مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی مقدماتی قارچ‌های اندوفیت و همراه بیماری زوال مو در استان زنجان

سحر پازوکی[۱]، اعظم شکاری اسفهلان[۲]، مژده ملکی[۳]، شهرام نعیمی[۴]

۱، ۳- دانشجوی دکتری تخصصی بیماری‌شناسی گیاهی، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده کشاورزی، تهران، ایران.

۲، ۴- استادیار، دانشیار، موسسه تحقیقات گیاه پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.

مسئولین مکاتبات: اعظم شکاری اسفهلان، مژده ملکی، ایمیل azshek5713@gmail.com; Mojdehmaleki@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۰۲ ۹(۲)۱۱۵-۱۳۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۵

چکیده

قارچ‌های اندوفیت و همراه بیماری زوال مو از تاکستان‌های استان زنجان جداسازی شدند و اثر بازدارندگی برخی از قارچ‌های جدا شده، بر رشد دو قارچ بیمارگر تنهٔ مو شامل *Cytospora chrysosperma* و *Fusarium* sp. مطالعه شد. نود و پنج جدایهٔ قارچی از از بافت‌های سالم (۶۳/۵۴ درصد) و آلوده (۳۶/۴۶ درصد) تنه و ریشهٔ مو جداسازی شد. با ضدعفونی سطحی قوی و چند مرحله‌ای، احتمال جداسازی قارچ‌های ساپروفیت و اپی‌فیت به حداقل ممکن رسانده شد؛ بنابراین قارچ‌هایی که از بافت سالم جدا شده و تست بیماریزایی‌شان مثبت نبود، اندوفیت و آنهایی که از بافت آلوده جدا شدند، قارچ همراه بیماری زوال مو قلمداد شدند. شناسایی مقدماتی ۱۳ جدایه شاخص تا سطح جنس و در مواردی گونه، بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی و توالی نوکلئوتیدی ناحیه ITS–rDNA انجام شد. جدایه‌های شناسایی شده مشتمل بر ۱۰ جنس و شامل آرایه‌های *Alternaria malorum*، *Alternaria* sp.، *Allocanariomyces tritici*، *Aaosphaeria arxii*، *Clonostachys rosea*، *Chaetomium* sp.، *Daldinia loculata*، *Daldinia* sp.، *Fusarium oxysporum*، *Fusarium* sp.، *Macrophomina phaseolina*، *Phaeoacremonium minimum* و *Stromatinia narcissi* بودند. با بررسی فعالیت آنتاگونیستی ۱۳ جدایهٔ قارچی به روش کشت متقابل، گونه‌های *F. oxysporum*، *P. minimum* و *C. rosea* بیشترین میزان بازدارندگی رشد در مقابل دو قارچ بیمارگر تنهٔ مو شامل *C. chrysosperma* و *Fusarium* sp. نشان دادند. دو گونه *A. arxii* و *S. narcissi* از بافت تنهٔ سالم جداسازی شدند و طبق اطلاعات ما برای نخستین بار به عنوان قارچ‌های اندوفیت از مو در دنیا گزارش می‌شوند. گونهٔ *D. loculata* از بافت تنهٔ آلوده جداسازی شد و برای نخستین بار به عنوان قارچ همراه بیماری‌های تنهٔ مو از دنیا گزارش می‌شود. به علاوه، دو گونهٔ *A. tritici* و *F. oxysporum* با وجود اینکه از بافت سالم ریشه جدا شده بودند، در آزمون بیماری‌زایی، باعث ایجاد شانکر داخلی در ساقه شده و برای اولین بار به عنوان بیمارگر مو از دنیا گزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: واکنش زنجیره‌ای پلیمراز، آنتاگونیست، فیلوژنی، مهار زیستی، تاکستان

مقدمه

مو (*Vitis vinifera* L.) از مهم‌ترین گونه‌های جنس *Vitis* است و یکی از مهم‌ترین درختچه‌های میوهٔ چند ساله در جهان است (Gramaje *et al.*, 2018). ایران یکی از کشورهای مهم تولیدکنندهٔ میوهٔ انگور در دنیاست. بیش از ۸۰۰ ژنوتیپ درختچهٔ مو بومی در ایران، شناسایی شده است که در نواحی مختلف آن پراکنده‌اند (Mahmoudzadeh *et al.*, 2010). مطابق آخرین آمار فائو، ایران در جایگاه یازدهم تولید میوه انگور در دنیا قرار دارد (FAO, 2020). براساس آمار رسمی، سطح زیر کشت مو در استان زنجان

۱۵۹۶۵ هکتار با میزان عملکرد ۲۳۰۲۵۵ تن است که یکی از مهم‌ترین محصولات کشاورزی استان زنجان محسوب می‌شود (Ahmadi *et al*., 2020). اندوفیت‌ها میکروارگانیسم‌هایی هستند که در بافت‌های گیاهی در طول حداقل یک مرحله از چرخه زندگی، بدون هیچ گونه علائم ظاهری بیماری و یا اثرات منفی بر میزبان خود زندگی می‌کنند (Petrini, 1992). اندوفیت‌ها نقش مهمی در حفاظت گیاهان دارند و باعث افزایش تحمل گیاهان به تنش‌های زیستی و محیطی می‌شوند (Waqas *et al*. 2012). از ۳۰۰ هزار گونه گیاهی که روی زمین وجود دارند، هر کدام میزبان یک یا چند گونه اندوفیت هستند (Bérdy, 2003 & 2005 و Strobel *et al*. قارچ‌های اندوفیت به دلیل افزایش مقاومت میزبان در برابر آفات و بیماری‌ها، گیاه‌خواران، عناصر سنگین و تنش‌های خشکی و شوری، همچنین تولید متابولیت‌های ضد میکروبی (Pimentel *et al*., 2011) و به طور کلی افزایش رشد گیاهان، دارای اهمیت هستند (Arnold *et al*. 2001). قارچ‌های اندوفیت تنوع زیستی و پویایی جمعیت بالایی دارند و به عنوان یک منبع زیستی تولیدکننده متابولیت‌های ثانویه در میزبان خود نقش ایفاء می‌کنند (Schulz *et al*., 2002; Stroubel, 2003 Schulz *et al*., 2005). تقویت در برابر عوامل بیماریزای زنده و تنش‌های غیرزیستی، از نقش‌های مهم قارچ‌های اندوفیت در حفاظت گیاهان است (Waqas *et al*., 2012). قارچ‌های اندوفیت گیاهان چوبی تنوع بالایی داشته و به گروه‌های تاکسونومیکی مختلفی تعلق دارند (Weber, 2009). طی یک مطالعه، ۱۵ گونه قارچ اندوفیت براساس مطالعات ریخت‌شناختی و مولکولی از درختچهٔ مو گزارش شد که متعلق به ۱۰ جنس شامل *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire، *Alternaria chlamydospora* Mouch.، *Alternaria malorum* (Rühle) U. Braun & Crous، *Alternaria atra* (Preuss) Woudenb. & Crous، *Arthrinium phaeospermum* (Corda) M.B. Ellis، *Arthrinium sacchari* (Speg.) M.B. Ellis، *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter، *Aspergillus wentii* Wehmer، *Beauveria bassiana* (Bals.–Criv.) Vuill.، *Cytospora punicae* Sacc.، *Chaetomium elatum* Kunze، *Epicoccum nigrum* Link. *Geosmithia pallida* (G. Sm.) M. Kolarík, Kubátová & Pa outová، *Paecilomyces variotii* Bainier، و *Verrucobotrys geranii* (Seaver) Hennebert. بودند (Hergholi *et al*., 2015). با بررسی رشد اندوفیتی قارچ *Phomopsis viticola* (Sacc.) Sacc. در بافت‌های مختلف مو و نظارت بر توزیع آن در طی فصل رشدی، ۴۶ جدایهٔ قارچی شناسایی شدند که در این میان، گونه‌های *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler. (۴۰ درصد) و *Sphaeropsis* sp. (۲۰ درصد)، بیشترین فراوانی را داشتند و گونهٔ *P. viticola*، ۳ درصد جدایه‌ها را به خود اختصاص داد (Mostert *et al*., 2000).

در منطقهٔ subalpine در شمال ایتالیا از ساقه‌های مو، ۴۱ جدایهٔ قارچی شناسایی شد. آنالیز آماری نشان داد جمعیت قارچ‌های اندوفیت مو، در باغ‌هایی که به‌صورت ارگانیک مدیریت شده بودند از باغ‌هایی که در آن‌ها از مدیریت تلفیقی آفات استفاده شده بود، متفاوت بود (Pancher *et al*., 2012).

بیماری‌های تنهٔ مو با نام‌های متداول اسکا، پتری و زوال، توسط طیف وسیعی از قارچ‌های هیفومیست ایجاد می‌شوند و سالانه خسارت‌های هنگفتی به باغداران مو، در دنیا و ایران وارد می‌کنند (Larignon & Dubos, 1997). جنس *Phaeoacremonium* هیفومیستی است که عامل تغییر رنگ بافت چوب و آوند در بیماری اسکا محسوب می‌شود (Surico *et al*., 2006). گونه‌های *Phaeomoniella chlamydospora* (W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai) Crous & W. Gams. و *Phaeoacremonium aleophilum* W. Gams, Crous, M.J. Wingf. & Mugnai. عامل قهوه‌ای شدن چوب مو در موهای بالغ است (Khan *et al*., 2000; Mostert *et al*., 2006b; Eskalen & Scheck *et al*., 1998; *et al*., 2007). گونهٔ *P. chlamydospora* مولد بیماری پتری در موهای جوان است (Díaz & Latorre, 2014). در یک مطالعهٔ میدانی از

تاکستان‌های مختلف استان فارس، دو گونه *Phaeoacremonium flatipes* W. Gams, Crous & M.J. Wingf. و *Phaeoacremonium mortoniae* Crous & W. Gams. شناسایی شدند. براساس تست بیماری‌زائی در شرایط گلخانه هر دو گونه بیماری‌زا بودند و به عنوان اولین گزارش از بیماری پتری مو در ایران معرفی شدند (Mohammadi & Banihashemi, 2012). در تحقیقی دیگر، گونه‌های *Phaeoacremonium minimum* (Tul. & C. Tul.) Gramaje, L. Mostert & Crous، *Phaeoacremonium parasiticum* (Ajello, Georg & C.J.K. Wang) W. Gams, Crous & M.J. Wingf.، *Phaeoacremonium iranianum* L. Mostert, Gräfenhan, W. Gams & Crous. و *Phaeoacremonium tuscanum* Essakhi, Mugnai, Surico & Crous. به‌عنوان عوامل بیماری‌زای شاخه و تنهٔ مو از تاکستان‌های خراسان رضوی جداسازی شدند و بیماری‌زایی این قارچ‌ها در شرایط گلخانه ثابت شد (Ghanbary *et al*., 2020). از درختچه‌های مو دارای علایم اسکا در تاکستان‌های بجنورد در استان خراسان شمالی، ۶۴ جدایهٔ قارچی جداسازی و گونه‌های *P. chlamydospora*، *P. parasiticum*، *Fomitiporia mediterranea* M. Fisch.، *Fusarium* sp.و *Phoma* sp. شناسایی شدند (Farashiani *et al*., 2012). از نمونه‌های دارای علایم زوال مو در استان‌های کرمان و کهگیلویه و بویراحمد، چهار گونه *P. tuscanum*، *Diplodia seriata* De Not.، *Botryosphaeria dothidea* (Moug.) Ces. & De Not. و *Neofusicoccum parvum* (Pennycook & Samuels) Crous, Slippers & A.J.L. Phillips. شناسایی شده و بیماریزایی‌آن‌ها اثبات شد (Arabnezhad & Mohammadi, 2013). با ارزیابی ۴۵ تاکستان در استان آذربایجان‌غربی، شایع‌ترین گونه‌های قارچی بیمارگر جداسازی شده از مو *P. chlamydospora*، *P. aleophilum*، *P. mortonieae*، *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl.، *Fusicoccum vitifusiform* Van Niekerk & Crous.، *Truncatella angustata* (Pers.) S. Hughes و *Pestalotiopsis* sp. معرفی شدند (Moshari *et al*., 2011).

