک‌ژنی مبتنی بر ناحیه ITS با استفاده از الگوریتم درست‌نمایی بیشینه برای تمام



شکل ۲- درخت تک‌زنی بدون مقیاس گونه‌های بررسی شده در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه بر اساس توالی ITS با استفاده از مدل K2+G+I. ارتباط فیلوژنتیکی جدایه‌های بررسی شده (با دایره توپر قرمز نشان داده شده است) فقط با گونه‌های نزدیک آنها نشان داده شده است. اعداد اعتبارسنجی زیر ۵۰ درصد نشان داده شده است.

*A. cerealis* و *angustiovoidea* خوشه‌بندی شدند و کلادی با ارزش بوت‌استراپ ۹۷ درصد ایجاد کردند. این درخت تک‌ژنی نتوانست به‌طور معتبر این گونه را از نظر فیلوژنتیکی از سایر گونه‌ها جداسازی کند.



شکل ۳- جدایه SCUA-8Sd *A. destruens*. الف، ب، پ، ث. کنیدیوم و کنیدیوم‌برهای اولیه؛ ت، ج. شکل پرگنه هفت‌روزه روی محیط کشت PDA

#### شکل ۴) *Alternaria* sp.

۸ جدایه از این گونه (از جمله جدایه‌های SCUA-4Rh و SCUA-8Rb) از ریشه، ساقه و برگ گیاهان سالم لوبیا چشم‌بلبلی در اکیوش، اهواز، اندیمشک، شاور، شوش و صفی‌آباد جداسازی شدند.

قطر پرگنه قارچ پس از مایه‌زنی روی محیط کشت PDA در شرایط دمایی  $28 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد پس از ۷ روز برابر ۶۸ میلی‌متر و رنگ پرگنه سبز زیتونی تیره است. کنیدیوم‌برها منشعب و به رنگ قهوه‌ای روشن هستند، خمیدگی زانویی در انتهای آنها

#### *Alternaria destruens* E.G. Simmons, Mycotaxon 68: 419 (1998) (شکل ۳)

۱۵ جدایه از این گونه (از جمله جدایه‌های SCUA-1Sc و SCUA-6Se، SCUA-8Sd) از ریشه، ساقه و برگ گیاهان سالم لوبیا چشم‌بلبلی در اکیوش، اهواز، اندیمشک، شاور، شوش، صفی‌آباد و مراونه جداسازی شدند.

قطر پرگنه قارچ پس از مایه‌زنی روی محیط کشت PDA در شرایط دمایی  $28 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد پس از ۷ روز برابر ۵۵ میلی‌متر و رنگ پرگنه سبز زیتونی تیره است. پرگنه دارای ظاهری مسطح و چسبیده به سطح محیط کشت است. کنیدیوم‌برها به رنگ قهوه‌ای روشن هستند و ابعاد آنها  $4/65 - 4/65$  میکرومتر است. کنیدیوم‌ها به شکل زنجیره‌های ساده و غیرمنشعب روی کنیدیوم‌برها تشکیل می‌شوند. کنیدیوم‌ها به شکل تخم‌مرغی یا بیضوی هستند؛ تعداد دیواره عرضی در آنها بین ۱ تا ۷ عدد متغیر است ولی بیشتر دارای ۳ تا ۵ دیواره هستند و تعداد دیواره طولی در آنها ۱ تا ۴ عدد است. کنیدیوم‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن و دارای زائده در انتهای خود هستند. سطح کنیدیوم‌ها صاف است و هیچ گونه تزییناتی روی آنها دیده نمی‌شود. ابعاد کنیدیوم‌ها  $11/5 - 10/3 \times 31/8 - 28/2$  میکرومتر است.

نتایج جستجوی BLASTn جدایه‌های SCUA-8Sd، SCUA-6Se و SCUA-1Sc نشان دادند توالی ITS این جدایه‌ها با سویه‌های شناخته‌شده *A. destruens* ATCC سویه 204363 از جمله سویه *A. destruens* ATCC 204363 درخت ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲)، جدایه‌های بررسی شده با سویه شناخته‌شده *A. destruens* ATCC 204363 و سویه‌هایی از گونه‌های نزدیک به این گونه (از جمله *A. arborescens*، *A. alstroemeriae*)



نتایج جستجوی BLASTn جدایه‌های SCUA-4Rh و SCUA-8Rb نشان دادند توالی ITS این گونه با سویه شناخته‌شده *Alternaria ceralis* CBS 119544 ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. درخت ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲)، جدایه‌های SCUA-4Rh و SCUA-8Rb با سایر گونه‌های نزدیک جنس *Alternaria* مانند *A. eichhorniae* و *A. iridiauxalis* همراه شدند و کلادی با ارزش بوت‌استرپ ۹۷ درصد ایجاد کردند.

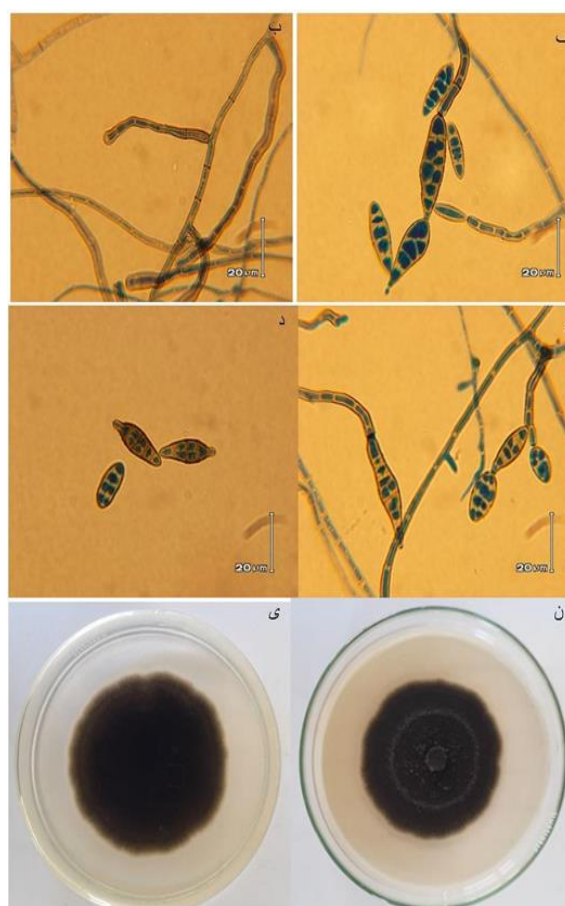
#### شکل ۵) *Macrophomina phaseolina*

۲ جدایه SCUA-8Ra *M. phaseolina* و *M. phaseolina* SCUA-3Rg از ریشه سالم گیاه لوبیا چشم‌بلبلی از مزارع لوبیاکاری منطقه اکیوش جداسازی شدند.

رشد قارچ بسیار سریع و قطر پرگنه روی محیط کشت PDA پس از ۳ روز در شرایط دمایی  $28 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد برابر ۸۰ میلی‌متر است. رنگ پرگنه در مرکز دودی و تیره و در حاشیه سفید مایل به خاکستری دیده می‌شود. ریشه‌ها رشد هوایی نیز دارند و سختینه‌های سیاه‌رنگی به‌طور پراکنده روی پرگنه مشاهده می‌شوند که به اشکال گرد، بیضوی و نیمه‌کروی هستند.

