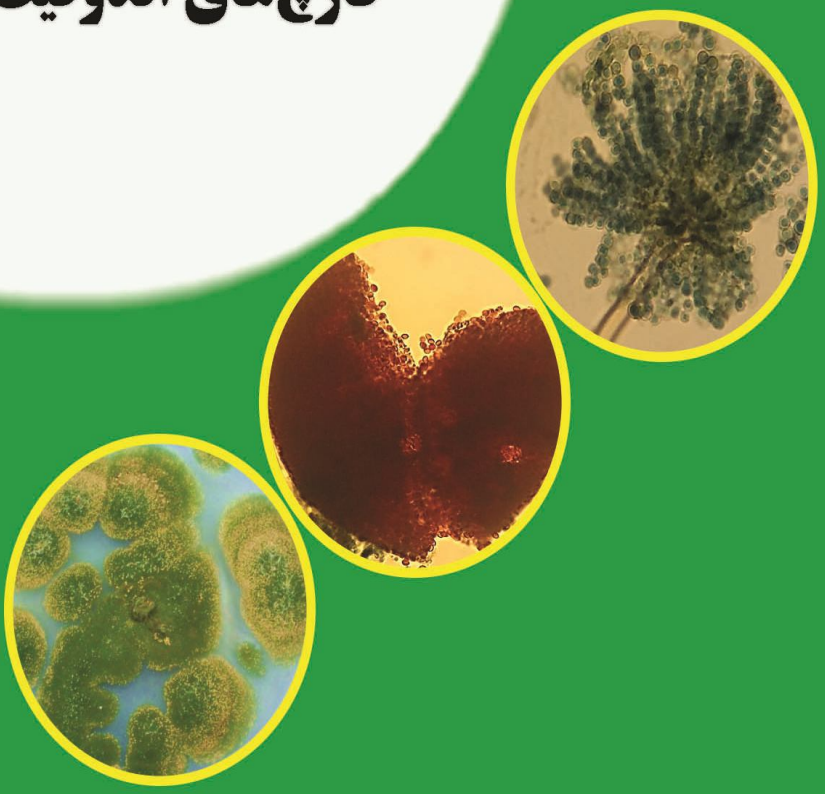
وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب

روش‌های آزمایشگاهی بررسی قارچ‌های اندوفیت



حسین کاری دولت‌آباد

شماره ثبت: ۶۳۸

۱۴۰۲

جمهوری اسلامی ایران

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی
موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

روش‌های آزمایشگاهی بررسی قارچ‌های اندوفیت

نگارندگان

حسین کاری دولت آباد

عضو هیات علمی موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

نشریه فنی: 638

1402

مشخصات اثر

عنوان: روش‌های آزمایشگاهی بررسی قارچ‌های اندوفیت

نگارندگان: حسین کاری دولت آباد

ناشر: موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کارشناس انتشارات: سمانه پورمنصور

ویراستار ادبی: زهرا محمدی

طراح جلد: راضیه محمدی

سال انتشار: 1402

حق چاپ برای ناشر محفوظ است.

این اثر با شماره 64771 در تاریخ 1402/11/7 در مرکز اطلاعات و مدارک علمی کشاورزی به ثبت رسیده است.

نقل مطالب با ذکر منبع بلامانع است.

نشانی: کرج، میدان استاندارد، جاده مشکین‌دشت، بلوار امام خمینی (ره)، موسسه تحقیقات خاک و آب کشور

کد پستی: 3177993545 **صندوق پستی:** 311-31785

نمابر : 02636210121 **تلفن:** 026 -36201900

وب‌سایت: http://www.swri.ir **پست الکترونیکی:** info@swri.ir

مسئولیت صحت مطالب به عهده نگارندگان است.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

1- مقدمه 1
2- نمونه‌برداری 3
3- جداسازی جدایه‌های قارچی اندوفیت 5
3-1- عناصر پایه 6
3-1-1- منبع کربن 6
3-1-2- منبع نیتروژن 6
3-1-3- نسبت کربن به نیتروژن 7
3-1-4- عناصر معدنی 7
3-1-5- عوامل رشد 7
3-1-6- عامل جامد کردن محیط‌های کشت 7
3-2- عوامل اصلی گزینش‌گری 8
3-2-1- محرک‌های رشد 8
3-2-2- ممانعت کننده‌ها 8
3-2-3- اسیدیته 8
3-2-4- فلزات سنگین 9
3-2-5- آنتی بیوتیک‌های ضد باکتری 9
3-2-6- قارچ‌کش‌ها 10
3-2-7- بازدارنده‌های دیگر 11
4- خالص‌سازی جدایه‌های قارچی اندوفیت 12
5- شناسایی ریخت‌شناسی جدایه‌های قارچی 14
6- معرفی تعدادی از گونه‌های غالب قارچی اندوفیت 17
7- منابع 28

1- مقدمه

کلمه اندوفیت به صورت کلمه به کلمه به معنای "در داخل گیاه" بوده که از دو کلمه یونانی endon، به معنای در داخل و phyton، به معنای گیاه تشکیل شده است (شولز و بویل، 2006). این اصطلاح برای نخستین بار توسط آنتون دباری [1] ، گیاه‌شناس آلمانی که پدر علم بیماری‌شناسی گیاهی نیز محسوب می‌شود، برای توصیف ریزجاندارانی که بافت‌های داخلی ساقه‌ها و برگ‌ها را اشغال می‌کنند، معرفی شد. بعدها در این تعریف تجدید نظر و مشخص شد که ممکن است ریشه‌ها و همچنین شاخه‌ها نیز توسط اندوفیت‌ها کلنیزه شوند (پوری و همکاران، 2005). کارول (1986) اندوفیت‌ها را به عنوان همیارهایی معرفی کرده است که شامل قارچهایی هستند که بخش‌های هوایی بافت‌های گیاهان زنده را کلنیزه می‌کنند، اما هیچ گونه نشانه‌ای از بیماری را سبب نمی‌شوند. در این تعریف قارچ‌های بیماری‌زا و میکوریزاها حذف می‌شوند. اندوفیت‌ها ارتباط نزدیکی با بیمارگرهای بیماری‌زا دارند، اما دارای بیماری‌زایی محدود هستند و چه‌بسا از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی تکامل یافته‌اند. پترینی (1991) تعریف گسترده‌تری از اندوفیت‌ها نسبت به تعریف کارول پیشنهاد کرده است، که شامل همه موجودات زنده ساکن اندام‌های گیاهی بوده که در بخشی از چرخه زندگی خود می‌توانند بافت‌های داخلی گیاهان میزبان را کلنیزه کنند، بدون اینکه باعث بروز نشانه‌های آشکاری در میزبان خود شوند. از این‌رو، بیمارگرهای نهفته بدون نشانه که در داخل بافت‌های میزبان مستقر هستند و موجودات زنده‌ای که در بخشی از چرخه زندگی خود دارای فاز اپی‌فیتی هستند، نیز بخش اندوفیت‌ها محسوب می‌شوند.

تعریفی که به طور گسترده درباره قارچ‌های اندوفیت پذیرفته شده این است که قارچ‌های اندوفیت قارچهایی هستند که در بافت‌های داخلی گیاهان زنده ساکن بوده بدون اینکه باعث ایجاد هر گونه اثرات منفی آشکار و فوری در میزبان‌هایشان شوند (آلی و همکاران، 2011). قارچ‌های اندوفیت در تمام طول عمر بافت گیاهی آلوده به اندوفیت و یا برای مدت زمان طولانی یعنی تا زمانی که شرایط محیطی برای قارچ مساعد باشد و

[1] Heinrich Anton De Bary

تکامل میزبان برای استفاده قارچ تغییر نکند، به صورت نهفته در داخل گیاه میزبان خود باقی می‌مانند، اما ممکن است پس از آن به حالت بیماری‌زا تبدیل شوند (دباب و همکاران، 2011). از این‌رو، جداسازی بین اندوفیت‌ها و بیمارگرها اغلب مبهم است. اندوفیت‌ها ممکن است بیمارگرهای فرصت‌طلب و یا نهفته‌ای باشند و هنگامی که در بافت‌های گیاهی استقرار یافتند، به حالت خاموش باقی می‌مانند. آن‌ها می‌توانند زمانی که تغییری در شرایط محیطی و یا کاهشی در دفاع میزبان به وجود آمد، به بیمارگر تبدیل شوند. برخی دیگر هم ممکن است بیمارگرهایی باشند که میزبان اشتباهی را کلنیزه کرده و در نتیجه توانایی ایجاد بیماری را ندارند. فیث و هامون (1997) بیان کردند که دامنه تعاملات بین ریزجانداران و گیاهان از همزیستی سودمند[1] تا بیماریزایی متغیر است، که به عوامل متنوعی مانند روش انتقال، سن گیاه، تغذیه و شرایط محیطی مربوط می‌شود.