جنس *Cytospora* Ehrenb. از شایع‌ترین و گسترده‌ترین قارچ‌های ایجادکننده شانکر و مرگ درختان و درختچه‌ها در سراسر جهان است. گونه *Cytospora chrysosperma* (Pers.) Fr. از میزبان‌ها و مناطق مختلف کشور گزارش شده است (Fotouhifar *et al*., 2007 & 2010). همچنین دو گونه *Cytospora cincta* Sacc. و *Cytospora leucostoma* (Pers.) Sacc. از درختچه‌های مو در استان مرکزی گزارش شده‌اند (Fotouhifar *et al*., 2010). در مطالعه‌ای در استان‌های آذربایجان شرقی و غربی، گونه *C. chrysosperma* شناسایی شد و با اثبات بیماری‌زایی در شرایط گلخانه، به عنوان بیمارگر مو گزارش شد (Arzanlou *et al*., 2015). در اسپانیا *C. chrysosperma* به‌عنوان اندوفیت چوب مو معرفی شد (González & Tello, 2011).

گونه‌های جنس *Fusarium* از گسترده‌ترین قارچ‌های بیماری‌زا در گیاهان هستند و برخی از آنها در زوال درختچه‌های جوان مو نقش دارند. قارچ *Fusarium* sp. به‌عنوان بیمارگر مو از استان فارس گزارش شده است (Mohammadi & Banihashemi, 2007). دو گونه *Fusarium brachygibbosum* Padwick. و *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. به عنوان بیمارگرهای مو از تاکستان‌های ترکیه معرفی شده‌اند (Akgul *et al*., 2019).

از آنجایی‌که میوهٔ انگور به عنوان یک محصول مهم در ایران شناخته می‌شود و طیف وسیعی از ارقام مو در استان‌های مختلف کشور کشت می‌شوند، توجه به عوامل بیماری‌زای مو و خسارات چشمگیر این عوامل، امری ضروری است. هدف از انجام این تحقیق، مطالعهٔ تاکستان‌های زنجان از نظر تنوع زیستی قارچ‌های اندوفیت و همراه بیماری‌های تنهٔ مو و بررسی فعالیت ضد قارچی قارچ‌های جداشده، بر روی دو گونهٔ قارچی بیماری‌زای تنهٔ مو شامل *C. chrysosperma* و *Fusarium* sp. بود. این یک تحقیق مقدماتی برای شناسایی متابولیت‌های ضدقارچی اندوفیت‌های مو علیه بیماری‌های تنه آن است.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری، جداسازی، مطالعه ریخت شناسی و نگه‌داری جدایه‌ها

در شهریور ماه ۱۳۹۸، از ۵۴ درختچه مو سه تا ۶۰ ساله از تاکستان‌های مناطق مختلف استان زنجان شامل رحمت‌آباد، صائین قلعه، ابهر، خرمدره، زرین‌آباد، بیجار و آقجه‌کند بازدید و از شاخهٔ، تنه اصلی و ریشه درختچه‌های سالم و بیمار با عوامل زردی و نکروز برگ‌ها، نکروز، پوسیدگی تنه و زوال نمونه برداری شد. ارقام مو مورد مطالعه شامل کشمشی، مراغه‌ای، سفید بی‌دانه و قرمز بی‌دانه بودند. نمونه‌های جمع‌آوری شده، با ثبت مشخصات مربوط به مکان و تاریخ، در داخل جعبه یونولیت حاوی یخ به آزمایشگاه انتقال داده و تا زمان کشت در دمای چهار درجه سیلسیوس نگه‌داری شدند. نمونه‌ها، زیر جریان آب شیر شسته شده و در دمای آزمایشگاه خشک شدند. نمونه‌ها به قطعات با اندازه ۵–۳ میلی متر برش داده شدند. ضدعفونی نمونه‌ها با اتانول ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه، هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به مدت دو دقیقه و به دنبال آن اتانول ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه انجام شد. شستشوی مواد ضدعفونی کننده روی نمونه‌ها، با آب مقطر سترون (۳ بار) انجام شد. نمونه‌ها با کاغذهای صافی سترون آب‌گیری شده و در محیط کشت سیب‌زمینی–دکستروز–آگار (PDA) (Potato Dextrose Agar) کشت شدند. تشتک‌های پتری در تاریکی و دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس به مدت سه تا پنج روز نگه‌داری شدند. پرگنه‌های جدایه‌های قارچی رشد یافته پیرامون قطعات به محیط کشت آب–آگار (WA) (Watre Agar)منتقل شده و به روش تک اسپور یا نوک ریسه خالص شدند. جدایه‌ها سپس به محیط کشت PDA انتقال داده شدند و به مدت ۷ تا ۱۰ روز در انکوباتور برای بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی نگه‌داری شدند. جهت مطالعات ریخت‌شناسی قارچ‌ها، اسلایدهای میکروسکوپی با استفاده از محلول‌های لاکتوفنل و لاکتوفنل‌کاتن بلو تهیه شده و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند. جدایه‌های قارچی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر شناسایی شدند و سپس ۱۳ جدایه شاخص به منظور شناسایی مولکولی، انتخاب شدند. نگه‌داری جدایه‌های قارچی، در داخل میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری در دمای چهار درجهٔ سلسیوس انجام شد.

شناسایی مولکولی قارچ‌های اندوفیت

استخراج DNA ژنومی

برای استخراج DNA ژنومی، از روش CTAB تغییر یافته استفاده شد (Mogg & Bond 2003). برای این منظور، جدایه‌های قارچی در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA کشت شدند و به مدت ۱۰ تا ۱۴ روز در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. حدود ۴۰۰–۲۰۰ میلی‌گرم از میسلیوم هر جدایه از سطح محیط کشت خراش داده شد و در هاون چینی سترون حاوی نیتروژن مایع آسیاب شد. نمونه‌ها به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی لیتری منتقل شدند و ۵۰۰ میکرولیتر بافر CTAB (۱/۴ مولار NaCl، ۲ CTAB درصد، ۲۰ EDTA میلی‌مولار، ۱۰۰ Tris–HCl میلی‌مولار با pH=8 و ۰/۲ β–mercaptoethanol درصد) به هر میکروتیوب اضافه شد. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه داخل دستگاه Heat block در دمای ۶۵ درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. پانصد میکرولیتر کلروفرم–ایزوآمیل الکل به نسبت حجمی ۱:۲۴ به هر تیوب اضافه شد و تیوب‌ها به مدت دو دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه با دمای چهار درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ شدند. فاز رویی برداشته شده و به میکروتیوب جدید منتقل شد. به نمونه‌ها ۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۱۰۰درصداضافه شد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه تا یک ساعت در دمای ۲۰– درجهٔ سلسیوس نگه‌داری شدند. نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه با دمای چهار درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ شدند. محلول رویی حذف شد و رسوب باقیمانده دوباره به مدت دو دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه با دمای چهار درجهٔ سلسیوس سانتریفیوژ شد. DNA رسوب یافته در ته میکروتیوب به مدت ۵ دقیقه در مجاورت هوای آزاد خشک شد و پس از آن، ۵۰ میکرولیتر

آب مقطر سترون به آن اضافه شد. DNA استخراج شده در دمای ۲۰- درجهٔ سلسیوس برای انجام آزمون‌های مولکولی نگه‌داری شد.

تکثیر ناحیهٔ ITS–rDNA

برای شناسایی جدایه‌های قارچی، ناحیه ITS–rDNA با استفاده از واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) تکثیر شد. برای تکثیر این ناحیه، از جفت آغازگر رو به جلو ITS1 (5'TCCGTAGTTGGACCTGCGG3') و معکوس ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') استفاده شد (White *et al*., 1990). واکنش PCR در حجم کلی ۳۰ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش شامل ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (حاوی حدود ۱۰ تا ۱۲ نانوگرم DNA)، یک میکرولیتر از هر آغازگر، ۱۵ میکرولیتر *Taq* DNA Polymerase 2x Master Mix (BIOFACT, South Korea) و ۱۲ میکرولیتر آب مقطر سترون بود. مرحله واسرشت‌سازی اولیه با برنامه حرارتی ۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت سه دقیقه شروع شد و به دنبال آن، ۳۰ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال آغازگر در دمای ۵۵ درجهٔ سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله بسط در دمای ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۴۵ ثانیه و مرحله بسط نهایی در ۷۲ درجهٔ سلسیوس به مدت ۷ دقیقه انجام شد. محصولات واکنش PCR از طریق الکتروفورز بر روی ژل آگاروز یک درصد حاوی ۰/۱ میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم بروماید در بافر 1X TAE مشاهده و بررسی شدند.

توالی‌یابی DNA و شناسایی مولکولی قارچ‌های اندوفیت

تعیین توالی نواحی تکثیر شده با استفاده از Sequencer kit شرکت Microsynth کشور سوئیس به واسطه شرکت ایرانی کدون انجام شد. تجزیه و تحلیل نتایج با استفاده از دستگاه ABI persim.® 3700 انجام شد و ویرایش داده‌های توالی‌یابی با استفاده از نرم‌افزار Bio Edit (Hall, 1999) انجام شد. توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار برخط بلاست (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) با توالی‌های موجود در بانک ژن (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) مقایسه شدند و توالی‌های با درصد تشابه بالا از بانک ژن دریافت شدند. رج‌بندی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار برخط Clustal (https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo) omega و نرم‌افزار MEGA11 (Tamura *et al*. 2021) انجام شد. جدایه‌ها به کمک تطبیق داده‌های مولکولی و ریخت‌شناسی در سطح جنس یا گونه شناسایی شدند. درخت تبارزایی برای پیدا کردن نزدیک‌ترین توالی‌های خویشاوند هر جدایه با استفاده از نرم افزار MEGA11 ترسیم شد. داده‌های توالی به بانک ژن (NCBI) ارسال شدند و کد دسترسی آنها دریافت شد.