نتایج جستجوی BLASTn جدایه *M. phaseolina* SCUA-8Ra نشان دادند توالی ITS این جدایه با سویه شناخته‌شده *Macrophomina phaseolina* CBS 313.51 ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. درخت ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲)، جدایه SCUA-8Ra *M. phaseolina* با سویه شناخته‌شده CBS 313.51 *M. phaseolina* خوشه‌بندی شد و کلادی با ارزش بوت‌استرپ ۱۰۰ درصد ایجاد کرد.

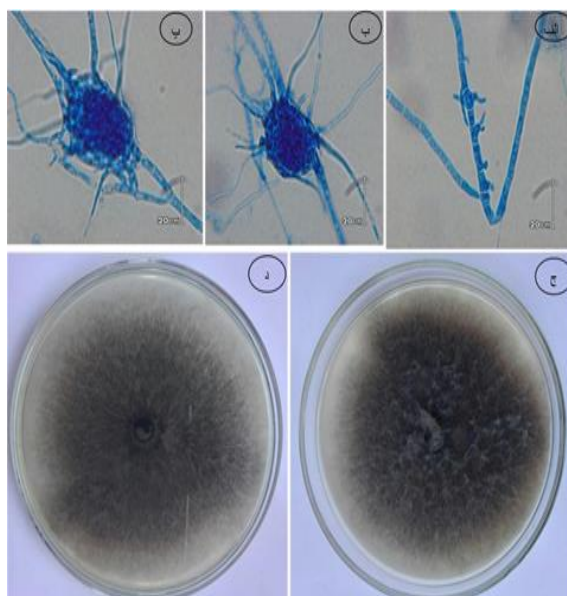
دیده می‌شود و ابعاد آنها  $4/1-3/8 \times 76/4-41/6$  میکرومتر است. کنیدیوم‌ها به شکل زنجیره‌های ساده و غیرمنشعب روی کنیدیوم‌برها تشکیل می‌شوند. کنیدیوم‌ها در انتها باریک شده و به اشکال تخم‌مرغی یا بیضوی دیده می‌شوند و تعداد دیواره عرضی از ۳ تا ۷ عدد و تعداد دیواره طولی بین ۱ تا ۳ عدد در آنها متغیر است. کنیدیوم‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن و در انتهای خود دارای زائده هستند. سطح کنیدیوم‌ها صاف است و هیچ‌گونه تزییناتی روی آنها دیده نمی‌شود. ابعاد کنیدیوم‌ها  $15-13/8 \times 39/2-33/7$  میکرومتر است.



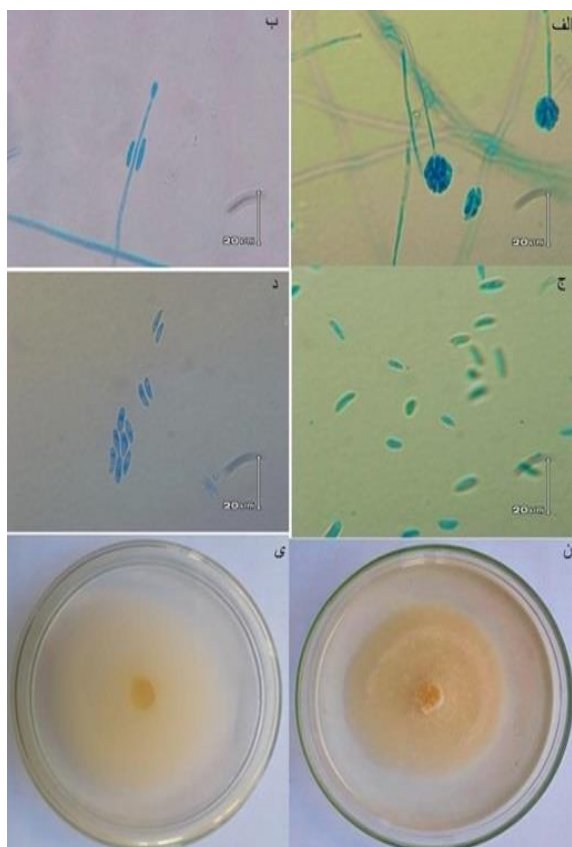
شکل ۴- جدایه SCUA-8Rb *Alternaria* sp. الف، ب، ج، د. تولید کنیدیوم و کنیدیوم‌بر؛ ن، ی. شکل پرگنه پس از گذشت یک هفته روی محیط PDA

میکرومتر است. میکروکنیدیوم‌ها بیشتر یک سلولی، تخم‌مرغی و کاماشکل و طول و عرض آنها ۲/۵-۶/۷×۷/۳×۲/۲ میکرومتر است.

نتایج جستجوی BLASTn جدایه *F. falciforme* SCUA-3Ra نشان دادند توالی ITS این جدایه با سویه شناخته شده *F. falciforme* CBS 475.67 ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲) جدایه مطالعه شده با سویه شناخته شده *F. falciforme* CBS 475.67 خوشه‌بندی شد و کلادی با ارزش بوت‌استرپ ضعیف ۷۱ درصد ایجاد کرد.



شکل ۵- جدایه *M. phaseolina* SCUA-8Ra الف، ب، پ. ریشه‌ها و سختینه؛ ج، د. شکل پرگنه روی محیط کشت PDA پس از گذشت ۴ روز

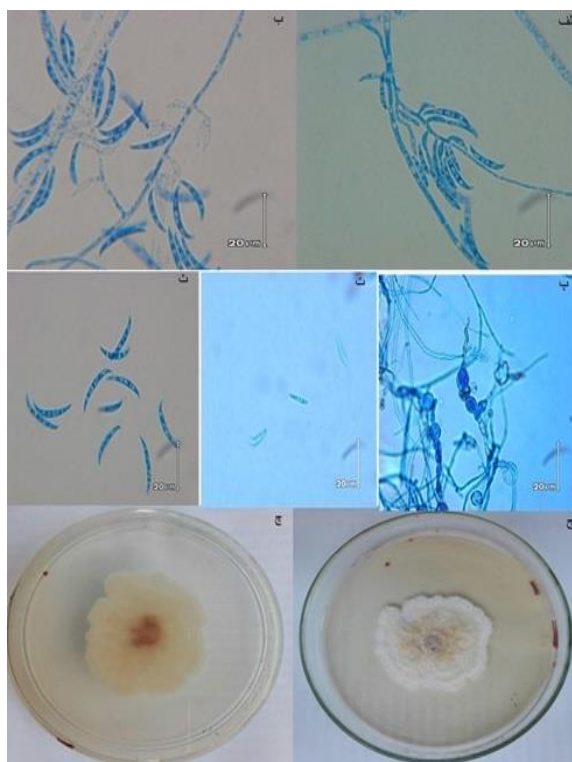


شکل ۶- جدایه *F. falciforme* SCUA-3Ra الف، ب، ج، د. ریشه، کنیدیوم، فیالید و کنیدیوم‌برها؛ ن، ی. شکل پرگنه پس از ۷ روز روی محیط کشت PDA

***Fusarium falciforme* (Carrion) Summerb. & Schroers, Journal of Clinical Microbiology 40 (8): 2872 (2002)** (شکل ۶)

۵ جدایه از این گونه (از جمله *F. falciforme* SCUA-3Ra) از ریشه، ساقه و برگ گیاه لوبیا چشم‌بلبلی در اندیمشک، اهواز، شوش و عشارة کوچک جداسازی شدند.