قارچ‌های اندوفیت منبع غنی از متابولیت‌های فعال هستند که امکان استفاده از این متابولیت‌ها در پزشکی، کشاورزی و صنعت وجود دارد (تن و زو، 2001؛ استروبل، 2003؛ ماریا و همکاران، 2005). اندوفیت‌ها ترکیباتی از قبیل آلکالوئیدها، ترپنوئیدها، استروئیدها، کوئینون‌ها، مشتقات ایزوکومارین، فلاونوئیدها، فنول‌ها، فنولیک اسیدها و پپتیدها را تولید می‌کنند. برخی از قارچ‌های اندوفیت ترکیبات ضدسرطان از قبیل تاکسول تولید می‌کنند. برخی از ترکیبات تولیدی مانند آنزیم‌ها و حلال‌ها در صنایع قابل استفاده است (استروبل و همکاران، 2004).

قارچ‌های اندوفیت باعث مقاومت به تنش‌های غیرزیستی گرما و سرما، شوری، خشکی و آلودگی آب و خاک می‌شوند. از سوی دیگر این قارچ‌ها میزبان خود را از حشرات و بیماری‌ها محافظت می‌کنند. توانایی قارچ‌های اندوفیت گیاهان علفی که باعث حفاظت آن‌ها از حشرات می‌شود، باعث توجه محققین برای استفاده از قارچ‌های اندوفیت برای سلامتی بیشتر محصولات و با تحقیقات بیشتر فعالیت‌های ضد قارچی قارچ‌های اندوفیت نیز مشخص شده است (ناریساوا و همکاران، 2002؛ واز و همکاران، 2009؛ لی و همکاران، 2010؛ کومار و همکاران، 2011؛ کومار و کاشیک، 2013).

[1] Mutual

2- نمونه‌برداری

برای بررسی حضور اندوفیت‌ها درون میزبان گیاهی و همچنین ارزیابی نوع رابطه اندوفیت‌ها با گیاه میزبان نخست باید باتوجه به عوامل زیر گیاهان را انتخاب کرده و از آن‌ها نمونه‌گیری شود:

- گیاهان رشد یافته در شرایط ویژه از نظر مکان و آب و هوا، به عنوان نمونه گیاهان رشد یافته در نواحی بسیار سرد که دیگر گیاهان نمی‌توانند ادامه حیات دهند.
- گیاهانی که از نظر تاریخی سابقه طولانی دارند و توسط مردم محلی برای موارد ویژه‌ای مصرف می‌شود و آن گیاهان به صورت گیاهان بومی ویژه هر منطقه معرفی می‌شوند.
- گیاهانی که عمر طولانی دارند یا از سرزمین‌های بومی آن گیاه آورده شده‌اند مانند درختان کهنسال در هر منطقه و گیاهانی که در یک ناحیه تنوع زیستی زیادی دارند و ممکن است دارای تنوع اندوفیتی زیادی باشند (استروبل و همکاران، 2004).

پس از بررسی حضور اندوفیت در گیاه این نکته قابل درنگ است که آیا رابطه اندوفیت با میزبان به صورت همزیستی سودمند است و یا خیر و می‌توان چهار مرحله را برای تشخیص نوع رابطه همزیستی انجام داد: حضور اندوفیت باید باعث تأثیرات مثبت در میزبان شود. مثلا باعث افزایش رشد در گیاه میزبان نسبت به گیاهان بدون اندوفیت شده باشد. اندوفیت باید از بافتی که روی آن تاثیرات مثبت داشته است استخراج شود و در محیط کشت رشد کند. زمانی که اندوفیت کشت شده به گیاه بدون اندوفیت منتقل شود باید همان اثرهای مثبت را نشان دهد. اندوفیت باید دوباره از گیاه عاری از اندوفیت که به صورت مصنوعی آلوده شده است استحصال شود تا اطمینان حاصل شود که انتقال و ایجاد رابطه بین میزبان جدید و اندوفیت موفق بوده است (استروبل و همکاران، 2004). افزون‌بر تمام نکات یاد شده، در طول زمان نوع رابطه گیاه و اندوفیت قابل تغییر است. سیبر (2007) بیان می‌کند در طول مدتی که اندوفیت‌ها به‌ویژه قارچ‌ها درون گیاه زندگی می‌کنند، ممکن است رابطه آن‌ها با سازوکارهایی از شکل همزیست به بیمارگر و یا برعکس تبدیل شود با سازوکارهایی از جمله جهش نقطه‌ای، و یا ژن‌های بیماری‌زایی که در یک گونه از اندوفیت‌ها وجود دارند و می‌توانند به دیگر گونه‌ها منتقل شوند.

مقایسه قارچ‌های اندوفیت در مناطق جغرافیایی نشان می‌دهد که مناطق گرمسیری نسبت به مناطق شمالی سردسیری و یا معتدل، تنوع اندوفیتی بیشتری را از خود نشان می‌دهند. تنوع قارچ‌های اندوفیت همچنین تحت تأثیر عوامل زیست اقلیمی مانند عرض جغرافیایی، متوسط دما و بارش سالانه که تا اندازه‌ای مرتبط با جغرافیای منطقه هستند نیز قرار دارد. همچنین میزان تنش‌هایی که یک جامعه گیاهی به آن‌ها دچار می‌شود برترکیب قارچ‌های اندوفیت تأثیر می‌گذارد (گونزالز و تلّو، 2011).

قارچ‌های اندوفیت خانواده Clavicipitaceae به صورت سیستمیک در بافت‌های هوایی تعدادی از گیاهان گرامینه مانند *Agrostis hyemalis* و *Poa autumnalis* مناطق معتدله رشد می‌کنند (سایکونن و همکاران، 1998؛ کلی و شاردل، 2002). اندوفیت‌های قابل توجه از این خانواده حدود 30 گونه از جنس‌های *Balansia*، *Myriogenospora*، *Atkinsoniella*، *Balansiopis*، *Epichloë* و *Neotyphodium* هستند (کلی، 1988).

قارچ‌های اندوفیت در تمامی گیاهان چوبی که برای حضور اندوفیت‌ها مورد بررسی قرار گرفته‌اند، یافت شده‌اند. قارچ‌های اندوفیت گیاهان چوبی تنوع زیادی را نشان می‌دهند و متعلق به گروه‌های تاکسونومیکی مختلف هستند. این اندوفیت‌های قارچی از طریق اسپورها به صورت افقی منتقل می‌شوند. در برخی از گیاهان، اندوفیت‌ها را می‌توان از بذور جداسازی کرد و به هنگام جوانه‌زنی بذر، نفوذ سیستمیک در گیاه ایجاد می‌کنند. ورود قارچ‌های اندوفیت اغلب به صورت موضعی در داخل برگ‌ها، برگچه‌ها، پوست و ساقه‌ها اتفاق می‌افتد. اغلب اندوفیت‌های این گروه چه بسا با باد، آب یا حشرات انتشار می‌یابند. در بسیاری از موارد معلوم نیست این قارچ‌ها چه زمانی و در کجا اسپورزایی می‌کنند، چگونه زمستانگذرانی کرده و یا آلودگی گیاهان چگونه رخ می‌دهد (بایمن ، 2006).