آزمون بیماری‌زایی

با توجه به حجم زیاد جدایه‌ها، تنها سه جدایه از گونه‌های شناسایی شده، شامل *Allocanariomyces tritici* Mehrabi, Asgari & Zare.، (Link) Schroers, *Clonostachys rosea* Samuels, Seifert & W. Gams. و *Fusarium oxysporum* Schltdl. به طور تصادفی انتخاب شدند و بیماری‌زایی آنها در شرایط گلخانه مطالعه شد. آزمایش در ۴ تیمار و ۶ تکرار (۲ گلدان حاوی ۳ نهال مو) انجام شد. تیمار شاهد با محیط کشت PDA بدون قارچ مایه‌زنی شد. بیست و چهار نهال مو یک‌ساله رقم کشمشی مراغه که طبق منابع، حساس به بیماری است، تهیه شد. ساقه هر نهال ابتدا با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شد و در هر ساقه با استفاده از مته دریل، زخمی به قطر سه میلی‌متر تا رسیدن به آوند چوبی ایجاد شد. یک قطعه میسلیومی ۳×۳ میلی-متری ازحاشیه کلنی کشت‌های دو هفته‌ای قارچ‌ها داخل زخم قرار داده شد، و سپس زخم توسط پارافیلم بسته شد. گلدان‌های مایه‌زنی شده در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس، شدت نور ۴۵۰۰ لوکس و رطوبت نسبی ۴۰ درصد نگه‌داری شدند. چهار ماه بعد از مایه زنی، نهال‌ها در محل مایه‌زنی، به صورت عرضی و سپس به صورت طولی برش داده شدند و اندازه زخم‌های آوندی داخلی ساقه، سمت بالا و سمت پایین محل مایه‌زنی اندازه‌گیری شد.

عامل بیماری مجددا از حاشیه شانکرهای داخلی، طبق اصول کخ، جداسازی شد.

بررسی ویژگی ضد قارچی قارچ‌های اندوفیت جدا شده

در این مطالعه، از قارچ‌های بیمارگر مو شامل *C. chrysosperma* و *Fusarium* sp. استفاده شد که از کلکسیون قارچ‌ها در آزمایشگاه پروتئومیکس موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور تهیه شدند. برای بررسی ویژگی ضد قارچی از روش کشت متقابل استفاده شد. برای این منظور، یک دیسک پنج میلی‌متری از قارچ بیمارگر در یک سمت تشتک پتری ۹۰ میلی‌متری حاوی محیط کشت PDA و یک دیسک پنج میلی‌متری از قارچ اندوفیت در حال رشد فعال در سمت مقابل قرار داده شد. دیسک قارچ بیمارگر، به‌عنوان شاهد به تنهایی در محیط کشت جداگانه کشت شد. پتری‌ها به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس در داخل انکوباتور نگه‌داری شدند و پس از این مدت رشد شعاعی قارچ بیمارگر به سمت قارچ اندوفیت و همچنین رشد قارچ شاهد با استفاده از خط‌کش اندازه‌گیری شد. میزان درصد بازدارندگی رشد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

درصد بازدارندگی = ناحیه بازدارنده شده به میلی متر/شعاع پرگنه شاهد×۱۰۰ (Das, *et al*., 2010).

نتایج

جداسازی جدایه‌های قارچی اندوفیت

در این مطالعه تعداد ۹۵ جدایهٔ قارچی از تاکستان‌های استان زنجان جداسازی شدند که ۳۴ جدایه (۳۶/۴۶ درصد) از درختچه‌های دارای علائم بیماری و ۶۱ جدایه (۶۳/۵۴ درصد) از درختچه‌های سالم بودند.

شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچی اندوفیت

شناسایی مقدماتی قارچ‌ها با استفاده ازکلیدهای معتبر و براساس خصوصیات ریخت شناختی و نیز داده‌های حاصل ازتوالی یابی ناحیه ITS–rDNA انجام گرفت.

پس از بررسی خصوصیات ریخت‌شناسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی جدایه ها، ۱۳ جدایه به عنوان جدایه‌های نماینده انتخاب شدند و شناسایی تکمیلی تر آنها از طریق آغازگرهای ITS1 و ITS4 انجام شد (White *et al*., 1990). نتایج نشان داد که جدایه‌های شناسایی شده، همگی متعلق به شاخه آسکومیکوتا هستند. جدایه‌ها به هفت راسته *Botryosphaeriales*، *Hypocreales*، *Helotiales*، *Pleosporales*، *Sordariales*، *Togniniales* و *Xylariales* و ۱۰ جنس *Alternaria* Nees.، *Aaosphaeria*، *Allocanariomyces*، *Clonostachys*، *Chaetomium*، Kunze.، *Daldinia*، *Fusarium*، *Macrophomina*، *Phaeoacremonium* و *Stromatinia* تعلق داشتند (جدول ۱). نه گونه قارچی تا سطح گونه، و چهار جدایه، تنها تا سطح جنس، شناسایی شدند که عبارتند از: *A. malorum*، *A. arxii* (Aa) Aptroot.، *Aaosphaeria*، *Alternaria* sp.، *tritici*، *C. rosea*، *Chaetomium* sp.، *Daldinia loculata*، *F. oxysporum*، *Daldinia* sp.، (Lév.) Sacc.، *Fusarium*، *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.، *P. minimum* و *Stromatinia narcissi* Drayton & J.W. Groves. (جدول ۱). جدایه‌های GZ37 (MW560216)، *Alternaria* sp. GZ58 (MT568839)، *A. tritici* GZ64 (KC175290)، *A. arxii* GZ54 (MW081388)، *C. rosea* GZ60 (MK530694)، *Chaetomium* sp. GZ74 (MW850546)، *Fusarium* sp. (MN982764)، *oxysporum*، *M. phaseolina* GZ52 (MT127393)، *P. minimum* GZ57 (EU851106) و *S. narcissi* از گیاه سالم و جدایه‌های GZ96 (KT160310)، *A. malorum* GZ81 (MG27330) و *D. loculata* GZ36 (MK066899) از گیاه آلوده جداسازی شدند (جدول ۱).

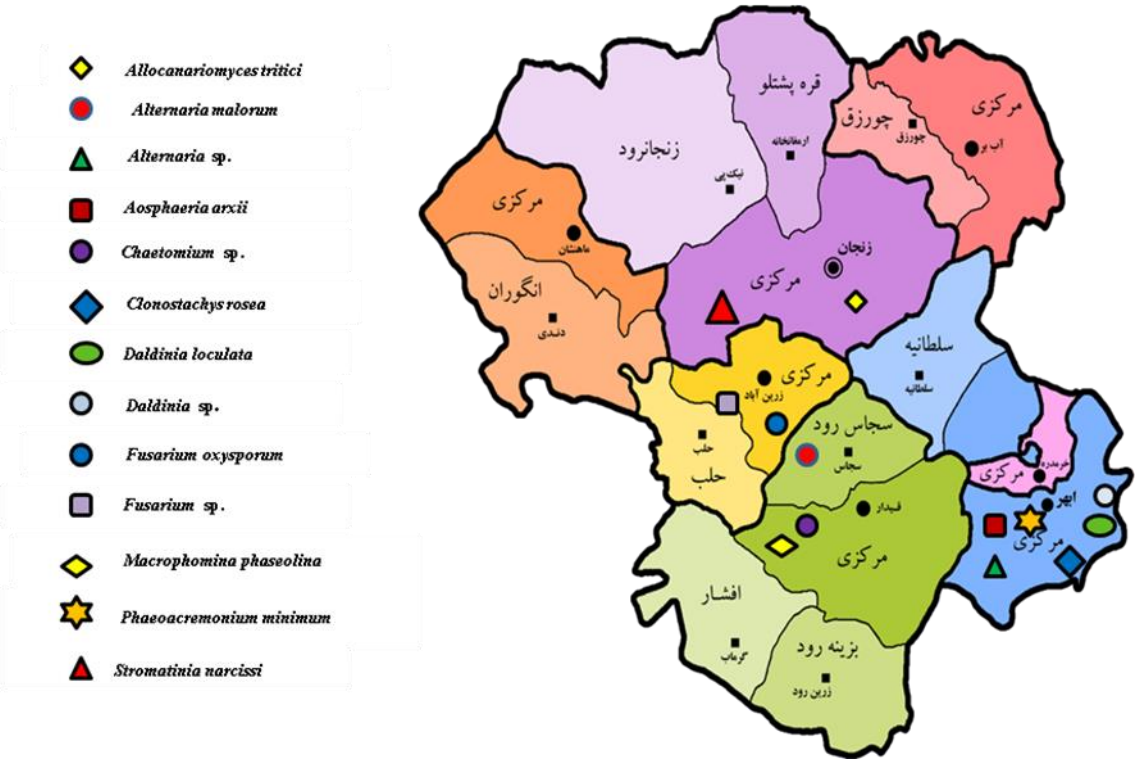
جدول۱- مشخصات کلی جدایه‌های قارچی شناسایی شده به روش مولکولی.

Table 1. Taxonomical assignment of identified fungal isolates.

Isolates	Scientific name	Accession No.	Grapevine cultivar	Isolated tissue	Infected/healthy tissue
GZ36	*Daldinia* sp.	OM760878	Keshmeshi	Stem	Infected
GZ37	*Alternaria* sp.	OM760879	White seedless Keshmeshi	Trunk	Healthy
GZ52	*Macrophomina phaseolinia*	OM760880	White seedless Keshmeshi	Root	Healthy
GZ54	*Chaetomium* sp.	OM760881	White seedless Keshmeshi	Root	Healthy
GZ57	*Stromatinia narcissi*	OM760882	Red seedless Keshmeshi	Root	Healthy
GZ58	*Allocanariomyces tritici*	OM760883	Red seedless Keshmeshi	Root	Healthy
GZ60	*Fusarium* sp.	OM760884	Keshmeshi	Root	Healthy
GZ64	*Aaosphaeria arxii*	OM760885	White seedless Keshmeshi	Root	Healthy
GZ65	*Phaeoacremonium minimum*	OM760886	White seedless Keshmeshi	Root	Healthy
GZ74	*Fusarium oxysporum*	OM760887	Maraghe Keshmeshi	Root	Healthy
GZ81	*Daldinia loculata*	OM760888	White seedless Keshmeshi	Stem	Infected
GZ83	*Clonostachys rosea*	OM760889	Red seedless Keshmeshi	Stem	Healthy
GZ96	*Alternaria malorum*	OM760890	White seedless Keshmeshi	Trunk	Infected

GZ=Grapevine zanjan

پراکنش جدایه‌های اندوفیت و همراه بیماری زوال مو بر روی نقشه استان زنجان نشان داده شده است (شکل ۱).