قطر پرگنه در شرایط دمایی  $28 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ۷ روز روی محیط کشت PDA برابر ۶۴ میلی‌متر است. ریشه‌ها بی‌رنگ هستند و رنگ پرگنه کرمی (نخودی‌رنگ) است. اندازه کنیدیوم‌برها  $27/56-54/39 \times 1/9-2/1$  میکرومتر است. سلول‌های کنیدیوم‌زا به شکل انتهایی هستند و از کنیدیوم‌بر متمایز نیستند. کنیدیوم‌ها دیواره‌دار یا بدون دیواره و بی‌رنگ هستند و گاهی اوقات در گروه‌های کوچک مجتمع می‌شوند. ماکروکنیدیوم‌ها استوانه‌ای یا بیضوی شکل و ابعاد آنها  $13/56-17/69 \times 2/5-2/8$



شکل ۷- جدایه *F. chlamydosporum* SCUA-2Sc. الف، ب، پ، ت، ث. ریشه، کلامیدوسپور، کنیدیوم و کنیدیوم‌برها؛ ج، چ. شکل برگنه هفت‌روزه روی محیط کشت PDA

***Fusarium nygamai* L.W. Burgess & Trimboli, Mycologia 78: 223 (1986)**  
(شکل ۸)

۷ جدایه از این گونه (ازجمله *F. nygamai* SCUA-7Rs) از ریشه، ساقه و برگ گیاهان سالم لوبیا چشم‌بلبلی در اهواز، اندیمشک، اکیوش، شوش و مراونه جداسازی شدند.

قطر برگنه روی محیط کشت PDA پس از ۷ روز در شرایط دمایی  $28 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد برابر ۷۷ میلی‌متر است. رنگ برگنه در ابتدای رشد سفید است و پس از تولید رنگدانه به رنگ ارغوانی تیره درمی‌آید. کنیدیوم‌برها کوتاه هستند. سلول کنیدیوم‌زا در این گونه بیشتر مونوفیالید، کوتاه و غیرمنشعب است و کنیدیوم‌ها روی فیالیدها به شکل مجتمع قرار

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

۲ جدایه از این گونه (ازجمله *F. chlamydosporum* SCUA-2Sc) از ریشه و ساقه گیاهان سالم لوبیا چشم‌بلبلی در مزارع لوبیاکاری شوش و مراونه جداسازی شدند.

قطر برگنه در شرایط دمایی  $28 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد پس از گذشت ۷ روز روی محیط کشت PDA برابر ۵۲ میلی‌متر است. رنگ برگنه ابتدا سفید تا کرمی‌رنگ است و با افزایش عمر، قهوه‌ای روشن می‌شود. کنیدیوم‌برها شفاف و پلی‌فیالید هستند و سلول کنیدیوم‌زا غالباً مونوفیالیدیک مشاهده می‌شود. ماکروکنیدیوم‌ها دارای ۳ تا ۶ دیواره عرضی هستند، شکل آنها خمیده یا هلالی و در دو انتها نوک تیز است و اندازه آنها  $4/5 - 3 \times 2/2 - 27/2$  میکرومتر است. میکروکنیدیوم‌ها بیضوی شکل و معمولاً تک سلولی و گاهی دو سلولی یا سه سلولی هستند. اندازه میکروکنیدیوم‌ها  $3/6 - 2/1 \times 18 - 6$  میکرومتر است. کلامیدوسپورها به شکل زنجیری روی ریشه تشکیل می‌شوند.

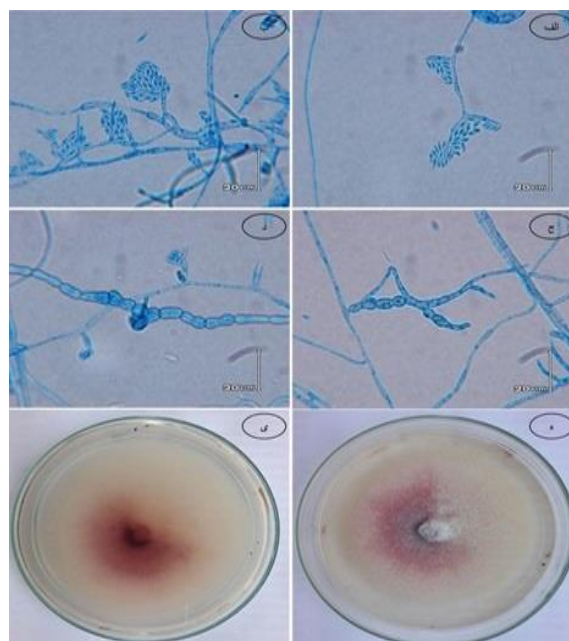
نتایج جستجوی BLASTn جدایه *F. chlamydosporum* SCUA-2Sc نشان دادند توالی ITS این جدایه با سویه *F. chlamydosporum* CBS 635.76 درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲)، جدایه مطالعه‌شده با سویه شناخته‌شده *Fusarium chlamydosporum* CBS 635.76 خوشه‌بندی شد و کلادی با ارزش بوت استراپ ضعیف ۶۸ درصد ایجاد کرد.

*Fusarium proliferatum* (Matsush.)  
Nirenberg, Mitteilungen der Biologischen  
Bundesanstalt für Land- und  
Forstwirtschaft 169: 38 (1976) (شکل ۹)

۳ جدایه از این گونه (از جمله *F. proliferatum* SCUA.2Rd) از ریشه و ساقه گیاهان سالم لوبیا چشم‌بلبلی در اکیوش، شوش و مراونه جداسازی شدند. قطر پرگنه روی محیط کشت PDA پس از ۷ روز در شرایط دمایی  $28 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد برابر ۵۵ میلی‌متر و رنگ پرگنه از روبه‌رو نارنجی کم‌رنگ و از پشت پتری نارنجی پررنگ است. سلول کنیدیوم‌ها باریک و مونوفیلید یا پلی‌فیالید است. ماکروکنیدیوم‌ها تقریباً باریک و راست و دارای ۳ تا ۴ دیواره عرضی (بیشتر ۳ دیواره عرضی) هستند. اندازه ماکروکنیدیوم‌ها  $2/9 - 2/3 \times 19/6 - 13/6$  میکرومتر است. میکروکنیدیوم‌ها تخم‌مرغی یا دوکی‌شکل و دارای صفر تا ۱ دیواره عرضی هستند و گاهی اوقات در توده‌هایی کروی در انتهای فیالیدها تشکیل می‌شوند و ابعاد آنها  $3 - 2 \times 2/8 - 1/8$  است. کلامیدوسپور در این گونه مشاهده نمی‌شوند.