یک روند ثابت که پیاپی برای اندوفیت‌های برگ و ساقه تأیید شده است، افزایش فراوانی همراه با افزایش سن اندام‌ها یا بافت‌های میزبان است. این حالت بیشتر برای گیاهان همیشه سبز یا گیاهان دارای شاخ و برگ با عمر طولانی و همچنین به میزان کمتر در درختان برگریز و گیاهان یک ساله مشاهده شده است (تاد، 1988؛ کومارسان و سوریانارایانان، 2002).

مطالعات اخیر نشان می‌دهد که در مدت کوتاهی پس از پیدایش برگ‌های جوان اندوفیت‌ها در آن‌ها تجمع پیدا می‌کنند، بدین ترتیب که زادمایه قارچی به صورت اپی‌فیت جوانه زده و

پس از آن آلودگی برگ‌ها با نفوذ مستقیم از راه کوتیکول و یا نفوذ غیر مستقیم از راه روزنه‌ها بوجود می‌آید. تعداد زیادی از اندوفیت‌های گیاهان چوبی، ارتباط بسیار نزدیکی با گونه‌های بیماریزا دارند. بخش بزرگی از جنس‌هایی که بیشتر اوقات به عنوان اندوفیت‌های گیاهان چوبی چند ساله محسوب می‌شوند، دیسکومیست‌های بدون دریچه هستند. جنس‌های مربوط به Leotiales از جمله *Tiarosporella* و*Ceuthospora* از خانواده Phacideaceae، جنس‌های *Pezicula*، *Dermea* و *Mollisia* از خانواده Dermateaceae و *Chloroschypha* از خانواده Leotiaceae پیاپی به عنوان اندوفیت جداسازی شده‌اند. تاکسون‌های متعلق به Dothidiales مانند فرم‌های آنامورفی *Phyllosticta* مربوط به جنس *Guignardia* و فرم آنامورفی *Hormonema* مربوط به جنس‌های *Dothiora* و *Pringsheimia* و تاکسون‌های دیگری از Diaporthales مانند *Phomopsis* و گونه‌های مختلفی از Hypocreales به عنوان اندوفیت‌های همه‌جایی هستند (استون و همکاران، 2004).

3- جداسازی جدایه های قارچی اندوفیت

برای جداسازی جدایه‌های قارچی اندوفیت بدلیل اینکه احتمال ادغام این جدایه‌ها زمانی که روی مواد غذایی به سرعت در حال رشد هستند وجود دارد از محیط کشت‌هایی که خیلی غنی از مواد غذایی نباشد استفاده می‌شود. گاهی محیط کشت می‌تواند دارای مواد بازدارند رشد باشد و یا حتی مانند آب آگار از نظر مواد غذایی بسیار ضعیف باشد.

یک محیط کشت باید دارای یک منبع کربن، یک منبع نیتروژن و نیز نمک‌های مختلف معدنی باشد تا رشد قارچ را باعث شود. محیط‌های کشت پایه باید طوری آماده بشوند که بدون جلوگیری از رشد قارچ‌ها، مانع رشد باکتری شوند که با اضافه نمودن عوامل ضد باکتری به محیط کشت میسر می‌شود. محیط کشتی که به این صورت تهیه می‌شود برای جداسازی میکروفلور عمومی قارچ مناسب است. برای بدست آوردن یک قارچ خاص لازم است محیط کشت انتخابی شود. این هدف با کاربرد مواد غذایی مناسب برای رشد گونه مورد نظر ولی غیر قابل مصرف برای گونه‌های دیگر قابل انجام است. یک چنین فرآیندی نیاز به دارا بودن دانش خوبی درباره‌ی احتیاجات غذایی جدایه قارچی مورد نظر دارد که باید مطالعه شود و این امر هنوز یک امر نادر است. پس معمولاً

می‌توان با کاربرد ممانعت‌کننده‌هایی با دامنه تأثیر وسیع از رشد دیگر قارچ‌ها جلوگیری کرد ولی قارچ مورد نظر هنوز توان رشد داشته باشد (داوت و راکسل، 2000).

3-1- عناصر پایه

3-1-1- منبع کربن

در محیط‌های کشت با پایه آرد غلات یا سیب‌زمینی منبع کربن همیشه از یک گلوسید همانند گلوکز، ساکارز، عصاره جو یا نشاسته که به آسانی قابل تجزیه شدن است تشکیل می‌شود. هنوز خیلی مرسوم نیست که یک منبع کربن به ویژه در ارتباط با جداسازی قارچ خاصی انتخاب شود. با وجود این، به نظر می‌رسد که احتمال تهیه یک محیط کشتی که بیش‌تر خاصیت انتخابی داشته باشد وجود دارد. در تمامی مواردی که یک منبع خاص از کربن استفاده می‌شود باید دقت نمود تا از ترکیب آن با بستره‌ی دیگری که جذب آن ساده است یا از خطر از دست دادن بخش زیادی از تأثیر انتخابی بودن محیط کشت خودداری شود.

3-1-2- منبع نیتروژن

نیتروژن می‌تواند به اشکال معدنی یا آلی تهیه شود. قارچ‌ها نیتروژن آمونیاکی و نیتروژن نیتریتی را بیشتر جذب می‌نمایند. با وجود این، موکورال‌ها در حضور نیتروژن نیتریتی به خوبی رشد نمی‌نمایند. در نتیجه استفاده از نیتروژن نیتریتی در محیط کشت جداسازی، کمک به محدود کردن تکثیر این مهاجمان ناخواسته می‌نماید. نیتروژن آلی در موقع استفاده بیشتر به شکل پپتون استفاده می‌شود. منبع نیتروژن بندرت اسید گلوتامیک، آسپاراژین یا یک محصول هیدرولیز شده از کازئین است. مشاهده می‌شود که این منابع نیتروژن آلی می‌توانند به عنوان منابع کربن نیز استفاده می‌شوند. در حقیقت، گاهی این ترکیبات بدون اضافه کردن شکر اضافی به همین ترتیب مصرف می‌شوند. اما در این صورت با در نظر گرفتن مقدار کربن موجود برای قارچ‌ها، بستره شامل نیتروژنی بیش از مقدار موردنیاز آن‌ها خواهد بود. در نتیجه محیط کشت بتدریج از نظر آمونیوم غنی‌تر شده و منجر به افزایش pH می‌شود.

3-1-3- نسبت کربن به نیتروژن

نسبت کربن به نیتروژن در توده‌ی زنده‌ی قارچی در دامنه 12-9 بوده که این نسبت در زیست توده باکتریایی بیش‌تر است. در موقع تهیه محیط کشت، این نسبت بندرت در نظر گرفته می‌شود. با وجود این، در برخی مواقع نسبت کربن به نیتروژن بستره به نحوی افزیش می‌یابد که باعث القای تولید اسکلرت شده یا باعث افزایش شدت رنگ قارچ می‌شود که این خود باعث شناخت ساده‌تر قارچ می‌شود.

4-1-3- عناصر معدنی

افزون‌بر کربن و نیتروژن، عناصر معدنی مهم دیگر شامل فسفر، پتاسیم، منیزیوم و گوگرد هستند. این عناصر به صورت PO_4^{-3}، K^+، Mg^{+2} و SO_4^{-2} تهیه می‌شوند. فلزاتی از قبیل مس، مولیبدن، آهن و روی بخشی از ترکیب آنزیم‌ها هستند معمولاً به صورت ناخالص در آگار و اجزای اصلی تشکیل‌دهنده‌ی محیط کشت وجود داشته و در نتیجه افزودن آن‌ها به محیط کشت به طور مطلق لازم نیست. با وجود این، محیط‌های کشت اغلب به وسیله آهن غنی می‌شوند. خیلی بندرت، چند میلی‌لیتر از محلول عناصر کم مصرف به محیط کشت اضافه می‌شود.

5-1-3- عوامل رشد

تاکنون مطالعات منظمی درباره الزام اضافه کردن عوامل رشد به یک محیط کشت برای قارچ‌ها وجود ندارد. به نظر می‌رسد که محیط‌های کشت طبیعی شامل مقادیر کافی از این عوامل هستند. عصاره‌ی مخمر که اساسا شامل ویتامین‌های گروه بی هستند اغلب ولی نه همیشه به محیط‌های کشت مصنوعی اضافه می‌شود.