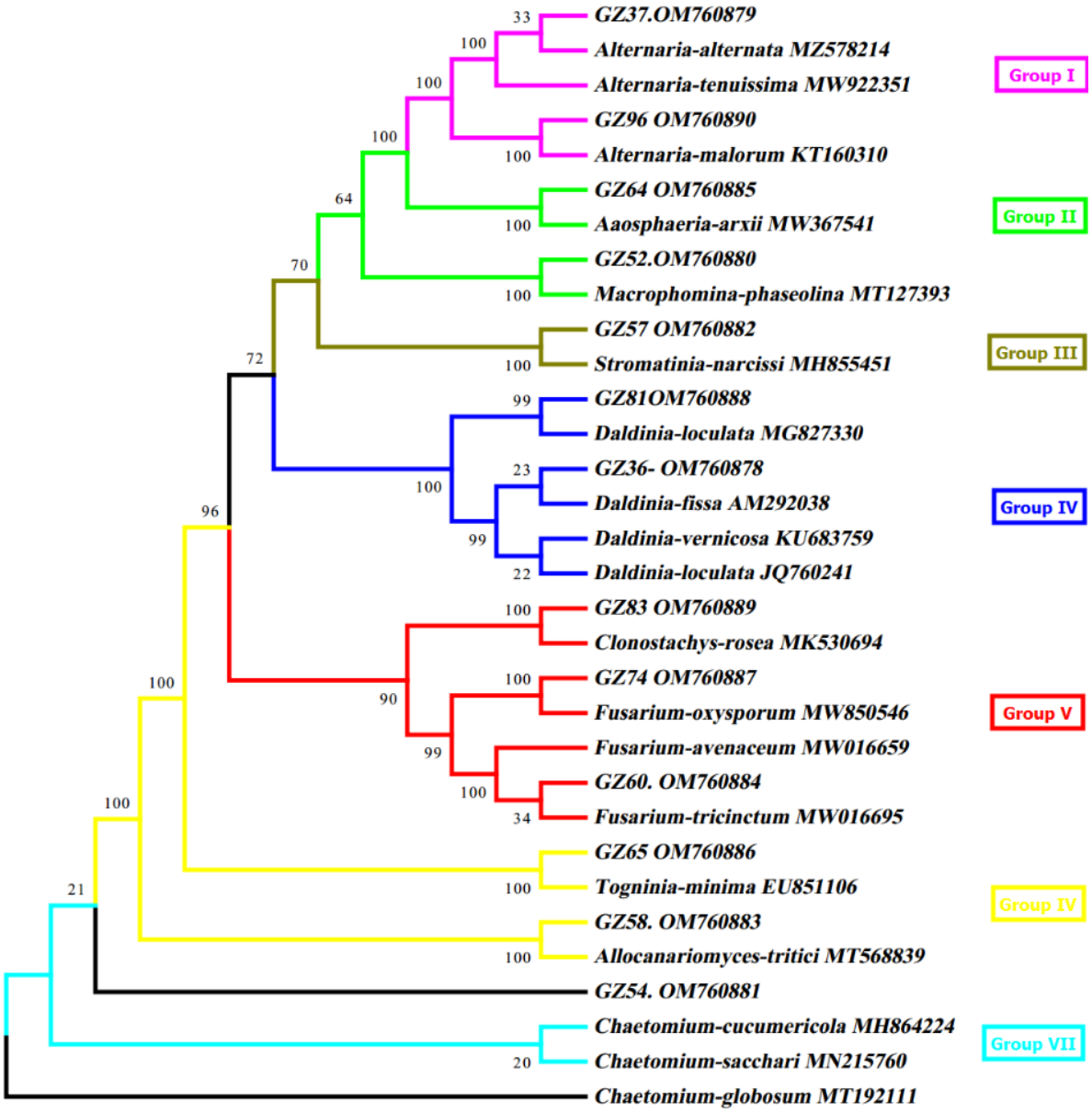


شکل۱- پراکنش جدایه‌های اندوفیت و همراه بیماری زوال مو در استان زنجان.

Fig. 1. Distribution of endophytic and grape trunk diseases associated fungal isolates in Zanjan province.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی

درخت فیلوژنتیکی ۱۳ جدایه براساس داده‌های توالی ITS با علامت اختصاری و کد دسترسی مربوطه آنها در NCBI ترسیم شد (شکل ۲). به منظور ایجاد امکان مقایسه، از نتایج بلاست هر یک از جدایه‌ها در NCBI، در ترسیم درخت فیلوژنتیکی استفاده شد. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از هم‌ترازی چندگانه توالی‌های ITS با استفاده از نرم افزار MEGA11 ایجاد شد. نتایج این بررسی نشان داد که نمونه‌های مورد بررسی در هفت گروه مختلف (Group I تا Group VII) دسته بندی می‌شوند (شکل ۲).



شکل۲– درخت فیلوژنتیکی حاصل از توالی بخشی از ناحیه ITS مربوط به جدایه‌های قارچی اندوفیت و همراه بیماری زوال مو در استان زنجان . مقادیر بوت استرپ بر پایه ۱۰۰۰ تکرار مربوط به آنالیز Neighbor–joining روی شاخه‌ها نشان داده شده است.

fungal isolates inferred from Fig. 2. Phylogenetic tree of grapevine endophytic and trunk diseases associated partial sequence data of the ITS region. Bootstrap values are shown based on 1000 replications of Neighbor–joining analysis on branches

اغلب گروه‌های تعیین شده با ارزش بوت استرپ بیش از ۵۰ شماره‌گذاری شدند که روی شاخه‌ها نشان داده شده است. براساس درخت ترسیم شده، گونه‌های *C. globosum* و *Chaetomium* sp. در هیچ یک از گروه‌ها دسته بندی نشدند. هرچند که این گونه‌ها در مجاورت گروه VII که سایر گونه‌های *Chaetomium* در آن گروه بندی شدند، قرار گرفتند. گونه‌های *Alternaria* در گروه I و در زیرشاخه‌های مجزا گروه بندی شدند. به‌طوری‌که در این گروه، هر یک از گونه ها در یک زیر شاخه مجزا قرار گرفتند. تمام گونه‌های *Daldinia* نیز در گروه IV و در زیرشاخه‌های مختلف گروه‌بندی شدند. اعضای جنس *Stromatinia* که شامل دو جدایه بودند، در گروه III دسته‌بندی شدند. گروه II شامل دو زیر شاخه بود که هر یک از گونه‌های جنس‌های *Macrophomina* و *Aaosohaeria* در یک زیرشاخه جداگانه قرار داشتند. در گروه V تمامی گونه‌های *Fusarium* در یک زیر شاخه و دو گونه *Clonostachys* در یک زیرشاخه دیگر گروه بندی شدند. قرار گرفتن گونه‌های نزدیک به هم در گروه‌های مشترک نشان‌دهنده ارتباط و شباهت ریخت‌شناختی بسیار زیاد آنهاست. این شباهت به وسیله اعداد بوت استرپ نیز کاملا تایید شد.

آزمون بیماری‌زایی

سه جدایه *A. tritici* (MT568839) GZ58، *C. rosea* (MK530694) GZ83 و *F. oxysporum* (MW850546) GZ74 که از درختچه‌های مو بدون علائم بیماری جداسازی شدند، براساس آزمون بیماریزایی در شرایط گلخانه، بیماریزا بودند. شانکرها در بخش چوبی ساقه، از محل مایه زنی به سمت بالا و پایین توسعه یافتند و علائمی شامل زردی و بافت مردگی برگ‌ها در شاخه‌های مایه‌زنی شده، مشاهده شد (شکل ۳). جدایه *F. oxysporum* با میانگین طول شانکر داخلی برابر با ۲۳/۶۶ میلی‌متر دارای بیماری‌زایی بیشتری در مقایسه با *C. rosea* (۱۹/۵ میلی‌متر) و *A. tritici* (۱۵/۲۵ میلی‌متر) بود. میانگین طول شانکر داخلی در تیمار شاهد برابر با ۵ میلی متر بود (دلیل ایجاد شانکر در تیمار شاهد، تغییرات فیزیولوژیک ناشی از ایجاد زخم است) (شکل ۳). هر سه گونه، از قسمت حاشیه علائم ایجاد شده، طبق اصول کخ، مجددا جداسازی شدند.

ارزیابی ویژگی ضد قارچی جدایه‌ها

آزمون‌های مهار مستقیم برای مطالعه فعالیت ضد قارچی ۱۳ جدایهٔ قارچی جدا شده از مو در مقابل رشد میسلیومی دو بیمارگر تنهٔ مو مشتمل بر *Fusarium* sp. و *C. chrysosperma* که قبلا بیماریزایی‌شان اثبات شده بود، انجام شد. نتایج حاصل از روش کشت متقابل نشان داد ۷۶٪/۹۲ از جدایه‌ها قادر به مهار رشد میسلیوم‌های حداقل یکی از دو بیمارگر بودند و ۵۳/۸۴ ٪ از جدایه‌ها در برابر قارچ *C. chrysosperma* و ۶۱/۵۳٪ جدایه‌ها در مقابل قارچ *Fusarium* sp. خاصیت آنتاگونیستی داشتند (جدول ۲).

جدایه‌های *F. oxysporum* (GZ74) و *P. minimum* (GZ65) که از بافت سالم جداسازی شدند و جدایه‌های *A.malorum* (GZ96)، *Daldinia* sp. (GZ36) و *D. loculata* (GZ81) که از بافت آلوده جدا شده بودند، بهترین مهار رشد میسلیوم بیمارگرها را نشان دادند (جدول ۲). سه جدایه *A. tritici* (GZ58)، *Fusarium* sp. (GZ60) و *M. phaseolina* (GZ52) که از بافت سالم جداسازی شده بودند، در مقابل دو بیمارگر ذکر شده هیچگونه فعالیت آنتاگونیستی نداشتند.

شکل۳– علائم هوایی نهال‌های مو یک‌ساله پس از مایه‌زنی (a، e، i و m) و شانکرهای داخلی (b–d، f–h، j–l و n–p) به ترتیب ناشی از جدایه‌های *Allocanariomyces tritici*، *Clonostachys rosea*، *Fusarium oxysporum* و تیمار شاهد.

Fig 3. Foliar symptoms of one–year grape seedling after inoculation (a, e, i and m) and internal canker (b–d, f–h, j–l and n–p) of *Allocanariomyces tritici*, *Clonostachys rosea*, *Fusarium oxysporum* and control, respectively.

جدول۲– فعالیت ضدقارچی جدایه‌های قارچی مو علیه قارچ‌های بیمارگر *C. chrysosperma* و *Fusarium* sp. در شرایط آزمایشگاه.

Table 2. Antifungal activity of grapevine fungi isolates against *Cytospora chrysosperma* and *Fusarium* sp. in vitro.