نتایج جستجوی BLASTn جدایه *F. proliferatum* SCUA.2Rd نشان دادند توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته‌شده گونه *F. proliferatum* ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲)، جدایه *F. proliferatum* SCUA.2Rd با سویه‌های شناخته‌شده از این گونه و چندین گونه نزدیک (مانند *F. acutatum*، *F. equiseti*، *F. dlamini* و *F. concentricum*) خوشه‌بندی شد و کلادی با ارزش بوت‌استرپ ۵۹ درصد ایجاد کرد.

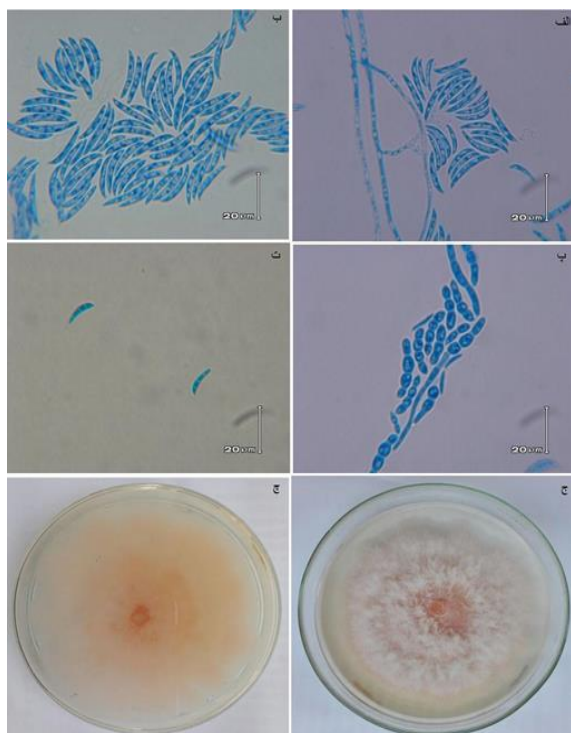
دارند. ماکروکنیدیوم‌ها راست هستند و در برخی مواقع خمیدگی کمی در آنها دیده می‌شود. میکروکنیدیوم‌ها یک سلولی و خمیده هستند و اندازه آنها  $3/1 - 3/3 \times 2/3 - 13/6 - 4/8$  میکرومتر است. کلامیدوسپورها در این گونه فراوان هستند و به شکل انفرادی یا زنجیری در طول ریشه‌ها تشکیل می‌شوند.



شکل ۸- جدایه *F. nygamai* SCUA-7Rs الف، ب، ج، د. ریشه، کنیدیوم‌بر، فیالید، کلامیدوسپور و کنیدیوم‌ها؛ ه، ی. شکل پرگنه هفت‌روزه روی محیط کشت PDA

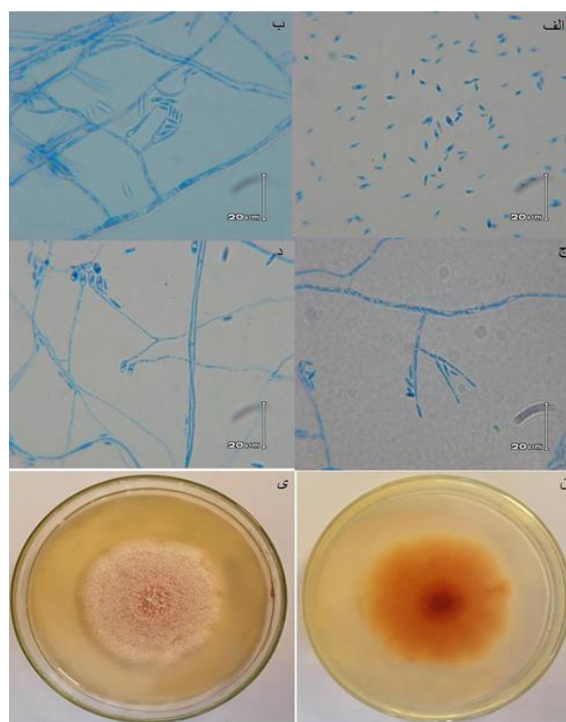
نتایج جستجوی BLASTn جدایه *F. nygamai* SCUA-7Rs نشان دادند توالی ITS این جدایه با سویه شناخته‌شده *F. nygamai* CBS 749.97 ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲) جدایه مطالعه‌شده با سویه *F. nygamai* CBS 749.97 خوشه‌بندی شد و کلادی با ارزش بوت‌استرپ ۹۱ درصد ایجاد کرد.

میکروکنیدیوم‌ها تقریباً کلیوی تا دوکی شکل هستند و اغلب یک یا دو سلولی و گاهی سه سلولی دیده می‌شوند. اندازه میکروکنیدیوم‌ها  $3/5 \times 31/8 - 23/5$  میکرومتر است. میکروکنیدیوم‌ها کلامیدوسپورها انفرادی یا زنجیری تشکیل می‌شوند.



شکل ۱۰- جدایه *Fusarium* sp. SCUA-4Rd. الف، ب، پ، ت. ریشه، کلامیدوسپور، کنیدیوم‌بر و کنیدیوم‌ها. ج، پ. شکل پرگنه هفت‌روزه روی محیط کشت PDA

نتایج جستجوی BLASTn جدایه‌های مطالعه‌شده از این گونه (جدایه‌های SCUA-4Rb، SCUA-4Rd، SCUA-2Rc و SCUA-1Rc، Vig-Ah) نشان دادند توالی ITS این گونه با سویه‌های شناخته‌شده از گونه‌های *F. chlamyosporum* و *F. equiseti* ۹۹ درصد شباهت نوکلئیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲)، جدایه‌های مطالعه‌شده این گونه و جدایه *F.*

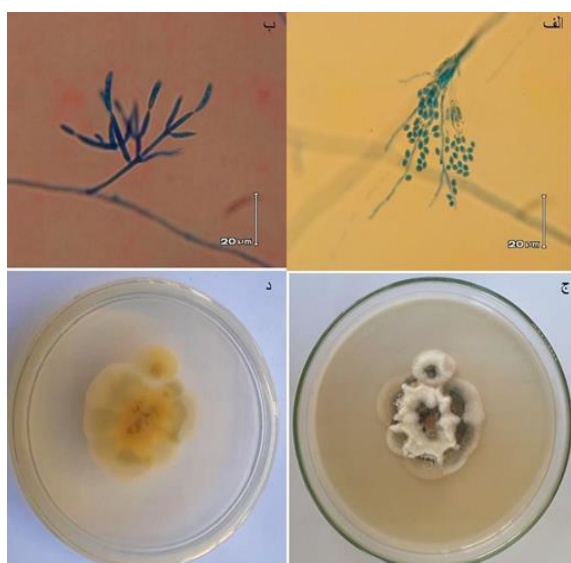


شکل ۹- جدایه *F. proliferatum* SCUA.2Rd. الف، ب، ج، د. ریشه، کنیدیوم‌بر، فیلید و کنیدیوم‌ها؛ ن، ی. شکل پرگنه هفت‌روزه روی محیط کشت PDA.