6-1-3- عامل جامد کردن محیط‌های کشت

جامدسازی محیط‌های کشت همیشه به وسیله آگار انجام می‌شود. آگار یک پلیمر قندی است که در حقیقت یک گالاکتان است که تا حدودی به وسیله‌ی اسید سولفوریک استری شده است. تعداد زیادی از اکتینومیست‌ها، همچنین باکتری‌های حقیقی و حتی قارچ‌ها می‌توانند از آن به عنوان منبع کربن استفاده نمایند. پیش از اتوکلاو نمودن محیط

کشت، بایستی از پخش یکنواخت آگار در فلاسک‌ها اطمینان حاصل شود. بسته به میزان سفتی مورد نظر محیط کشت، 10 تا 40 گرم آگار در یک لیتر از محیط کشت مصرف می‌شود. با وجود این آگار خیلی سفت برای رشد درونی ریسه‌ها مضر است. زیرا وقتی که این ریسه‌ها در سطح رشد می‌کنند بیشتر در معرض آلودگی‌های باکتریایی قرار می‌گیرند (داوت و راکسل، 2000).

3-2- عوامل اصلی گزینش‌گری

3-2-1- محرک‌های رشد

انتخاب یک منبع کربن مناسب می‌تواند برای رشد یک قارچ مناسب باشد در حالی که دیگر گونه‌های قارچی قادر به استفاده آن نباشند. ترکیبات دیگری که در مقادیر خیلی کم به محیط کشت اضافه می‌شوند هم می‌تواند تأثیر تحریکی داشته باشند. به عنوان مثال روغن ذرت بدلیل اینکه دارای ویتامین‌های محلول در چربی و استرول است، رشد برخی از قارچ‌ها را تحریک می‌نماید.

3-2-2- ممانعت‌کننده‌ها

در بیش‌تر موارد گزینش‌گری محیط کشت راه جلوگیری کم و بیش کامل از رشد ریزجانداران ناخواسته حاصل می‌شود.

3-2-3- pH

pH مناسب برای رشد قارچ‌ها بین 5/5-6 است، ولی این موجودات عموماً می‌توانند شرایط اسیدی را خیلی بهتر از باکتری‌ها تحمل نمایند. در نتیجه می‌توان تکثیر باکتری‌ها را با پایین آوردن pH محیط کشت جداسازی محدود کرد. وقتی که محیط کشت طبیعتا اسیدی نیست، می‌توان با اضافه کردن چند قطره اسید سولفوریک، اسید هیدروکلریک، اسید فسفریک pH محیط را پایین آورد، ولی برای چنین هدفی بیش‌تر از اسید لاکتیک استفاده می‌شود. بیشتر محیط‌های کشت پیشنهادی دارای pH بین 5/5-4/5 هستند.

3-2-4- فلزات سنگین

فلزات سنگین دارای تأثیر بازدارندگی عمومی روی ریزجانداران هستند. با وجود این برخی از گونه‌ها بهتر از بقیه، فلزات سنگین را تحمل می‌نمایند. این خصوصیت سبب شده تا از آن‌ها در تهیه برخی از محیط‌های کشت اختصاصی استفاده شود. مس به شکل سولفات یک عضو تشکیل‌دهنده چندین محیط کشت است که به‌تازگی توسعه داده شده‌اند. اگرچه لیتیوم جزو گروه فلزات سنگین محسوب نمی‌شود، کلرور لیتیوم برای ممانعت انتخابی از رشد تریکودرما و نیز جلوگیری از رشد قارچ‌های کند رشد استفاده می‌شود.

3-2-5- آنتی بیوتیک های ضد باکتری

این امکان وجود دارد که با استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها تقریباً بطور کامل باکتری‌ها را از محیط‌های جداسازی حذف نمود (جدول1). آنتی‌بیوتیک‌ها وقتی که درجه حرارت بالا می‌رود عموماً تغییر ماهیت می‌دهند. در نتیجه باید آنتی‌بیوتیک‌ها پس از اتوکلاو شدن محیط کشت به آن اضافه شوند. تنها کلرامفنیکول مقاوم به حرارت است. حدود 0/5 تا 2 میلی‌لیتر از محیط پایه غلیظ آنتی‌بیوتیک به یک لیتر از محیط کشتی که در 50 درجه سلسیوس به حالت مذاب نگهداری شده، پیش از ریختن محیط کشت در تشتک‌های پتری اضافه می‌شود. باید دقت شود تا پیش از اینکه محیط کشت در تشتک‌های پتری پخش شود آنتی‌بیوتیک به‌خوبی و به طور یکنواخت در آن پخش شود. محیط پایه باید درست پیش از مصرف تهیه شده و نباید انبار شود. بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های رایج ضد باکتری محلول هستند. آب مقطر سترون برای تهیه محیط‌های کشت پایه استفاده می‌شود. باید محلول‌های غلیظ کلرامفنیکول ترجیحاً در اتانول تهیه شوند. استرپتومایسین‌ها و کلرامفنیکول‌ها رایج‌ترین آنتی‌بیوتیک‌های مورد استفاده هستند. این آنتی‌بیوتیک‌ها این برتری را دارند که دارای دامنه تأثیر وسیع بوده و در محلول، مخصوصا در محیط‌های اسیدی بسیار پایدارند. این خصوصیت باعث می‌شود که تا چند روز پس از تهیه تشتک‌های پتری، از آن‌ها استفاده شود. با وجود این شبیه بیشتر آنتی‌بیوتیک‌های دیگر دارای اثربازدارندگی بارزی روی قارچ‌های اعضای پی‌تیاسه هستند (داوت و راکسل، 2000).

جدول 1- برخی از ویژگی‌های آنتی‌بیوتیک‌های ضد باکتری (داوت و راکسل، 2000)

خانواده	نام	حلالیت در	پایداری	دامنه تأثیر
الیگوساکاریدها	استرپتومایسین	خیلی محلول	خیلی پایدار در محلول	وسیع بخصوص
	نئومایسین	خیلی محلول	پایدار در محلول	وسیع
	کانامایسین	خیلی محلول	پایدار در محلول	وسیع
	توبرامایسین	خیلی محلول	پایدار در محلول	وسیع
تتراسایکلین‌ها	تتراسایکلین	محلول	پایدار در محلول	وسیع
	کلروتتراسایکلین	محلول	خیلی پایدار نیست	وسیع
فنل‌ها	کلرامفنیکول	خیلی محلول	خیلی پایدار در محلول و	وسیع
	نووبیوسین	کمی محلول	حساس به نور	بازدارنده
بتالاکتامین‌ها	پنی‌سیلین جی	خیلی محلول	ناپایدار در محلول‌های	وسیع بخصوص
	آمپی‌سیلین	محلول	پایدار در محلول‌های اسیدی	وسیع
پلی‌پپتیدها	پلی‌میکسین بی	محلول	کمی پایدار	بازدارنده
	باسیتراسین	محلول	کاملاً پایدار در محلول‌های	وسیع
گلیکوپپتیدها	ونکومایسین	خیلی محلول	کمی پایدار	بازدارنده

6-2-3- قارچ‌کش‌ها

قارچ‌کش‌ها بخشی از عوامل انتخابی بوده که به شکل گسترده‌ای در محیط‌های کشت جداسازی استفاده می‌شوند. قارچکش‌های دارای دامنه تأثیر وسیع معمولاً با آن‌هایی که دارای دامنه تأثیر محدود هستند ترکیب می‌شوند. قارچ‌کش‌های دارای دامنه تأثیر وسیع به حذف تمام قارچ‌هایی کمک می‌نمایند که متعلق به خانواده‌ها یا رده‌هایی هستند که از گونه موردنظر دور هستند. برای مثال حذف قارچ‌هایی با ریسه دیواره‌دار وقتی که می‌خواهیم یک قارچ اُاُمیست جدا شود. در این مورد اغلب کینتوزن و بنومیل استفاده می‌شوند. از کلرونب و فنامینوسولف برای حذف قارچ‌های اُاُمیست استفاده می‌شود. قارچ‌کش‌های دارای دامنه تأثیر

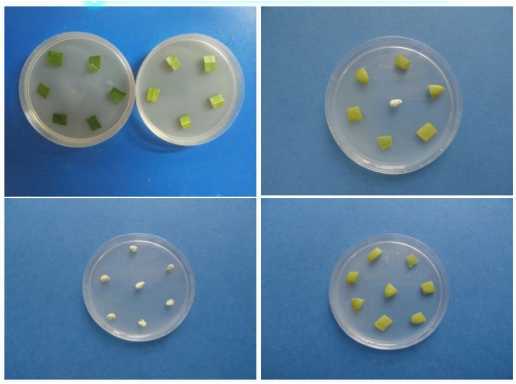
کم برای حذف جنس‌هایی که رابطه‌ی خویشاوندی نزدیکی با گونه مورد نظر دارند به کار می‌روند بدون این که سرعت رشد گونه دلخواه را خیلی کند کنند.