Isolates	Species	Tissue	*Cytospora chrysosperma*	*Fusarium* sp.
GZ74	*Fusarium oxysporum* (OM760887)	Healthy	++++	+++
GZ65	*Phaeoacremonium minimum* (OM760886)	Healthy	++++	+++
GZ81	*Daldinia loculata* (OM760888)	Infected	++++	+
GZ96	*Alternaria malorum* (OM760890)	Infected	+++	++
GZ83	*Clonostachys rosea* (OM760889)	Healthy	+++	+
GZ36	*Daldinia* sp. (OM760878)	Infected	++++	–
GZ57	*Stromatinia narcissi* (OM760882)	Healthy	–	+++
GZ64	*Aosphaeria arxii* (OM760885)	Healthy	+++	–
GZ54	*Chaetomium* sp. (OM760881)	Healthy	–	+++
GZ37	*Alternaria* sp. (OM760879)	Healthy	–	+

–: no growth inhibition, +: 10–24.9%, ++: 25–49.4%, +++: 50–74.9%, ++++: 75–100%.

بحث

در این تحقیق از ۵۴ درختچه مو از مناطق مختلف استان زنجان، تعداد ۹۵ جدایه قارچ جداسازی شد که ۳۴ جدایه (۳۶/۴۶ درصد) از درختچه‌های دارای علائم بیماری زوال مو و ۶۱ جدایه (۶۳/۵۴ درصد) از درختچه‌های سالم بودند. از آنجایی‌که هدف از مطالعه حاضر، شناسایی قارچ‌های اندوفیتی بود که به طور مداوم در مو ساکن هستند، مطالعه در اواخر تابستان انجام شد. نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد که حضور قارچ‌های اندوفیت در بخش‌های مختلف ساقه ، تنه و ریشه درختچه‌های سالم و بیمار مو با سنین مختلف ۳—۷۰ ساله در مقایسه با بیمارگرهای گیاهی بیشتر است. با وجود این، در شرایط محیطی مناسب، برخی از اندوفیت‌ها ممکن است به صورت بیمارگرهای نهفته فعالیت کنند. اندوفیت‌های مو دارای طیف وسیعی از تنوع زیستی هستند. در پژوهشی در استان آذربایجان غربی ۳۱ گونه قارچی اندوفیت از درختچه‌های مو جداسازی شدند که متعلق به جنس‌های *Alternaria*، *Arthrinium* Kunze.، *Aspegillus* P. Micheli.، *Beauveria* Vuill.، *Bipolaris* Shoemaker.، *Botryosphaeria* Ces. & De.، *Chaetomium* Not.، *Cytospora* Link.، *Epicoccum*، *Geosmithia* Pitt.، *Mucor* Fresen.، *Paecilomyces* Bainier.، *Penicillium* Link.، *Phoma* Sacc.، DC.، *Rhizoctonia* Pers.، *Seimatosporium* Corda.، *Trichoderma* Hennebert. و *Truncatella* Steyaert.، *Verrucobotrys* بودند (Hergoli *et al*. 2013). در مطالعه حاضر، گونه‌های قارچی *Alternaria* sp.، *A. malorum*، *A. tritici*، *A. arxii*، *Chaetomium* sp.، *C. rosea*، *D. loculata*، *Daldinia* sp.، *Fusarium* sp.، *F. oxysporum*، *M. phaseolina*، *P. minimum* و *S. Narcissi* شناسایی شدند. به این دلیل که در برخی موارد گیاهان مرتبط با اندوفیت‌ها مقاومت بیشتری در برابر بیمارگرهای گیاهی، به ویژه قارچ‌ها و نماتدها نشان داده‌اند، اندوفیت‌ها در بیماری‌شناسی گیاهی مورد توجه قرار گرفته‌اند. قارچ‌های اندوفیت به عنوان منبع جدید زیستی برای تولید و استفاده متابولیت‌های ثانویه مشخص شده‌اند. فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های به دست آمده در این تحقیق، از طریق کشت متقابل در برابر بیمارگرهای تنۀ مو مشتمل بر *C. chrysosperma* و *Fusarium*. sp. مطالعه شد. در این مطالعه، قارچ‌های *C. rosea*، *F. oxysporum* و *P. minimum* که از بافت سالم شاخه و ریشه جداسازی شده بودند، دارای بیشترین خاصیت آنتاگونیستی در برابر بیمارگرها بودند، هرچند خود به عنوان عوامل بیماریزای مو معرفی شده‌اند. برخی از گونه‌های آنتاگونیستی بالا، خود پتانسیل بیماریزایی روی درختچۀ مو دارند، لازم به ذکر است که غربال‌گری حاضر با هدف شناسایی متابولیت‌های ضدقارچی این جدایه‌ها برای مطالعات آینده علیه بیماری‌های تنه انگور، انجام شده است. دو قارچ‌های *A. malorum*، *D. loculata* و *Daldinia* sp. نیزدر برابر دو بیمارگر *Fusarium* sp. و *C. chrysosperma* دارای خاصیت بازدارندگی رشد بودند. با توجه به اینکه جدایه‌های *A. tritici*، *C. rosea* و *F. oxysporum* که از بافت سالم ریشه و شاخه مو جداسازی شده ولی دارای فعالیت بیماری‌زایی بودند؛ این امر نشان دهنده این است که پاتوژن‌ها به عنوان یک اندوفیت گیاهی بدون علامت رفتار می‌کنند و تنها تحت شرایط فیزیولوژیکی یا محیطی خاص بیماری‌زا می‌شوند. با وجود حضور و نقش برخی اندوفیت‌ها در ایجاد بیماری‌ها، آنها گاهی مکانیسم دفاعی را در برابر عوامل بیماریزا از طریق مقاومت القایی فعال می کنند؛ بنابراین استفاده از متابولیت‌های تولید شده توسط آن‌ها در مهار زیستی در عرصۀ باغات، به‌عنوان روش ایمن‌تری پیشنهاد می‌شود که موضوع مطالعات آینده مربوط به این تحقیق است.

تعداد ۹ جدایه در سطح گونه و ۴ جدایه در سطح جنس شناسایی شدند که در اینجا به تفکیک مورد بحث قرار می‌گیرند.

گونۀ *Alternaria malorum*

در این مطالعه، گونه *A. malorum* از درختچه‌های مو دارای علایم بیماری زوال مو در تنه، جداسازی شد. جنس *Alternaria* به عنوان بیمارگر و اندوفیت دامنه میزبانی وسیعی دارد و از میزبان‌های گیاهی مختلف در دنیا گزارش شده است. در اسپانیا، گونه‌های این جنس را برای مهار زیستی بیماری‌های قارچی مو به عنوان اندوفیت معرفی کرده‌اند (Gonzalez & Tello, 2011). در ایران، هرقلی و همکاران گونه‌های *A. brassicicola*، *A. chlamydospora*، *A. malorum* و *A. atra* را به عنوان اندوفیت مو معرفی کردند (Hergholi *et al*,. 2015). همچنین *Alternaria* sp. به عنوان قارچی از درختچه مو از زنجان گزارش شده است (Mohammadi *et al*., 2019). گونه *A. malorum* به عنوان اندوفیت از علف هرز *Centaurea stoebe* Boreau L. (Shipunov *et al*., 2008) و در ایران اولین بار از جو گزارش شده است (Asgari *et al*., 2004). در پژوهشی دیگر از استان‌های اصفهان، چهارمحال و بختیاری، کردستان، کرمان، کرمانشاه، کهکیلویه و بویر احمد و همدان، این گونه به عنوان عامل شانکر درخت گردو در دنیا معرفی شد (Bagherabadi *et al*.و2022). همچنین گونه *A. malorum* از استان کردستان به عنوان عامل زوال مو گزارش شده است (Khaledi *et al*., 2021).

گونهٔ *Aaosphaeria arxii*

در این تحقیق، گونهٔ *A. arxii* از بافت سالم ریشهٔ مو جداسازی شد. طبق اطلاعات ما این گونه برای نخستین بار به عنوان قارچ اندوفیت انگور در دنیا گزارش می‌شود.

گونهٔ *Allocanariomyces tritici*

گونهٔ *A. tritici* در ایران از استان آذربایجان شرقی برای نخستین بار توسط مهرابی و همکاران از بذر گندم به عنوان اندوفیت گزارش شد (Mehrabi *et al*., 2020). در مطالعه حاضر، این گونه از بافت سالم ریشه جداسازی شد ولی با توجه به نتیجه آزمون بیماری‌زایی، طبق اطلاعات ما این اولین گزارش *A. tritici* از دنیا به عنوان بیمارگر مو است.

گونهٔ *Clonostachys rosea*

گونهٔ *C. rosea* قبلا به عنوان قارچ پوده رست (ساپروفیت)، مایکوپارازیت عالی، بیمارگر و اندوفیت مو گزارش شده است (Sun *et al*., 2020 & Muvea *et al*., 2014). این گونه در سوئیس به عنوان عامل پوسیدگی ریشهٔ مو معرفی شده (Casieri *et al*., 2009) و در ایران از ساقه و ریشه باقلا، بادام، کاج تهران (*Pinus eldarica* (Medw.) Silba.) و سرو خمره‌ای (*Cupressus arizonica* Greene.) گزارش شده است (Vega *et al*., 2008 & Aghdam *et al*., 2017; Cannon *et al*., 2002). این گونه از ایران به عنوان اندوفیت گیلاس برای اولین بار در دنیا (Aghdam *et al*., 2017) و از علف شوره (*Salsola*) در بیرجند، به عنوان اندوفیت ریشه معرفی شده است (Razghandi *et al*., 2020). گونهٔ *C. rosea* به عنوان قارچ اندوفیت مو از شیلی گزارش شده است (Silva–Valderrama *et al*., 2021). این گونه قارچی از درختچه‌های مو دارای علایم زوال از زنجان (Mohammadi *et al*., 2019) و کردستان (Khaledi *et al*., 2021)، همچنین از تاکستان‌های غرب ایران (استان کرمانشاه) (Bahmani *et al*., 2021) گزارش شده است. در مطالعه حاضر، گونه *C. rosea* از ساقه مو سالم جداسازی شده، بیماریزایی آن در شرایط گلخانه اثبات شد و در نتیجه، به عنوان بیمارگر تنهٔ مو از زنجان معرفی می‌شود.

جنس *Chaetomium*

در مطالعهٔ حاضر، جدایه‌ای از جنس *Chaetomium* از بافت سالم ریشهٔ مو جداسازی شد. جنس *Chaetomium* دارای دامنه میزبانی وسیع است و گونه *C. globosum* به عنوان اندوفیت مو در سال ۲۰۱۰ از *Vitis vinifera* معرفی شده است (Longoni *et al*., 2012). در ایران در سال ۲۰۱۶ گونه *C. globosum* Kunze. برای نخستین بار به عنوان اندوفیت درخت گیلاس از دنیا گزارش شد (Aghdam & Fierro. 2017). گونه *C. elatum* در سال ۲۰۱۵ به عنوان

قارچ اندوفیت مو از آذربایجان غربی گزارش شد (Hergholi *et al.*, 2015).