### شکل (۱۰) *Fusarium* sp.

جدایه‌های SCUA-، SCUA-4Rb، SCUA-4Rd، SCUA-2Rc و SCUA-7Rf، 1Rc از ریشه سالم گیاه لوبیا چشم‌بلبلی از مزارع لوبیاکاری منطقه اکیوش، اهواز، شوش و مراونه جداسازی شدند.

قطر پرگنه روی محیط کشت PDA پس از ۷ روز در شرایط دمایی  $28 \pm 0/5$  درجه سانتی‌گراد برابر ۸۰ میلی‌متر است. پرگنه کرکی شکل و در ابتدا سفیدرنگ است و پس از گذشت چند روز به نارنجی کم‌رنگ تغییر می‌کند. سلول کنیدیوم‌ها غالباً مونوفیلید، کوتاه و غیرمنشعب است و کنیدیوم‌ها روی سلول کنیدیوم‌ها به شکل مجتمع هستند. ماکروکنیدیوم‌ها غالباً داسی شکل با انتهای مخروطی شکل دیده می‌شوند. ماکروکنیدیوم‌ها دارای ۳ تا ۶ دیواره عرضی هستند و اندازه آنها  $4/3 -$



شکل ۱۱- جدایه *P.oxalicum* SCUA-6Sd-Vig-Ht. الف، ب. ریشه، کنیدیوم‌بر، فیالید و کنیدیوم‌ها؛ ج، د. شکل پرگنه پس از ۷ روز روی محیط کشت PDA

*Curvularia mosaddeghii* M. Mehrabi-Koushki & R. Farokhinejad, *Mycosphere* 9 (4): 641 (2018) (شکل ۱۲)

جدایه *C. mosaddeghii* SCUA-1Rb2 از ریشه گیاه سالم لوبیا چشم‌بلبلی از مزارع لوبیاکاری اهواز جداسازی شد.

ریشه‌ها منشعب و به رنگ قهوه‌ای روشن دیده می‌شوند. کنیدیوم‌برها قهوه‌ای‌رنگ هستند و ابعاد آنها  $4/4-4/4 \times 162/6-127/6$  میکرومتر است. انتهای کنیدیوم‌برها زیگزاکی شکل دیده می‌شود و خروج کنیدیوم از کنیدیوم‌برها از نوع زیگزاکی است. کنیدیوم‌ها چهارحجره‌ای و دو سلول انتهایی کنیدیوم‌ها بسیار روشن و شفاف و دو سلول میانی تیره‌تر هستند. حجره سوم بزرگ و انحنادار است. طول و عرض کنیدیوم‌ها  $21/8-23/5 \times 9/8-10/5$  میکرومتر است.

نتایج جستجوی BLASTn جدایه *C. mosaddeghii* SCUA-1Rb2 نشان دادند توالی ITS

جدایه *chlamydosporum* SCUA-2Sc با سویه‌های شناخته‌شده این دو گونه (*F. chlamydosporum* CBS 635.76 و *F. equiseti* NRRL 26419) و گونه‌های نزدیک *F. incarnatum* و *F. sambucinum* خوشه‌بندی شدند و کلادی با ارزش بوت‌استرپ ۸۵ درصد ایجاد کردند.

*Penicillium oxalicum* Currie & Thom, *Journal of Biological Chemistry* 22: 289 (1915) (شکل ۱۱)

جدایه *P.oxalicum* SCUA-6Sd از ساقه سالم گیاه لوبیا چشم‌بلبلی از مزارع لوبیاکاری جاده هفت‌تپه جداسازی شد.

قطر پرگنه روی محیط کشت PDA پس از ۷ روز در شرایط دمایی  $28 \pm 0/5$  درجه سانتی‌گراد برابر ۴۲ میلی‌متر است. رنگ پرگنه در مرکز سبز و در حاشیه سفید مایل به کرم است و از پشت تشتک پتری کرم مایل به زرد دیده می‌شود. کنیدیوم‌برها بیشتر Biverticillate هستند. فیالیدها استوانه‌ای تا نیزه‌ای هستند و ابعاد آنها  $4/1-23/3-18$  میکرومتر است. میزان اسپوردهی فراوان، اسپورها شفاف، تخم‌مرغی شکل با سطح صاف و اندازه آنها  $3/3-4/7 \times 2/9-5/6$  میکرومتر است.

نتایج جستجوی BLASTn جدایه *P.oxalicum* SCUA-6Sd نشان دادند توالی ITS این جدایه با سویه شناخته‌شده *P. oxalicum* CBS 219.30 ۹۹ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲) جدایه مطالعه‌شده با سویه شناخته‌شده *P. oxalicum* CBS 219.30 و سویه‌ای از گونه *P. asturianum* خوشه‌بندی شد و کلادی با ارزش بوت‌استرپ ۹۴ درصد ایجاد کرد.

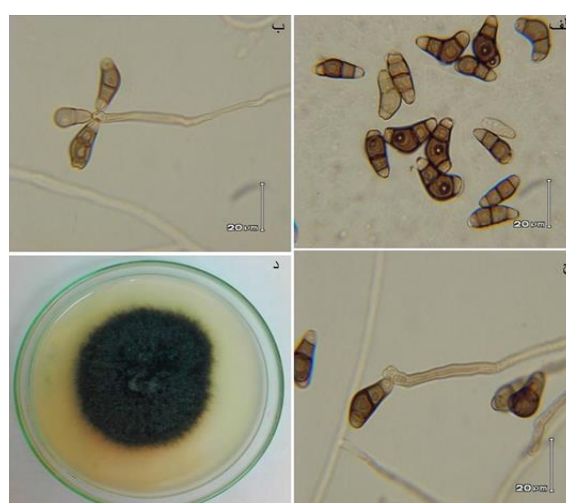
سه حجره‌ای دیده می‌شود. شکل کنیدیوم‌ها راست است و هیچ انحنايي در آنها دیده نمی‌شود. کنیدیوم‌ها استوانه‌ای تا تخم‌مرغی شکل و در تمام طول خود به رنگ قهوه‌ای روشن هستند. اندازه کنیدیوم‌ها ۹/۶-۱۳/۲×۲۴/۳ میکرومتر است.



شکل ۱۳- جدایه *Curvularia* sp. SCUA-1Sb. الف، ج، د. کنیدیوم‌بر و کنیدیوم‌ها، ب. شکل پرگنه پانزده‌روزه روی محیط کشت PDA

نتایج جستجوی BLASTn جدایه *Curvularia* sp. SCUA-1Sb نشان دادند توالی ITS این جدایه با سویه‌های شناخته‌شده از گونه‌های *Curvularia buchloes* (CBS 246.49) و *Curvularia spicifera* (CBS 274.52) ۹۸ تا ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲)، جدایه *Curvularia* sp. SCUA-1Sb از سایر گونه‌های شناخته‌شده نزدیک جدا شد و همراه با سایر سویه‌های *Curvularia* در کلادی بزرگ با ارزش بوت‌استراپ ۸۸ درصد قرار گرفت.