3-2-7- بازدارنده های دیگر

- اسید بوریک و نمک سدیم آن: به سبب داشتن ویژگی‌هایی مانند پاک‌کنندگی و گندزدایی اغلب به صورت محلول استفاده می‌شوند. این مواد جزئی از مواد تشکیل‌دهنده محیط‌های کشت تهیه شده برای جداسازی *Phoma betae* و *Fusarium oxysporum* هستند.
- اکریفلاوین: این ماده مخلوطی از دی آمینو متیل اکریدینیوم دیکلراید و دی آمینو اکریدین است. این ماده‌ی خیلی محلول دارای تأثیر بازدارندگی رشد باکتری و قارچ‌ایستایی کاملاً وسیع است. این ماده یک ماده جهش‌زا هم است. قارچ *Gliocladium roseum* به ویژه نسبت به آن مقاوم است.
- آلیل‌الکل: به‌خاطر ویژگی‌های علف‌کشی خود شناخته شده است. این ماده دارای اثر ضد قارچی نیز است. تریکودرما به خوبی آن را تحمل می‌نماید.
- رنگ‌ها: رزبنگال زمانی که آنتی‌بیوتیک‌ها به سادگی در دسترس نبودند به عنوان یک باکتری‌کش به طور وسیعی استفاده شده است. حتی امروزه رزبنگال اغلب به همراه آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده می‌شود زیرا بدون اینکه قارچ‌ایستا باشد رشد قارچ‌ها را آهسته نموده و اندازه‌ی پرگنه‌ها را محدود می‌سازد. از این‌رو شمارش و جداسازی آن‌ها را ساده‌تر می‌کند. کریستال ویوله نیز دارای ویژگی‌های مشابهی است ولی بعلت دارا بودن رنگ تیره که مانع دید می‌شود استفاده نمی‌شود.
- فنل‌ها: تأثیر بازدارندگی آن‌ها سبب شده تا در تهیه محیط کشت برای جداسازی برخی از بازیدیومیست‌ها استفاده شوند (داوت و راکسل، 2000).

برای جداسازی قارچ‌های اندوفیت، بافت‌های گیاهی مورد نظر زیر جریان ملایم آب شیر به مدت 10 دقیقه شسته و سپس چهار مرتبه با آب مقطر سترون شست و شو داده می‌شوند. پس از آن، به مدت یک دقیقه در اتانول 70 درصد غوطه‌ور و به دنبال آن به مدت پنج دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم رقیق شده سه درصد غوطه‌ور گردیده و سرانجام چهار مرتبه با عبور دادن از آب مقطر سترون، شست و شو داده می‌شوند. سپس

نمونه‌ها در زیر هود با کمک پنس سترون برای حذف آب سطحی اضافی، مابین کاغذ صافی سترون آبگیری می‌شوند. پس از رطوبت‌گیری و خشک شدن، هر یک از بخش‌های مختلف نمونه‌های گیاهی به قطعات کوچک به ابعاد در حدود 0/5× 0/5 سانتی‌متر برش داده شده و روی محیط کشت آب اگار دو درصد منتقل می‌شوند (شکل 1).



شکل 1- کشت بخش‌های مختلف گیاهی برای جداسازی قارچ‌های اندوفیت (دولت آباد و همکاران، 1395)

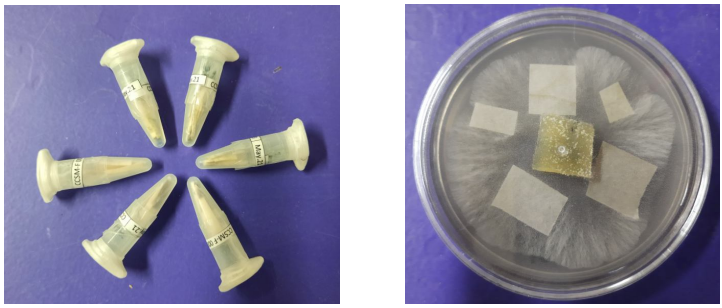
تشتک‌های پتری کشت‌شده درون انکوباتور با دمای 25 درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی به مدت 15 الی 30 روز نگهداری می‌شوند. تشتک‌های پتری به صورت مرتب و روزانه بازبینی شده و قارچ‌های رشد نموده از حاشیه بافت‌های گیاهی به طور جداگانه و توسط سوزن‌های سترون برداشته شده و به داخل تشتک‌های پتری جدید دارای محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار محتوی آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین منتقل می‌شوند (لیانگ و همکاران، 2012).

4- خالص‌سازی جدایه‌های قارچی اندوفیت

برای تهیه جدایه‌های خالص از یک قارچ اندوفیت از روش‌های تک اسپور و نوک ریسه استفاده می‌شود. در روش نوک ریسه قارچ در تشتک‌های دارای آب-آگار دو درصد کشت داده شده و بیست و چهار ساعت پس از کشت، محل نوک ریسه‌ها در پشت تشتک

پتری نشانه گذاری می‌شوند. نوک ریسه به همراه مقداری از آگار اطراف آن با سوزن سترون به محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار منتقل گردیده و تشتک‌ها به مدت سه تا چهار روز در تاریکی و در دمای اطاق نگهداری می‌شوند.

برای نگهداری جدایه‌های قارچی خالص‌سازی شده از لوله‌های فالکون وکاغذ صافی سترون استفاده می‌شود. روش استفاده از لوله‌های فالکون به این ترتیب است که قرص‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه‌های فعال هر جدایه برداشته شده و به محیط کشت مورب سیب‌زمینی دکستروز آگار درون لوله‌های فالکون منتقل می‌شود. سپس به مدت هفت روز درون انکوباتور با دمای 25 درجه سلسیوس قرار داده شده و پس از رشد برای نگهداری به دمای چهار درجه سلسیوس منتقل می‌شوند. در روش کاغذ صافی سترون نخست یک قطعه آگار دارای میسلیوم خالص قارچ در مرکز تشتک پتری دارای محیط غذایی سیب‌زمینی دکستروز آگار قرار داده می‌شود. سپس تکه‌های کاغذ صافی سترون دور تا دور این قطعه قرار داده می‌شوند. تشتک‌ها به مدت 2-1 هفته درون انکوباتور با دمای 25 درجه سلسیوس نگهداری می‌شوند. پس از رشد قارچ و نفوذ میسلیوم‌ها به داخل کاغذ صافی، تشتک‌ها از انکوباتور خارج شده، قطعات کاغذ صافی دارای میسلیوم‌های قارچ در زیر هود سترون از روی محیط کشت برداشته شده و در بین کاغذ خشک‌کن سترون به مدت 48 ساعت خشک می‌شوند. سپس به کمک قیچی سترون به قطعات کوچکتری برش داده شده و قطعات مربوط به هر جدایه به لوله‌های پلاستیکی درب‌دار 1/5 میلی‌لیتری سترون منتقل می‌شوند. درب لوله‌ها با پارافیلم مسدود و به درون فریزر با دمای 20- درجه سلسیوس منتقل می‌شوند (شکل2).



شکل 2- نگهداری جدایه‌های قارچی اندوفیت خالص‌سازی شده به روش کاغذ صافی (دولت آباد و همکاران، 1395).