گونهٔ *Daldinia loculata*

گونه‌های جنس *Daldinia* به عنوان ساپروفیت‌هایی که باعث پوسیدگی سفید در چوب‌های مرده می‌شوند، شناخته شده‌اند (Stadler *et al.* 2014). بیشتر گونه‌های *Daldinia* اغلب اندوفیت هستند و در درون بافت میزبان بدون ایجاد علائم بیماری یا تولید استروماتا زندگی می‌کنند (Whalley, 1996 & Stadler *et al.*, 2014). جنس *Daldinia* به عنوان اندوفیت از *Dendrobium* (ارکیده)، *Salix fragilis* L. (بید بیدخشتی) و *Shorea obtusa* Wall. ex Blume. (نوعی نخل) گزارش شده است (Ma *et al.*, 2015 Rivera–Orduña *et al.*, 2011; Sutjaritvoraku *et al.*, 2011). گونه *Daldinia cf. concentrica* (Bolton) Ces. & De Not. به عنوان اندوفیت از درخت زیتون (*Olea europaea L.*) از فلسطین اشغالی که ترکیبات آلی فراری در برابر قارچ‌های مختلف تولید می‌کند و در کنترل بیماری‌های قارچی کاربرد دارد، گزارش شده است (Liarzi *et al.*, 2016). اولین گزارش از گونه *Daldinia eschscholtzii* (Ehrenb.) Rehm. به عنوان اندوفیت ساکن چوب با پتانسیل ایجاد پوسیدگی چوب در مو از کشور کره بوده است (Lee *et al.*, 2019). گونه *D. loculata* از گیاه خار مریم (*Silybum marianum* (L.) Gaertn.) در منطقهٔ Horizon Herbs LLC (Williams, OR, USA) (Raja *et al.*, 2015)، و در ایران از درختان جنگلی گیلان (Pourmoghaddam *et al.* 2014) و از درختان بلوط به عنوان قارچ اندوفیت گزارش شده است (Ghasemi *et al.*, 2019). در مطالعه حاضر، گونه *D. loculata* از بافت‌های آلوده تنهٔ مو جداسازی شد و با توجه به عدم انجام آزمون بیماریزایی در حال حاضر، طبق اطلاعات ما برای نخستین بار به عنوان قارچ همراه بیماری‌های تنهٔ مو از دنیا گزارش می‌شود.

گونهٔ *Fusarium oxysporum*

برخی از گونه‌های جنس *Fusarium* به عنوان بیمارگر خاکزاد که سبب زوال و مرگ درختچه‌های مو می‌شوند، شناخته شده‌اند (Vilvert *et al.* 2017). جدایه‌هایی از جنس *Fusarium* از تاکستان‌های جنوب غرب ایران (استان فارس) از شاخه و تنهٔ موهای دارای علایم بیماری اسکا گزارش شده‌اند (Mohammadi & Banihashemi, 2007). همچنین، جدایه‌هایی از جنس *Fusarium* از منطقه سیستان به عنوان قارچ همراه بیماری سرخشکیدگی مو از شاخه‌های آلوده جداسازی شده است (Safarnejad & Gholamian, 2011). در مطالعه‌ای، قارچ *Fusarium* sp. از باغات مو بجنورد دارای عوامل زوال شناسایی شد (Farashiani *et al.*, 2012). جدایه‌هایی از *Fusarium* sp. از شاخه و تنه درختچه‌های مو دارای علایم زوال از مناطق مختلف استان کرمان نیز جداسازی شده است (Arabnejad *et al.*, 2013). جدایه‌ای از *Fusarium* sp. از درختان دارای علائم زوال مو از استان زنجان گزارش شد (Mohammadi *et al.*, 2019). همچنین جدایه‌ای از گونه *F. oxysporum* از گیاهان مختلف و همچنین مو از اسپانیا به عنوان عامل بیماری که با گیاهان جوان مرتبطند، گزارش شده است (González & Tello, 2011). در ایران گونه *F.oxysporum* از بلوط سیاه (*Quercus macranthera* Fisch. & C.A.Mey. ex Hohen.) به عنوان اندوفیت برای اولین بار گزارش شده است (Ghasemi *et al.*, 2019). در تحقیق حاضر، گونه *F.oxysporum* از بافت سالم ریشه جداسازی شد، اما بخاطر اثبات بیماریزایی آن در شرایط گلخانه، برای اولین بار به عنوان بیمارگر مو از ایران گزارش می‌شود.

گونهٔ *Macrophomina phaseolina*

در تحقیق حاضر، گونهٔ *M. phaseolina* از بافت‌های سالم ریشهٔ مو جداسازی شد. گونهٔ *M. phaseolina* از لوبیا چشم بلبلی (*Glycine max* (L.) Merr.) به عنوان اندوفیت گزارش شده است (González *et al.*, 2011& Femandes Ghimire *et al.*, 2011; *et al.*, 2015). به علاوه، این گونه به عنوان عامل بیماری پوسیدگی ریشه خشک (ذغالی) از

برخی از محصولات از جمله توت‌فرنگی، ذرت، سورگوم، سیب‌زمینی، سویا و نخود (Avilés *et al*., 2008; Saleh *et al*., 2010; Živanov *et al*., 2019; Basandr *et al*., 2020; Ko *et al*., 2020 & Purushotham *et al*., 2020) جداسازی شده است. گونهٔ *M. phaseolina* در ایران، قبلا به‌عنوان عامل زوال مو از مرند از رقم مو کشمشی گزارش شده است (Abed–Ashtiani *et al*., 2018). این قارچ همچنین در سال ۲۰۲۰ در آمریکا از مو به عنوان عامل پوسیدگی تنه و کوردون معرفی شد (Nouri *et al*., 2020).

گونهٔ *Phaeoacremonium minimum*

در تحقیق حاضر، گونهٔ *P. minimum* از بافت‌های سالم ریشهٔ مو جداسازی شد. گونهٔ *P. minimum* عامل بیماری اسکا در مو است که در ایران و بسیاری ازکشورها از جمله آفریقای جنوبی (Baloyi *et al*., 2013) به عنوان عامل بیماری‌های اسکا و پتری از مو معرفی شده است. این گونه از تاک‌های مو در خراسان رضوی شناسایی شد، بعد از اثبات بیماری‌زایی در گلخانه، به عنوان بیمارگر مو معرفی شد (Amarloo *et al*., 2020). همچنین از تاکستان‌های کرمانشاه قارچ *P. minimum* از موهای دارای علایم جدا شد و به عنوان یکی از مهاجم‌ترین گونه‌های بیماری‌زایی قارچی مو معرفی شد (Bahmani *et al*., 2021).

گونهٔ *Stromatinia narcissi*

در این تحقیق، گونهٔ *S. narcissi* از بافت سالم ریشهٔ مو جداسازی شد. طبق اطلاعات ما این گونه برای بار به عنوان قارچ اندوفیت از انگور در دنیا گزارش می‌شود.

با توجه به ممنوعیت استفاده از برخی قارچ‌کش‌های شیمیایی نظیر آرسنیت سدیم و قارچکش‌های گروه بنزمیدازول، و شناخته نشدن ارقام مو مقاوم به زوال انگور، کنترل بیماری‌های تنهٔ مو تا حدودی دشوار است (Fischer *et al*., 2002; Ciancio *et al*.,2008). از آنجائی‌که قارچ‌های اندوفیت موجود در گیاهان و به خصوص درختان میوه در سال‌های اخیر توجه زیادی را در دنیا به خود جلب کرده‌اند، شناسایی و بررسی پتانسیل مهار زیستی قارچ‌های اندوفیت، امکان مطالعهٔ اثر متابولیت‌های تولید شده توسط آنها، و در نتیجه استفاده از آنها در کنترل بیماری‌های تنهٔ مو را فراهم خواهد کرد. داشتن خاصیت ضد قارچی به‌عنوان ویژگی مناسب قارچ‌های اندوفیت جهت استفاده از آن‌ها در مهار زیستی می‌باشد.

References

Abed Ashtiani, F., Narmani, A. & Arzanlou, M. 2018. *Macrophomina phaseolina* associated with grapevine decline in Iran. Phytopathologia Mediterranea, 57(1): 107–111.

Adalat, K., Whiting, C., Rooney, S. & Gubler, W.D. 2000. Pathogenicity of three *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. Phytopathologia Mediterranea, 39(1): 92–99.

Ahmadi, K., Abedzadeh, H., Hatami, F., Mohammadnia, Afroze, Sh., Abbas Taghani, R. Yare, Sh. & Kalantare, M. 2021. Agricultural Statistics of 2020 Horticultural Products 3, 157 pp. (In Persian with English summary).

Akgül, D.S. & Ahioğlu, M. 2019. Fungal pathogens associated with young grapevine decline in the Southern Turkey vineyards: Proceedings of the 42nd World Congress of Vine and Wine, July 15–19, Geneva, Switzerland.

Amarloo, O.A., Tajick Ghanbary, M.A., Mohammadi, H. & Mahdian, S.A. 2020. Identification and pathogenicity of fungal species associated with grapevine trunk diseases in Khorasan–Razavi province, Iran. Mycologia Iranica, 7(1): 83 – 94.

Arabnejad, M. & Mohammadi, H. 2013. Detection Of *Phaeoacremonium Tuscanum* And *Botryosphaeriaceae* Species Associated With Grapevine Decline In Iran And The Potential Role Of Pruning Debris On The Survival Of The Pathogens Iran. Journal of. Plant Pathology, 49(4): 139–148.

Arabnezhad, M., Mohammadi, H., Massumi, H. & Farahmand, H. 2014. Fungal flora associated with internal symptoms of grapevine decline in Kerman province. Journal of Agricultural Biotechnology, 6(2): 115–132.

Arnold, A.E., Maynard, Z. & Gilbert, G.S. 2001. Fungal endophytes in dicotyledonous Neotropical trees: patterns of abundance and diversity. Mycology Research, 105(12): 1502–1507.

Amold, A. & Herre, E. 2003. Canopy cover and leaf age affect coloniza–tion by tropical fungal endophytes: ecological pattern and processin Theobroma cacao (Malvaceae). Mycologia, 95(3): 388–98.

Arzanlou M. & Narmani A. 2015. ITS sequence data and morphology differentiate *Cytospora chrysosperma* associated with trunk disease of grapevine in northern Iran. Journal of plant protection Research. 55(2).

Asgari, B. Zare, R. & Peyghami, E. 2004. Hyphomycetous fungal community of barley phylloplane in East Azarbaijan province with emphasis on new taxa for Iranian fungal flora. Rostaniha, 5(2): 171–197.

Avilés, M. Castillo S. Bascon J. Zea Bonilla T. Martín Sánchez PM. & Pérez–Jiménez R.M. 2008. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. Plant Pathology, 57(2): 382.