این جدایه با سویه شناخته‌شده *C. mosaddeghii* IRAN 3123C ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲) جدایه *C. sp. SCUA-1Sb* با سویه *C. mosaddeghii* IRAN 3123C خوشه‌بندی شد و کلادی با ارزش بوت‌استراپ ۸۳ درصد ایجاد کرد.



شکل ۱۲- جدایه *C. mosaddeghii* SCUA-1Rb2. الف، ب، ج. ریشه، کنیدیوم‌بر و کنیدیوم‌ها؛ د. شکل پرگنه روی محیط کشت

### (شکل ۱۳) *Curvularia* sp.1

۶ جدایه از این گونه (از جمله *Curvularia* sp. IRAN 3120C) از ساقه گیاهان سالم لوبیا چشم‌بلبلی در اهواز، اندیمشک، اکیوش، صفی‌آباد و هفت‌تپه جداسازی شدند.

کنیدیوم‌برها به رنگ قهوه‌ای روشن با ابعاد ۵/۷۲-۷۲/۳۵-۹۱/۳×۵/۱۸ میکرومتر هستند. در محل جدا شدن کنیدیوم از سلول کنیدیوم‌برها خمیدگی پیدا می‌کنند و به شکل زخم‌مانند دیده می‌شوند. کنیدیوم‌زایی به شکل زیگزاگ است. کنیدیوم در این جدایه‌ها بیشتر چهارحجره‌ای و گاهی

نتایج جستجوی BLASTn جدایه‌های SCUA-1Ra، SCUA-1Rh و SCUA-4Sc نشان دادند توالی ITS این جدایه‌ها با سویه‌های شناخته‌شده از گونه‌های *Curvularia buchloes* (CBS 246.49) و *Curvularia spicifera* (CBS 274.52) ۹۸ تا ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی دارد. در درخت فیلوژنتیکی ترسیمی درست‌نمایی بیشینه مبتنی بر ناحیه ITS (شکل ۲)، جدایه‌های مطالعه‌شده با دو گونه نزدیک *Curvularia buchloes* و *Curvularia spicifera* خوشه‌بندی شدند و کلادی با ارزش بوت‌استرپ ۸۶ درصد ایجاد کردند.

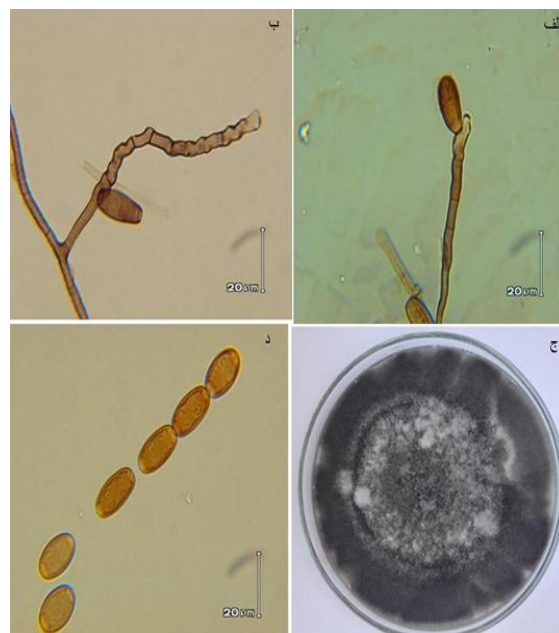
### بحث و نتیجه‌گیری

جدایه‌های اندوفیت شناسایی شده در پژوهش حاضر بر اساس بررسی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی به گونه‌های *Alternaria sp.*، *Alternaria destruens*، *Curvularia sp.*، *Curvularia mosaddeghii*، *F. nygamai*، *Fusarium chlamyosporum*، *F. proliferatum falciforme*، *Penicillium* و *Macrophomina phaseolina oxalicum* تعلق داشتند. ویلسون<sup>۲۱</sup> اندوفیت‌ها را قارچ‌ها یا باکتری‌هایی معرفی کرده است که در تمام یا بخشی از چرخه زندگی خود به بافت‌های گیاهان زنده حمله و آلودگی کاملاً غیرآشکار و بدون نشانه‌ای را داخل بافت‌های گیاهی ایجاد می‌کنند. در مطالعه حاضر، ۶۰ جدایه اندوفیت از ۱۲ گونه قارچی در گیاه لوبیا چشم‌بلبلی جداسازی و شناسایی شدند که بیشتر جدایه‌ها به سه جنس *Fusarium*، *Alternaria* و *Curvularia* تعلق داشتند. در مطالعه‌های پیشین نیز ثابت شده است قارچ‌هایی که تولید کنیدیوم‌های چندسلولی تیره می‌کنند (مانند *Alternaria* و *Curvularia*) از مهم‌ترین اندوفیت‌های گیاهی در

### (شکل ۱۴) *Curvularia* sp.2

۵ جدایه از این گونه (از جمله جدایه‌های IRAN 3121C، IRAN 3124C، 3125C) از ریشه و ساقه گیاهان سالم لوبیا چشم‌بلبلی در اهواز و اندیمشک جداسازی شدند.

قطر پرگنه روی محیط کشت PDA پس از ۷ روز در شرایط دمایی  $28 \pm 0.5$  درجه سانتی‌گراد برابر ۶۵ میلی‌متر است. کنیدیوم‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن، غیرمنشعب و دیواره‌دار هستند و خمیدگی زانویی شکل در انتهای آنها دیده می‌شود. ابعاد کنیدیوم‌ها  $5/5 - 6/9 \times 4/9 - 8/1$  میکرومتر است. کنیدیوم‌ها بیضوی شکل، غالباً راست و به‌ندرت انحنا دار هستند و چهار حجره‌ای هستند. ابعاد کنیدیوم‌ها  $8/7 - 8/1 \times 23/8$  میکرومتر است. کنیدیوم‌ها به شکل زیگزاگی از کنیدیوم‌ها جدا می‌شوند و زخم‌هایی در محل جدا شدن کنیدیوم‌ها از کنیدیوم‌ها دیده می‌شوند.



شکل ۱۴- جدایه *Curvularia* sp. IRAN 3121C، الف، ب، د. ریشه، کنیدیوم‌بر و کنیدیوم‌ها؛ ج. شکل پرگنه پانزده‌روزه روی محیط کشت PDA