5- شناسایی ریخت‌شناسی جدایه‌های قارچی

برای شناسایی ریخت‌شناسی جدایه‌های قارچی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی از قبیل ویژگی‌های پرگنه، ویژگی های رشدی و ساختارهای تکثیری غیرجنسی و جنسی در صورت تشکیل در محیط کشت استفاده می‌شود. بدین منظور کلیه نمونه‌های مورد بررسی تحت مطالعه ماکروسکوپی و میکروسکوپی قرار می‌گیرند. برای مطالعه ویژگی‌های مربوط به پرگنه قارچ‌های جداسازی شده، نخست همه جدایه‌ها به مدت هفت روز روی محیط کشتت سیب‌زمینی دکستروز آگار در شرایط تاریکی و دمای 25 درجه سلسیوس رشد داده می‌شوند. سپس قرص‌های میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه‌های در حال رشد برداشته شده به مرکز تشتک‌های پتری دارای محیط‌های کشت ویژه هر جنس قرار داده می‌شوند. تشتک‌های پتری مذکور در شرایط نوری و دمایی مناسب هر جنس که در منابع ذکر شده است، نگهداری می‌شوند. پس از طی مدت زمان معین، ویژگی‌های مربوط به پرگنه قارچ شامل رنگ سطح و پشت پرگنه، نوع بافت پرگنه قارچی، شیوه رشد حاشیه پرگنه، نواحی رشد موجود در پرگنه و ویژگی‌های مربوط به تشکیل اندام‌های باردهی و غیره بررسی می‌شوند. به منظور بررسی ویژگی‌های میکروسکوپی و اندازه‌گیری ابعاد ساختارهای تکثیری قارچی، اسلایدهای میکروسکوپی هر نمونه بسته به قارچ و ویژگی‌های اندام قارچی در محلول لاکتوفنل و کاتن بلو- لاکتوفنل تهیه می‌شود. در هر مورد برحسب میزان دسترسی 30 الی 50 اندام اندازه‌گیری و دامنه تغییرات اندازه آن‌ها محاسبه می‌شود. برای تهیه اسلایدهای میکروسکوپی از ترکیبات زیر استفاده می‌شود:

لاکتوفنل: 20 گرم فنل کریستال، 20 میلی‌لیتر اسید لاکتیک، 40 میلی‌لیتر گلیسیرین و 20 میلی‌لیتر آب مقطر.

کاتن‌بلو- لاکتوفنل: با افزودن 5-1 میلی‌لیتر محلول آبکی یک درصد کاتن بلو به 100 میلی‌لیتر لاکتوفنل تهیه می‌شود. می‌توان برحسب نیاز 20-0 میلی‌لیتر اسید لاکتیک نیز به محلول حاصل اضافه نمود.

برای شناسایی گونه‌های قارچی از کلیدها و مقالات معتبر شناسایی قارچها شامل الیس (1971) و (1976)، بیست (1984)، سیوانسان (1987)، کلیچ (2002)، سیمونز (2007)، سیفرت و همکاران (2011)، وودنبرگ و همکاران (2013)، مانامگودا و همکاران (2014) و دی بییر و همکاران (2014) استفاده می شود.

محیط کشت‌های پایه زیر برای شناسایی ریخت‌شناسی مورد استفاده می‌شوند.

محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA)

مقدار 200 گرم سیب زمینی پس از پوست‌گیری و تقسیم به قطعات خرد در ظرفی محتوی یک لیتر آب مقطر ریخته می‌شود. پس 30-20 دقیقه جوشیدن، با استفاده از پارچه ململ عصاره آن گرفته می‌شود. به این محلول 20 گرم دکستروز و 20 گرم آگار اضافه می‌شود. حجم محلول به یک لیتر رسانده در دمای 120 درجه سلسیوس و فشار یک اتمسفر به مدت 20 دقیقه سترون می‌شود. همچنین در صورت استفاده از پودر تجاری PDA ، به میزان 39 گرم در یک لیتر آب مقطر حل و در دمای 121 درجه سلسیوس به مدت 20 دقیقه سترون می‌شود.

محیط کشت آب- آگار (WA)

برای تهیه این محیط کشت از آگار به میزان 20 گرم در یک لیتر آب مقطر استفاده می‌شود و سپس به روش قبل سترون می‌شود. این محیط کشت بیشتر برای خالص‌سازی استفاده می‌شود (پرات، 2005).

محیط کشت سیب زمینی- هویج- آگار (PCA)

برای تهیه این محیط کشت، مقادیر 20 گرم سیب زمینی پوست کنده و 20 گرم هویج در آب مقطر به طور کامل پخته و به کمک پارچه ململ عصاره آن‌ها گرفته می‌شود. به عصاره حاصل، 20 گرم آگار اضافه می‌شود. سپس با افزودن آب مقطر حجم مخلوط به یک لیتر افزایش داده و درون اتوکلاو سترون می‌شود. از این محیط کشت برای شناسایی گونه‌های قارچ‌های *Alternaria* و *Ulocladium* استفاده می‌شود(سیمونز، 2007).

محیط کشت آرد یولاف- آگار (OA)

برای تهیه این محیط کشت، مقدار 20 گرم آرد یولاف در 0/5 لیتر آب شیر به مدت یک ساعت جوشانده و سپس به کمک یک پارچه ململ تمیز عصاره آن گرفته می‌شود. مقدار 15 گرم آگار به عصاره حاصل اضافه می‌شود و سپس با افزودن آب شیر حجم محلول به یک لیتر

افزایش داده می‌شود و در آخر به مدت 20 دقیقه در دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/5 اتمسفر درون اتوکلاو سترون می‌شود (بورما و همکاران، 2004).

محیط کشت زاپک-مخمر-آگار (CYA)

برای تهیه این محیط کشت، مقدار 48 گرم پودر CYA ساخت کارخانه مرک آلمان به یک لیتر آب مقطر اضافه می‌شود و در نهایت به مدت 20 دقیقه در دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/5 اتمسفر درون اتوکلاو سترون می‌شود. از این محیط کشت برای توصیف گونه‌های قارچ *Aspergillus*، *Penicillium* و *Geosmithia* استفاده می‌شود (کلیچ، 2002).

محیط کشت عصاره مالت-آگار (MEA)

برای تهیه این محیط کشت، مقدار 48 گرم پودر MEA ساخت کارخانه مرک آلمان به یک لیتر آب مقطر اضافه می‌شود و درآخر به مدت 20 دقیقه در دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/5 اتمسفر درون اتوکلاو سترون می‌شود (کلیچ، 2002).

محیط کشت ساکاروز- نیترات- آگار (SNA)

محیط کشت SNA شامل یک گرم KH_2PO_4، یک گرم KNO_3، 0/5 گرم KCL، 0/5 گرم $MgSO_4.7H_2O$، 0/2 گرم گلوکز، 0/2 گرم ساکاروز و 20-17 گرم آگار در یک لیتر آب است. پس از تهیه، محیط کشت در دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/5 اتمسفر به مدت 20 دقیقه درون اتوکلاو سترون می‌شود (نلسون و همکاران، 1981). از این محیط هم برای نگهداری طولانی مدت جدایه‌های جنس *Fusarium* و همچنین بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناسی میکروکنیدیوم‌ها مانند نحوه تشکیل آن‌ها در زنجیره کنیدیایی و یا سرهای دروغین استفاده می‌شود. در این محیط کشت به دلیل وجود مواد قندی کمتر از محیط‌های غذایی عمومی، احتمال جهش و تغییرات ژنتیکی قارچ کمتر می‌شود.