Bagherabadi, Sh. & Zafari, D. 2022. Isolation and characterization of *Alternaria malorum* as a causal agent of bark canker on walnut trees. Journal of Plant Protection, 62(1):102–106.

Bahmani, Z., Abdollahzadeh, J., Amini, J. & Evidente, A. 2021. *Biscogniauxia rosacearum* the charcoal canker agentas a pathogen associated with grapevine trunk diseases in Zagros region of Iran. Scientific Reports, 11:14098.

Baloyi, M.A., Halleen, F., Mostert, L. & Eskalen, A. 2013. First report of *Togninia minima* perithecia on esca– and Petri–diseased grapevines in South Africa. Plant Disease, 97:1247.

Basandrai, A.k., Pande, A.k., Somta, P. & Basandra, D. 2020. *Macrophomina phaseolina* host interface: Insights into an emerging dry root rot pathogen of mungbean and urdbean, and its mitigation strategies. Plant Pathogen Impact Reviews, 70(6): 1263–1275.

Bérdy, J. 2005. Bioactive microbial metabolites A personal view. Review. Journal of Antibiot, 58:1–26.

Cannon P.F. & Simmons CM. 2002. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama forest reserve, Guyana. Mycologia, 942: 210–220.

Casieri, L., Hofstetter, V., Viret, O. & Gindro, K. 2009 Fungal communities living in the wood of different cultivars of young *Vitis vinifera* plants. Phytopathologia Mediterranea, 48:73–83.

Ciancio, A. & Mukerji, K.G. 2008. Integrated Management of Diseases Caused by Fungi, Phytoplasma and Bacteria, DOA – 10.1007/978–1–4020–8571–0.

Cui, J.L., Guo, S.X. & Xiao, P.G. 2011. Antitumor and antimicrobial activities of endophytic fungi from medicinal parts of Aquilaria sinensis. Journal of Zhejiang University Science B, 125: 385–392.

Das, J., Lahan, J. P. & Srivastav, R.B. 2010. *Solanum melongena*: A potential source of antifungal agent. Indian Journal of Microbiology, 50(1): 62–69.

Díaz, G.A. & Latorre, B.A. 2014. Infection caused by *Phaeomoniella chlamydospora* associated with Esca like symptoms in grapevine in Chile. Plant Disease, 98: 351–360.

Dissanayak, A.j., Purahong, W., Wubet, T., Hyde, K.D., Zhang, W., Xu, H., Zhang, G., Fu, C., Liu, M., Xing, Q., Li, X. & Yan, J. 2018. Direct comparison of culture–dependent and culture–independent molecular approaches reveal the diversity of fungal endophytic communities in stems of grapevine (*Vitis vinifera*). Fungal Diversity Diversity, 90: 85–107.

Edwards, J. & Pascoe, L. 2004. Occurrence of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium aleophilum* associated with Petri disease and esca in Australian grapevines. Australasian Plant Pathology, 33: 273–279.

Eskalen, A., Feliciano, A.J. & Gubler, W.D. 2007. Susceptibility of grapevine pruning wounds and symptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora.* Plant Disease, 91: 1100–1104.

Farashiani, A., Mousavi Jurf, S.A. & Karimi Shahri, M.R. 2012. Study of Esca Disease of Grapevine in Bojnourd. Plant patgology, 48(2): 143–153. (In Persian with English summary).

Femandes, E.G., Pereira, O.L., DaSilva, C.C. & Bento, C.B.P. Queiroza, M.V. 2015. Diversity of endophytic fungi in Glycine max. Microbiological Research, 181: 84–92.

Fierro–Cruz, J.E., Jiménez, P. & Coy–Barrera, E. 2017. Fungal endophytes isolated from Protium heptaphyllum and Trattinnickia rhoifolia as antagonists of *Fusarium oxysporum*. Revista Argentina de microbiologia, 49(3): 255–263.

Fischer, M. 2002. A new wood–decaying basidiomycete species associated with esca of grapevine: *Fomitiporia mediterranea* (Hymenochaetales). Mycological Progress, 1(3): 315–324.

Fotouhifar, K.B., Hedjaroude, G.A., Ershad, D., Moussavi, S.M. & Okhovvat, S.M. 2007. New informationon the form–genus *Cytospora* in Iran. Rostaniha, 8 (2): 129–149.

Fotouhifar, K., Hedjaroude, G. & Leuchtmann, A. 2010. ITS rDNA phylogeny of Iranian strains of *Cytospora* and associated teleomorphs. Mycologia, 102: 1369–82.

Ghanbary Tajick, M.A., Mahdian, S.A., Mohammadi, H. & Amarloo, O.A. 2020. Identification and pathogenicity of fungal species associated with grapevine trunk diseases in Khorasan–Razavi province, Iran. Mycologia Iranica, 7(1): 83–94.

Ghasemi Esfahlan, S. & Arzanlou, M. 2019. Morphological and molecular characterization of endophytic fungi from oak trees in Arasbaran forests. Plant Protection, 8(1): 1–17.

Ghimire, S.R., Charlton, N.D., Bell, J.D., Krishnamurthy, Y.L. & Craven, K.D. 2011. Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L) growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. Fungal Diversity, 47: 19–27.

González, V. & Tello, M.L. 2011. The endophytic mycota associated with Vitis vinifera in central Spain. Fungal Diversity, 471: 29–42.

Goveas, S.W., Madtha, R., Nivas, S.K. & D'Souza, L. 2011. Isolation of endophytic fungi from Coscinium fenestratum –a red listed endangered medicinal plant Eurasian. Journal of biosciences, 5(1): 48–5.

Gramaje, D., Úrbez Torres, J.R. & Sosnowski, M.R**.** 2018. Managing grapevine trunk diseases with respect to etiology and epidemiology: Current strategies and future prospects. Plant Disease, 102: 12–39.

Hall, T.A**.** 1999. BioEdit: A user–friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series, 41: 95–98.

Hergholi, N. 2013. Isolation and Identification ofendophytic fungi in grapvinic trees (Vitis viniferaL.) in West Azarbaijan province. MSc thesis plantpathology, University of Tehran, Iran (In Persian with English summary).

Highet, A. S. & Nair, N.G. 2008. *Fusarium oxysporum* associated with grapevine decline in the Hunter Valley. Nucleic Acids Symposium Series, 1(1):48–50.

Johannesson, H., Læssøe, T. & Stenlid, J. 2000. Molecular and morphological investigation of *Daldinia* in northern Europe. Mycological Research, 104(3):275–280.

Khan, A., Whiting, C., Rooney, S. & Gubler, W.D. 2000. Pathogenicity of three *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. Phytopathologia Mediterranea, 39: 92–99.

Khaledi, E., Moghadam, J.N., Abdollahzadeh, J. & Amini, J. 2021. Fungi associated with grapevine trunk diseases (GTDs) with emphasize on pestalotioid species in Kurdistan Province, Iran**.** Biology.Reaserch square, DOI: 10.21203/rs.3.rs–192033/v1**.**

Ko, Y.M., Choi, J., Lee, Y.H. & Kim, H.T. 2020. First report of charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* on Glycine max in Korea. Research in Plant Disease, 26: 2 9– 37.

Köhl, J., Scheer, C., Holb, I.J., Masny, S., Molhoek, W. 2015. Toward an integrated use of biological control by *Cladosporium cladosporioides* H39 in Apple Scab (Venturia Inaequalis) management. Plant Disease, 99: 535–543.

Langoni, P., Rodolfi, M., Pantaleoni, L., Doria, E., Concia, L., Picco, A.M. & Cella, R. 2012. Functional analysis of the degradation of cellulosic substrates by a *Chaetomium globosum* endophytic isolate. Applied and Enviromental. Microbiology, 3693–3705.

Larignon, P.B. & Dubos, B. 1997. Fungi associated with esca disease in grapevine. European Journal of Plant Pathology, 103:147–157.

Latz, M.A.C., Jensen, B. Collinge D.B. & Jørgensen H.J.L**.** 2018. Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. Plant Ecology Diversity, 11: 555–567.

Lee, D.J, Lee, J.S., Lee, H.B. & Choi, Y.J. 2019. Four Endophytic Ascomycetes New to Korea: *Cladosporium anthropophilum*, C. *pseudocladosporioides*, *Daldinia eschscholtzii*, and *Nigrospora chinensis*. The Korean Journal of Mycology, 47(3): 187–97.

Liarzi, O., Bar, E., Lewinsohn, E. & Ezra, D. 2016. Use of the endophytic fungus *Daldinia cf. concentrica* and its volatiles as bio–control agents. Plos One, 11(12): DOI.org/10.1371/journal.pone.0168242

Linnakoski, R., Puhakka–Tarvainen, H. & Pappinen, A. 2012. Endophytic fungi isolated from Khaya anthotheca in Ghana. Fungal Ecology, 53: 298–308.

Mahmoudzadeh, H., Rasouli, V., Nejatian, M.A. & Dolati, H. 2010. Variety of grape cultivars in Iran, a factor for survival and possibility of organic grape production. In: the first national conference on sustainable agriculture and healthy crop production. Isfahan, Iran. (In Persian with English summary).

Ma, X. & Kang, J. 2015. Non–mycorrhizal endophytic fungi from orchids. Current Science, 109(1): 72–87.

Mehrabi, M., Asgari, B. & Zare, R. 2020. Description of *Allocanariomyces* and *Parachaetomium*, two new genera, and *Achaetomium aegilopis* sp. nov. in the *Chaetomiaceae*. Mycological Progress, 19: 1415–1427.

Mogg, R.J., & Bond, J.M. 2003. A cheap, reliable and rapid method of extracting high–quality DNA from plants. Molecular Ecology Notes, 3(4):666–668

Mohammadi, H. & Banihashemi, Z**.** 2007. Grapevine Decline in Fars Province. Iran. Journal of. Plant Pathology, 43: 294–310.

Mohammadi, H. & Banihashemi, Z. 2012. First Report of *Phaeoacremonium inflatipes* and *Phaeoacremonium mortoniae* Associated with Grapevine Petri Disease in Iran. Journal of Agricultural Science and Technology, 14: 1405–1414 (In Persian with English summary).

Mohammadi, H., Banihashemi, Z., Gramaje, D. & Armengol, J. 2013. Fungal pathogens associated with grapevine trunk diseases. Journal of Agricultural Science and Technology, 15: 137–150 (In Persian with English summary).

Mohammadi, M., Hemmati, R. & Mehrabi, M. 2019. Fungi associated with grapevine decline in Zanjan province, Iran. Proceedings of the province. 23rd Iranian plant protection congress, 27–30 Aug. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, 235–236 (In Persian with English summary).