(*Solanum melongena* L.) *vulgare* L.) بادنجان و انبه (*Mangifera indica* L.) گزارش شده است (۲۸). در گذشته، این گونه به‌عنوان قارچ اندوفیت از گیاه جاتروفا (*Jatropha curcas*) (۲۹) و درختان هلو (*Prunus persica* (L.) Batsch) (۱۰) نیز جداسازی شده است. *M. phaseolina* عامل پوسیدگی ذغالی شناخته شده است و دامنهٔ میزبانی وسیعی (بیش از ۵۰۰ گونه‌ی گیاهی) دارد (۳۰)؛ لوبیا چشم‌بلبلی یکی از میزبان‌های این بیمارگر است که ایجاد بیماری در آن به مرحلهٔ رشدی گیاه و شرایط محیطی بستگی دارد. جداسازی این بیمارگر از ریشهٔ گیاهان سالم چالش‌برانگیز است و در نظر گرفتن آن به‌عنوان اندوفیت یا بیمارگری که مراحل اولیهٔ آلودگی اش را طی می‌کند و هنوز به ظهور نشانه منجر نشده است محل ابهام است. چودهاری و کائوشینک<sup>۱۰</sup> این گونه را به‌عنوان اندوفیت از روی ساقهٔ گیاه *Ocimum sanctum* گزارش کرده‌اند (۳۱). در ایران نیز حسن‌زاده<sup>۱۱</sup> آن را به‌عنوان اندوفیت از ریشهٔ گیاه گاوپنبه جداسازی کرده است (۳۲). سانگ<sup>۱۲</sup> و همکاران قارچ *F. falciforme* را به‌عنوان اندوفیت از گیاه *Mascarena lagenulis* جداسازی کرده‌اند (۳۳). *F. chlamydosporum* یکی از عوامل پوسیدگی فوزاریومی ریشه و طوقه است (۳۴)؛ این گونه به‌عنوان قارچ اندوفیت از گیاه *Dendrobium cerumenatum* گزارش شده است (۳۵). جداسازی این قارچ به‌عنوان اندوفیت احتمالاً مرحلهٔ نهفتهٔ آلودگی و پیش از ظهور نشانه‌ها است. گونه‌های *Fusarium* از مهم‌ترین اندوفیت‌های شناخته‌شده هستند (۳۶). گونهٔ *F. nygamai* معمولاً از روی بقایای گیاهی خاک‌های خشک گرمسیری و یا در ارتباط با ریشه‌های غلات جداسازی شده است (۳۷). این گونه به‌عنوان اندوفیت از ریشهٔ گیاه پنبه نیز گزارش

مناطق گرم و معتدل هستند (۲۲ و ۲۳). مقایسهٔ قارچ‌های اندوفیت در مناطق جغرافیایی مختلف نشان می‌دهد مناطق گرمسیری نسبت به مناطق شمالی سردسیری و یا معتدل تنوع اندوفیتی بیشتری دارند (۲۴). در مطالعهٔ حاضر نیز ۱۲ اندوفیت قارچی در گیاهان سالم لوبیا چشم‌بلبلی منطقه‌ای گرمسیری ردیابی و شناسایی شدند که تنوع گونه‌ای درخور توجهی را نشان می‌دهند. قارچ‌های اندوفیت در تمام طول عمر بافت گیاهی آلوده به اندوفیت و یا برای مدت زمان طولانی (تا زمانی که شرایط محیطی برای قارچ مساعد باشد و تکامل میزبان برای استفادهٔ قارچ تغییر نکند) به‌طور نهفته داخل گیاه میزبان خود باقی می‌مانند اما ممکن است پس از آن به حالت بیماری‌زا تبدیل شوند (۲۵). سیر<sup>۹</sup> بیان کرده است طی مدتی که اندوفیت‌ها به‌ویژه قارچ‌ها درون گیاه زندگی می‌کنند ممکن است رابطهٔ آنها از همزیست به حالت بیمارگر (عامل بیماری‌زا) و یا برعکس تغییر کند (۲۶). بررسی قارچ‌های اندوفیت در مطالعهٔ حاضر گویای اینست که تعدادی از آنها (از جمله *M. phaseolina* و *F. chlamydosporum*) قارچ‌های بیمارگر هستند و این نشان می‌دهد مرز زندگی اندوفیتی و بیمارگری قابل‌تفکیک نیست و شرایط محیطی و وضعیت تغذیه نوع برهم‌کنش را تغییر می‌دهد.

حضور اندوفیتی گونه‌های *Alternaria* در گیاهان مختلف (از جمله گیاهان *Suaeda fruticosa*، *Aeluropus*، *Alhagi mannifera*، *aegyptiaca*، *Malva*، *Salicornia europaea*، *Jagopoides*، *Polypogon* و *Cynodon dactylon parviflora* *monspeliensis*) به‌خوبی شناخته شده است (۲۷). گونهٔ *A. destruens* در ایران از گیاهان آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.)، جو (*Hordeum*

- great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2011; 90(6): 1829-1845.
- (4) Weber D. Endophytic fungi, occurrence and metabolites. In: Anke T., Weber D., editors. *Physiology and Genetics*. Berlin: Springer; 2009: 153-196.
- (5) Li HY., Wei DQ., Shen M., Zhou ZP. Endophytes and their role in phytoremediation. *Fungal Diversity* 2012; 54(1): 11-18.
- (6) Surette MA., Sturz AV., Lada RR., Nowak J. Bacterial endophytes in processing carrots (*Daucus carota* L. var. *sativus*): their localization, population density, biodiversity and their effects on plant growth. *Plant Soil* 2003; 253: 381-390.
- (7) Gange AC., Dey S., Currie AF., Sutton BVC. Site- and species-species differences in endophyte occurrence in two herbaceous plants. *Ecology* 2007; 95: 614-622.
- (8) Arnold AE., Herre EA. Canopy cover and leaf age affect colonization by tropical fungal endophytes: ecological pattern and process in *Theobroma cacao* (Malvaceae). *Mycologia* 2003; 95: 388-398.
- (9) Dehghanpour-Farshah S., Sharifnabi B., Mirlohi AF. Endophytic species of *Neotyphodium* on some gramineous species in Iran. *Rostaniha* 2005; 6: 131-150.
- (10) Hashemloo E., Jamali Zavareh AH., Ghosta Y. Taxonomic study of endophytic species of *Alternaria* from *Prunus* trees in Urmia and Miandoab in W Azarbaijan province (NW Iran). *Rostaniha* 2015; 16(1): 88-100.
- (11) Khorsandi S., Nikbakht A., Sabzalian MR., Sharifnabi B. Effect of age and tree tissue on endophytic fungi presence, nutrient content and morphological characteristics of plane trees. *Iranian Journal of Horticultural Science and Technology* 2014; 15(3): 317-330.
- (12) Hergholi N., Ghosta Y., Javan-Nikkhah M., Campisano A., Pancher M. New species of endophytic fungi from grapevine (*Vitis vinifera*) in Iran. *Rostaniha* 2015; 16(1): 17-35.
- شده است (۳۸). در گذشته، والینو<sup>۱۳</sup> و همکاران گونه *F. proliferatum* را به‌عنوان گونه اندوفیت از برنج جداسازی کرده‌اند (۳۶). لارنا<sup>۱۴</sup> و همکاران گزارش کرده‌اند جدایه‌هایی از قارچ *P. oxalicum* باعث کاهش شدت بیماری پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی در اثر *Verticillium dahlia* f.sp. و *F. oxysporum* در شرایط گلخانه و مزرعه می‌شوند (۳۹).
- اغلب گونه‌های *Curvularia* ساپروفیت هستند اما تعدادی از آنها بیمارگرهای گیاهی، جانوری و انسانی هستند (۴۰). همانند آنچه در مطالعه حاضر ردیابی و شناسایی شد تعدادی از گونه‌های *Curvularia* گیاهان ارتباط اندوفیتی دارند (۴۱-۴۳).
- این نخستین مطالعه‌ای است که حضور اندوفیتی قارچ‌های *Alternaria sp.*، *Alternaria destruens*، *F. Fusarium chlamydosporum*، *M. phaseolina* و *F. proliferatum*، *F. falciforme*، *nygamai* و *Penicillium oxalicum* را در گیاه لوبیا چشم‌بلبلی گزارش می‌کند.

### سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز برای حمایت مالی پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌شود.

### References

- (1) Liu X., Dong M., Chen X. Antimicrobial activity of an endophytic *Xylaria* sp. YX 28 and identification of its antimicrobial compound methylcoimarim. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2008; 78: 241-247.
- (2) Tan RX., Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports* 2001; 18: 448-459.
- (3) Aly AH., Debbab A., Proksch P. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with

- (13) Babaahmadi G., Mehrabi-Koushki M., Hayati J. *Allophoma hayatii* sp. nov., an undescribed pathogenic fungus causing dieback of *Lantana camara* in Iran. *Mycological Progress* 2018; 17(3): 365-379.
- (14) Raeder U., Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology* 1985; 1: 17-20.
- (15) Ahmadpour SA., Mehrabi-Koushki M., Farokhinejad R. *Neodidymelliopsis farokhinejadii*, a new fungal species from dead branches of trees in Iran. *Sydowia* 2017; 69: 171-182.
- (16) White TJ., Bruns T., Lee S., Taylor JL. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA., Gelfand DH., Sninsky JJ., White TJ., editors. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press; 1990: 315-322.
- (17) O'Donnell K. *Fusarium* and Its near relatives. In: Reynolds DR., Taylor JW., editors. *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. Wallingford: CABI Publishing; 1993: 225-233.
- (18) Heidari K., Mehrabi-Koushki M., Farokhinejad R. *Curvularia mosaddeghii* sp. nov., a novel species from the family Pleosporaceae. *Mycosphere* 2018; 9: 635-646.
- (19) Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; 41: 95-98.
- (20) Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipiński A., Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 2013; 30: 2725-2729.
- (21) Wilson D. Endophyte: the evolution of a term, and clarification of its use and definition. *Oikos* 1995; 73: 274-276.
- (22) Morakotkarn D., Kawasaki H., Seki T. Molecular diversity of bamboo-associated fungi isolated from Japan. *FEMS Microbiology Letter* 2006; 266: 10-19.
- (23) Wang B., Priest MJ., Davidson A., Brubaker CL., Woods MJ., Burdon JJ. Fungal endophytes of native *Gossypium* species in Australia. *Mycological Research* 2007; 111: 347-354.
- (24) Gonzalez V., Tello ML. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity* 2011; 47(1): 29-42.
- (25) Debbab A., Aly AH., Proksch P. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. *Fungal Diversity* 2011; 49 (1): 1-12.
- (26) Sieber TN. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists? *Fungal Biology Reviews* 2007; 21(2): 75-89.
- (27) Mehrabi-Koushki M., Khodadadi-Pourarpanahi S., Jounbozorgi S. Fungal endophytes associated with some thermo-tolerant plants in salt-stress ecosystem. *Mikologiya I Fitopatologiya* 2018; 52(3): 187-195.
- (28) Ershad D. *Fungi of Iran*. 3rd ed. Tehran: Iranian Research Institute of Plant Protection; 2009.
- (29) Kumar S., Kaushik N. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *Plos One* 2013; 8: e56202.
- (30) Sinclair JB. *Compendium of soybean disease*. USA: American phytopathology Society; 1982.
- (31) Chowdhary K., Kaushik N. Fungal endophyte diversity and bioactivity in the Indian medicinal plant *Ocimum sanctum* Linn. *Plos One* 2015; 10(11): 141-144.
- (32) Hassanzadeh A., Tajick Qanbari MA., Aldaghi M., Babaeizad V. *First report of Macrophomina phaseolina from Abutilon theophrasti roots in Iran*. 3rd Iranian Mycological Congress, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran; 2017.

- (33) Song JJ., Pongank W., Soyong K. Antifungal activity of endophytic fungi from palm trees against *Coffi* Anthracnose caused by *Colletotrichum coffeanum*. *International Journal of Agricultural Technology* 2016; 12(3): 623-635.
- (34) Khorshidi kashani K., Mirabolfathy M., Rezaee danesh Y. *Fusarium* root and crown rot disease of turfgrass. *Forest and Range Protection Research* 2014; 11(1): 31-45.
- (35) Siddiquee S., Yusuf UK., Izzati-Mohd-Zainudin NA. Morphological and molecular detection of *Fusarium chlamydosporum* from root endophytes of *Dendrobium crumenatum*. *African Journal of Biotechnology* 2010; 9(26): 4081-4090.
- (36) Vallino M., Greppi D., Novero M., Bonfant P., Luppoto E. Rice root colonization by mycorrhizal and endophytic fungi in aerobic soil. *Annals of Applied Biology* 2009; 154: 195-204.
- (37) Burgess LW., Trimboli D. Characterization and distribution of *Fusarium nygamai*, sp. nov. *Mycologia* 1986; 78: 223-229.
- (38) Zhang J., Howell CR., Wheeler MH. Frequency of isolation and the pathogenicity of *Fusarium* species associated with roots of healthy cotton seedlings. *Mycological Research* 1995; 100: 747-752.
- (39) Larena I., Sabuquillo P., Melgarejo P., De cal A. Biocontrol of *Fusarium* and *Verticillium* wilt of tomato *Penicillium oxalicum* under green house and field condition. *Journal of Phytopathology* 2003; 151: 507-512.
- (40) Manamgoda DS., Rossman AY., Castlebury LA., Chukeatirote E., Hyde KD. Taxonomic and phylogenetic re-appraisal of the genus *Curvularia* (Pleosporaceae): human and plant pathogens. *Phytotaxa* 2015; 212: 175-198.
- (41) Tadych M., Bergen M., Johnson JC., Polashock J., Vorssa N. Endophytic and pathogenic fungi of developing cranberry ovaries from flower to mature fruit: diversity and succession. *Fungal Diversity* 2012; 54: 101-116.
- (42) Gautam AK., Kant M., Thakur Y. Isolation of endophytic fungi from *Cannabis sativa* and study their antifungal potential. *Archive of Phytopathology and Plant Protection* 2013; 46: 627-635.
- (43) Jena SK., Tayung K. Endophytic fungal communities associated with two ethno-medicinal plants of Similipal Biosphere Reserve, India and their antimicrobial prospective. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 2013; 3: 7.

---

<sup>1</sup>- Dehghanpour

<sup>2</sup>- Hashemloo

<sup>3</sup>- Khorsandi

<sup>4</sup>- Heroghly

<sup>5</sup>- Raeder & Broda

<sup>6</sup>- BioEdit ver 4.0.6.2

<sup>7</sup>- MEGA Ver. 6

<sup>8</sup>- Wilson

<sup>9</sup>- Sieber

<sup>10</sup>- Chowdhary and Kaushik

<sup>11</sup>- Hasanzadeh

<sup>12</sup>- Song

<sup>13</sup>- Vallino

<sup>14</sup>- Larena