محیط کشت برگ میخک- آگار (CLA)

برای تهیه محیط کشت CLA ابتدا برگ‌های میخک (*Dianthus caryphilus*) تازه و پاک از باقی مانده سموم را قطعه قطعه کرده و این قطعات به مدت نیم ساعت در دمای

50 درجه سلسیوس خشک شده و داخل تشتک پتری شیشه‌ای ریخته می‌شود و به مدت نیم ساعت در در دمای 121 درجه سلسیوس درون اتوکلاو سترون می‌شود. برای تهیه محیط CLA حدود چهار الی پنج عدد از این قطعات در تشتک پتری که دارای آب-آگار (سترون شده) که دمای آن به 40 درجه سلسیوس تقلیل پیدا کرده است، قرار داده می‌شود (نلسون و همکاران، 1981). این محیط کشت اسپورزایی قارچ *Fusarium* را تحریک می‌کند و در آن برخی از ویژگی‌های ریخت‌شناسی مانند تشکیل کنیدیوم‌ها، زنجیرهای میکروکنیدیوم، سرهای دروغین، پلی‌فیالید، منوفیالیدها و کلامیدوسپورها قابل ارزیابی است. در این محیط کشت نسبت به محیط‌های کشت غنی از کربوهیدرات تولید کنیدیوم‌ها یکنواخت‌تر است (نلسون و همکاران، 1981).

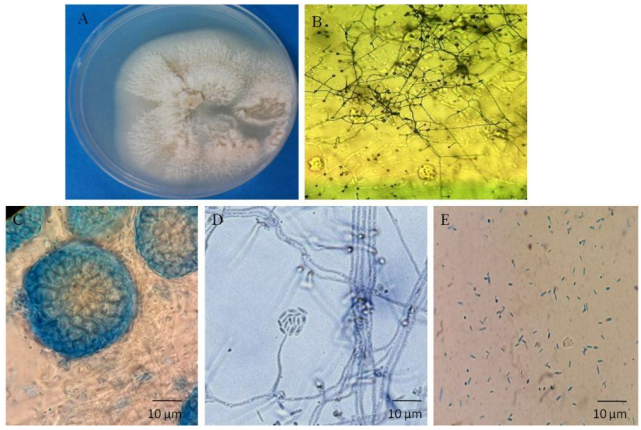
محیط کشت آب شیر - آگار - ساقه گندم (TWA+ Wheat straw)

برای تهیه این محیط کشت، 20 گرم آگار به یک لیتر آب شیر اضافه و پس از حل شدن به مدت 20 دقیقه داخل اتوکلاو با دمای 121 درجه سلسیوس و فشار 1/5 اتمسفر سترون می‌شود. ساقه‌های گندم به اندازه سه الی چهار سانتی‌متر بریده و دو بار با فاصله زمانی 24 ساعت و هر بار به مدت 30 دقیقه در دمای 121 و فشار 1/5 اتمسفر درون اتوکلاو سترون می‌شوند. پس از ریختن 20 میلی‌لیتر از محیط کشت به داخل تشتک پتری پلاستیکی نه سانتی‌متری، سه الی چهار قطعه از ساقه‌های سترون گندم به هر تشتک اضافه می‌شود (سیوانسان، 1987) .

6- معرفی تعدادی از گونه‌های غالب قارچی اندوفیت

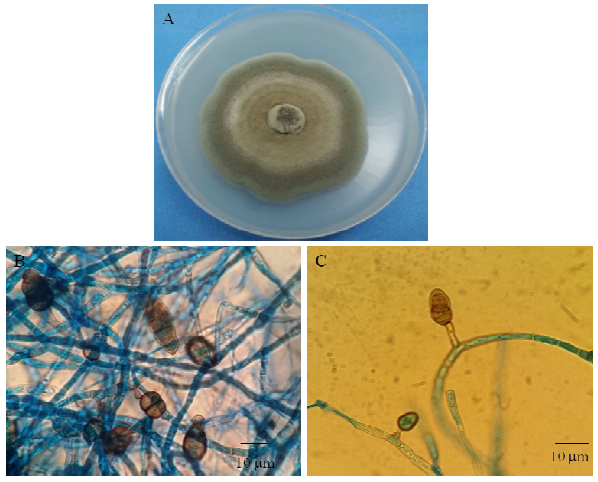
همان طور که پیش از این اشاره شد برای شناسایی ریخت‌شناسی قارچ‌های اندوفیت، بسته به جنس و گونه از ویژگی‌های مربوط به پرگنه قارچ شامل رنگ سطح و پشت پرگنه، نواحی رشد موجود در پرگنه و ویژگی‌های مربوط به تشکیل اندام‌های باردهی و غیره استفاده می‌شود. در ادامه اشکال ریخت‌شناسی تعدادی از گونه‌های قارچی اندوفیت غالب که کمک به شناسایی ریخت شناسی آن‌ها می‌کند اشاره می‌شود (شکل‌های 21-3).

گونه *Acremonium sclerotigenum*



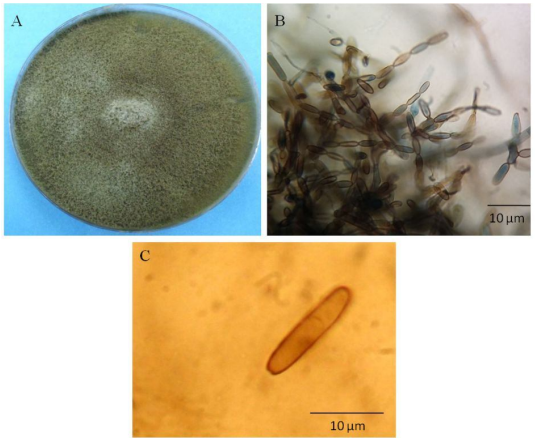
شکل 3 - گونه *Acremonium sclerotigenum*: A) پرگنه 14 روزه روی محیط کشت OA، B) سرهای کنیدیومی، C) اسکلرت‌ها، D) کنیدیوفور و کنیدیوم‌ها و E) کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1398).

گونه *Alternaria consortialis*



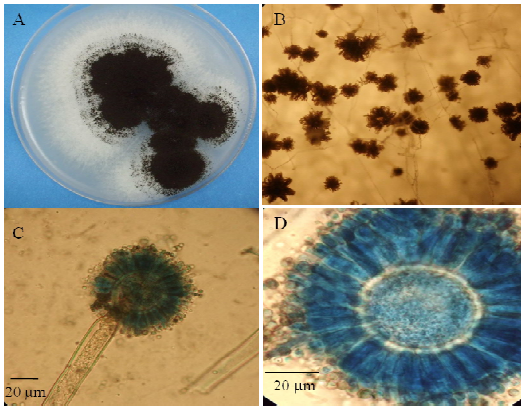
شکل 4 - گونه *Alternaria consortialis*: A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت PCA و B-C) کنیدیوفور و کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1395).

گونه *Alternaria malorum*



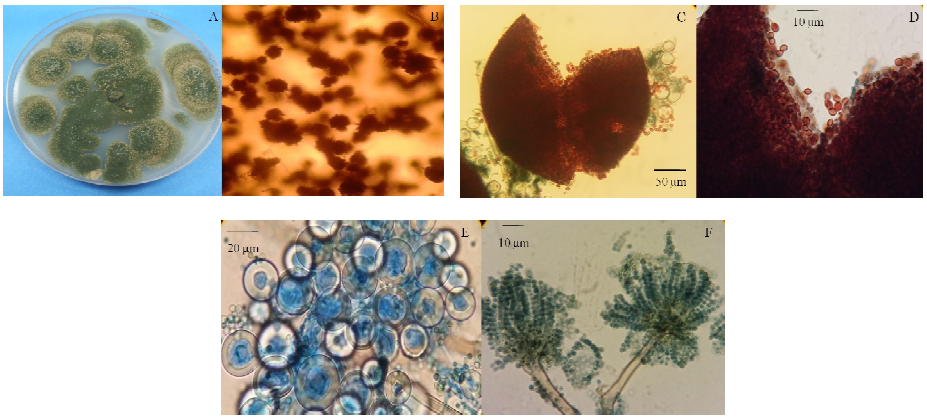
شکل 5 - گونه *Alternaria malorum*: A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت PCA، B) کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها و C) کنیدیوم (دولت آباد و همکاران، 1395).