Moshari, S. 2011. Identification of fungi causing hair loss in West Azerbaijan province. Master Thesis. School of Agriculture, Plant Protection Group Urmia University, Iran (In Persian with English summary n)

Mostert, L. & Groenewald, J.Z. 2006a. Taxonomy and pathology of *Togninia (Diaporthales)* and its *Phaeoacremonium* anamorphs. Studies in Mycology, 54: 115 pp.

Mostert L. Abeln E.C. Halleen A.F. & Crous P.W. 2006b. Genetic diversity among isolates of *Phaeomoniella chlamydospor*a on grapevines. Australasian Plant Pathology 35: 453–460.

Mugnai, L., Graniti, A. & Surico, G. 1999. Esca (black measles) and crown wood–streaking: Two old and elusive diseases of grapevines. Plant Disease, 83: 404–418.

Muvea, A.M., Meyh€ofer, R., Subramanian, S., Poehling, H.M., Ekesi, S. & Maniania, N.K. 2014. Colonization ofonions by endophytic fungi and their impacts on thebiology of *Thrips tabaci*. PloS One 9 DOI:10.1371/journal.pone.0108242Corpus ID: 4630824

Nair, D.N. & Padmavathy, S. 2014. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. The Scientific World Journal, 2014(11).

Nouri, N.T., Lawrence, D.P., Kallsen, C.E. & Trouillas, F.P. 2020. *Macrophomina* crown and root rot of pistachio in California. Plants, 9(2): 134.

Petrini, O. 1992. Taxonomy of endophytic fungi of aerial plant tissues. In; Fokkema NJ, Van den Hevel J (eds). Micro– biology of the phyllosphere. Academic Press, Cambridge University Press, UK.

Pimentel, M.R. & Molina, G. 2011. Use of endophytes to obtain bioactive compounds and their application in bio transformation process. Biotechnology Research International, DOI:org/10.4061/2011/576286

Pourmoghaddam, M.J., Khodaparast, S.A. & Pedramfar, H. 2014. The genus *Daldinia* in Guilan province (IN Iran). Rostaniha, 15(2): 122–132.

Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P.E., Longa, C.M.O., Pertot, S.Y.I. & Campisano, A. 2012. Fungal endophytic communities in grapevines (Vitisvinifera L.) respond to crop management. Appliedand Environmental Microbiology, 78: 4308.

Purushotham, N., Jones, A., Poudel, B., Nasim, J., Adorada, D. & Sparks, A. 2020. Draft genome resource for *Macrophomina phaseolina* associated with charcoal rot in sorghum. Molecular Plant Microbe Interactions, 33: 724–726.

Qadri, M., Johri, S., Shah, B.A., Khajuria, A., Sidiq, T., Lattoo, S.K. & Abdin, M.Z. 2013. Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. SpringerPlus, 2(8).

Raja, H.A., Kaur, A., El–Elimat, T., Figueroa, M. & Kumar, R., Deep, G. & Agarwal, R. 2015. Phylogenetic and chemical diversity of fungal endophytes isolated from *Silybum marianum* (L) Gaertn. (milk thistle). Mycology, 6(1):8–27.

Razghandi, M., Mohammadi, A., Ghorbani, M. & Mirzaee, M.R**.** 2020. New fungal pathogens and endophytes associated with Salsola. Journal of plant protection Research, 60(4): 362–368.

Rivera Orduña, F.N. & Suarez Sanchez, R.A. 2011. Diversity of endophytic fungi of Taxus globosa (Mexican yew). Fungal Diversity, 47(1): 65–74.

Safarnejad, M.R. & Gholamian, G.h. 2011. Identification and determination of fungi with grape blight in Sistan region. Agricultural Research Center Sistan Iran 294pp. (In Persian with English summary) https://civilica.com/doc/1057915/.

Saleh, A.A., Ahmed, H.U., Todd, T.C., Travers, S.E., Zeller, K.A. & Leslie, J.F. 2010. Relatedness of *Macrophomina phaseolina* isolates from tallgrass prairie, maize, soybean and sorghum. Molecular Ecology 19: 79– 91.

Scheck, H.J., Vasquez, S.J., Fogle, D. & Gubler, W.D. 1998. First Report of Three *Phaeoacremonium* spp. cause young grapevine decline in California. Plant Disease, 82(5): 590.

Schulz, B. & Boyle, C. 2002. Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. Mycological Research, 106(9): 996–1004.

Schulz, B. & Boyle, C. 2005. The Endophytic Continuum. Mycological Research, 109(6): 661–86.

Shipunov, A. Newcombe, G., Raghavendra, A.K. & Anderson, C.L. 2008. Hidden diversity of endophytic fungi in an invasive plant. American Journal of Botany, 959: 1096–1108.

Silva Valderrama, I., Toapanta, D., Miccono, M.D., Lolas, M., Díaz, G.A., Cantu, D. & Castro, A. 2021. Biocontrol potential of grapevine endophytic and rhizospheric fungi against trunk pathogens. Frontiers in Microbiology, 11 DOI:10.3389/fmicb.2020.614620.

Stadler, M., Læssøe, T., Fournier, J., Decock, C., Schmieschek, B., Tichy, H.V. & Peršoh, D. 2014. A polyphasic taxonomy of *Daldinia* (Xylariaceae). Studies in Mycology, 77: 1–14.

Strobel, G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. Microbes and Infection, 5(6): 535–544.

Strobel, G. & Daisy, B. 2003. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 67: 491–502.

Sun, Z., Li, S., Ren, Q., Xu, J., Lu, X. & Sun, M. 2020, Biology and applications of *Clonostachys rosea*. Journal of Applied Microbiology,129: 486–495. https://doi.org/10.1111/jam.14625

Surico, G., Mugnai, L. & Marchi, G. 2006. Older and Recent Observation on Esca: A Critical Overview. Phytopathologia Mediterranea, 45(4): S68–S86.

Sutjaritvorakul, T., Whalley, A.J.S., Sihanonth, P. & Roengsumran, S. 2011. Antimicrobial activity from endophytic fungi isolated from plant leaves in Dipterocarpous forest at Viengsa district Nan province. Thailand Journal of Agricultural Technology, 71: 115–121.

Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. Molecular Biology and Evolution, 38(7):3022–3027 doi:10.1093/molbev/msab120

Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava–Ripoll, M., Infante, F. & Rehner, S.A. 2008. Entomopathogenic fungal endophytes. Biological Control 46: 72–82.

Vilvert, E., Costa, M.D., Cangahuala–Inocente, G.C. & Lovato, P.E. 2017. Root proteomic analysis of grapevine root stocks inoculated with *Rhizophagus irregularis* and *Fusarium oxysporum* f. sp. herbemontis. Revista Brasileira de Ciencia do Solo, 41:1–14.

Waqas, M., Latif Khan, A., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H. & Lee, I.J. 2012. Endophytic fungi produce gibberellins and indole acetic acid and promotes Host–Plant growth during stress. Molecules, 17: 10754–10773.

Weber, D. 2009. Endophytic fungi, occurrence and metabolites. In *Physiology and Genetics.* Springer, Berlin, Heidelberg, 153–195.

Wilson, D. 1995. Endophyte – the evolution of a term, and clarification of its use and definition. Oikos, 73: 274–276.

Whalley, A.J.S. 1996. The xylariaceous way of life. Mycological Research 100: 897–922.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Inis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds). PCR Protocols: A guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego, U.S.A. 315–322.

Wightwick, A., Walters, R., Allinson, G., Reichman, S. & Menzies, N. 2010. Environmental Risks of Fungicides Used in Horticultural Production Systems. In: Odile C (eds). Fungicides, Canada, 272–303

Yu, H., Zhang, L., Li, L., Zheng, Ch., Guo., L., LiW, o., Sun, P. & Qin, L. 2010. Recent developments and future prospects of antimicrobial metabolites produced by endophytes. Microbiological Research, 165(6): 437–449.

Zhao, J., Zhou, L., Wang, J., Shan, T., Zhong, L., Liu, X. & Gao, X. 2010b. Endophytic fungi for producing bioactive compounds originally from their host plants. Current Research, Technology and Education Topics Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 1:567–576.

Živanov, D., Živanov, S.T., Nagl, N., Savić, A., Katanski, S. & Milić, D. 2019. First report of *Macrophomina phaseolina* causing dry root rot of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in Serbia. Plant Disease, 103 https://doi.org/10.1094/PDIS–03–19–0652–PDN

Isolation and Identification of Endophytic and Grape Trunk Diseases Associated Fungi in Zanjan Province

Sahar Pazooki[1], Azam Shekariesfahlan[2], Mojdeh Maleki[3], Shahram Naeimi[4]

1., 3. Ph.D. student in Plant Pathology, Assistant Professor, Department of plant disease Varmin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin-Pishva, Tehran, Iran.
2., 4. Assistant Professor, Associate Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension (AREEO), Tehran, Iran.

Corresponding authors: Azam Shekariesfahlan & Mojdeh Maleki, emails: azshek5713@gmail.com; Mojdehmaleki@yahoo.com

Received: Oct., 24, 2022 9(2) 115–133 Accepted: Dec., 26, 2022

Abstract

Endophytic and grapevine trunk diseases associated fungi were isolated from Zanjan province and their inhibitory effect on 2 grapevine fungal pathogens *Cytospora chrysosperma* and *Fusarium* sp. was investigated. A total of 95 fungal isolates were isolated, of which 63/54% were from healthy and 36.45% were from diseased tissues. Using strong disinfection steps, probability of isolation of saprophytic fungi was decreased to minimum; So, the fungi isolated from healthy and infected tissues considered as endophytes and grapevine trunk diseases associated fungi, respectively. Preliminary molecular identification of 13 representative isolates in terms of morphological characteristics was performed using nucleotide sequencing of ITS–rDNA region was done and 10 genera were identified. The taxa of *Alternaria malorum, Alternaria* sp., *Allocanariomyces tritici*, *Aaosphaeria arxii*, *Clonostachys rosea*, *Chaetomium* sp., *Daldinia loculata*, *Daldinia* sp., *Fusarium oxysporum*, *Fusarium* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Phaeoacremonium minimum* and *Stromatinia narciss* were identified. Pathogenicity of *A. tritici, C. rosea* and *F. oxysporum* was confirmed. Antagonistic activity of 13 fungal isolates against pathogenic fungi of grapevine trunk diseases (GTDs) including *C. chrysosperma* and *Fusarium* sp. using dual–culture method showed that species of *F. oxysporum, P. minimum* and *C. rosea* had the greatest potential as biocontrol agents. In this study, two species of *A. arxii* and *S. narcissi* were isolated from healthy grape tissue and to the best of our knowledge; are reported for the first time as endophytic fungi of grapevine trees in the world. *D. loculata* was isolated from infected tissues of grape trunk and is reported for the first time as a fungi associated with grapevine trunk diseases from the world. Moreover, the pathogenicity of *A. tritici* and *F. oxysporum*, was proved in green house condition and are reported for the first time as grapevine pathogens from the world.

Keywords: Polymerase chain reaction, antagonist, phylogeny, biological control, vineyard.