گونه *Aspergillus niger*



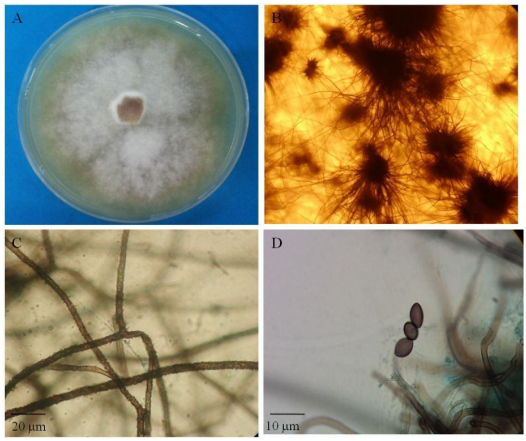
شکل 6- گونه *Aspergillus niger*: A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت CYA، B) سرهای کنیدیومی، C) کنیدیوفور و وزیکل و D) وزیکل و فیالیدها (دولت آباد و همکاران، 1395).

گونه *Aspergillus nidulans*



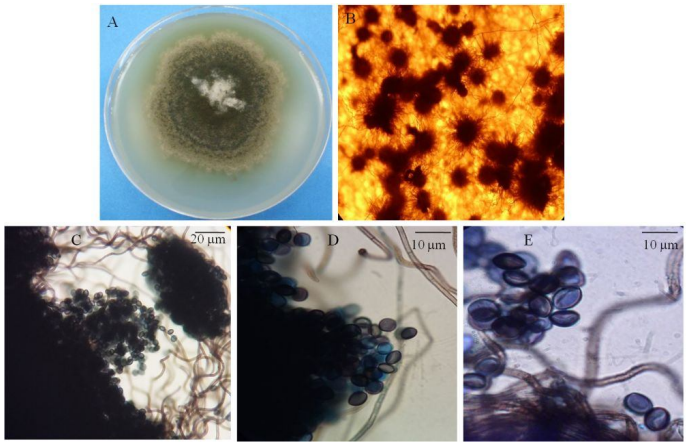
شکل 7- گونه *Aspergillus nidulans*: A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت CYA، B) سرهای کنیدیومی، C) کلیستوتسیوم، D) آسکوسپورها، E) سلول‌های هوول و F) کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1395).

گونه *Chaetomium elatum*



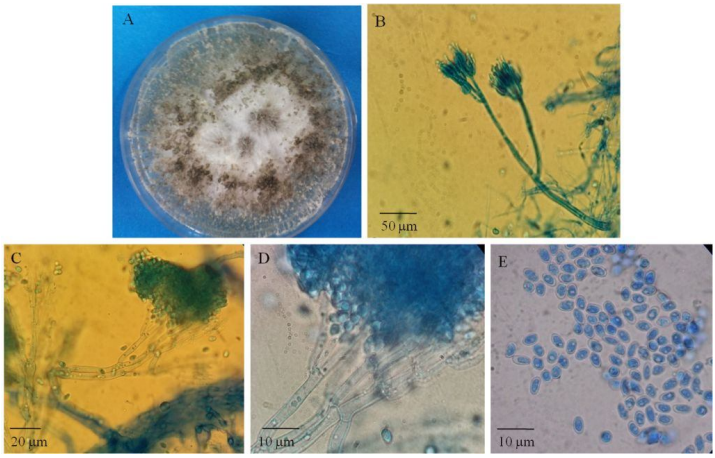
شکل 8- گونه *Chaetomium elatum*: A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت MEA، B) آسکوکارپ‌ها، C) موهای سطح آسکوکارپ و D) آسکوسپورها (دولت آباد و همکاران، 1395).

گونه *Chaetomium globosum*



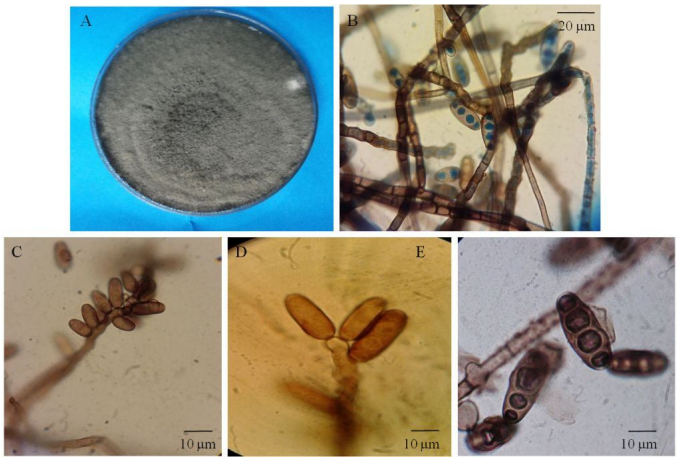
شکل 9- گونه *Chaetomium globosum*: A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت MEA، B) آسکوکارپ‌ها، C و D) آسکوکارپ و آسکوسپورها و E) آسکوسپورها (دولت آباد و همکاران، 1398).

گونه *Clonostachys rosea*



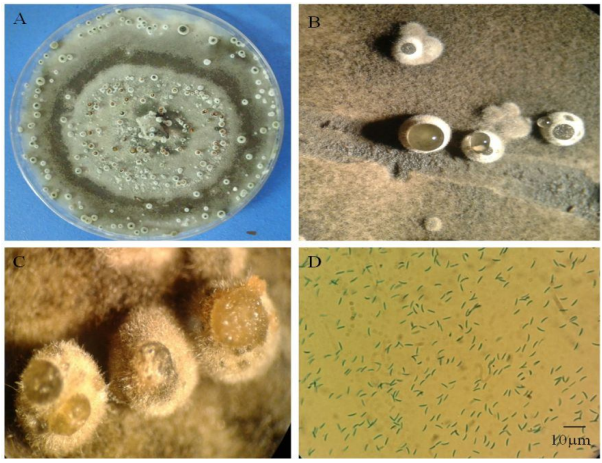
شکل 10- گونه *Clonostachys rosea*: A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت PDA، B-D) کنیدیوفورها و E) کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1398).

گونه *Curvularia australiensis*



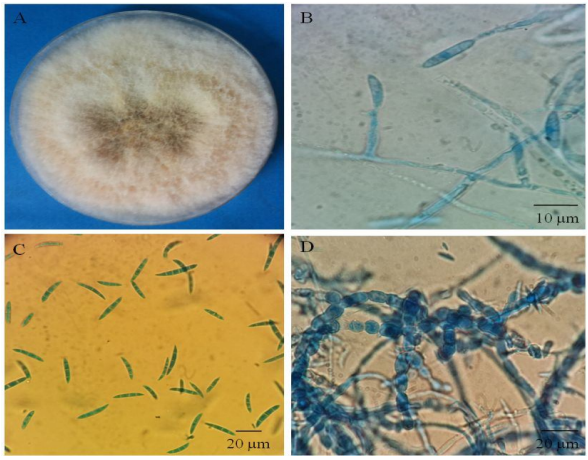
شکل 11- گونه *Curvularia australiensis*: A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت TWA، B-D) کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها و E) کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1395).

گونه *Cytospora leucostoma*



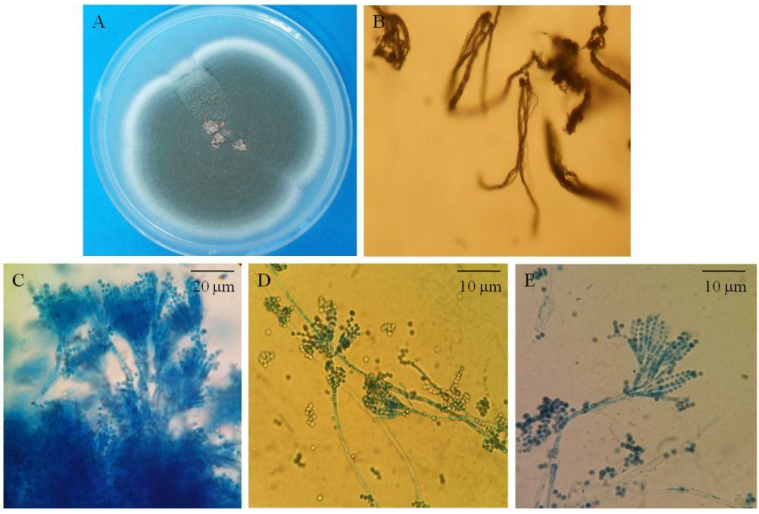
شکل 12- گونه *Cytospora leucostoma*: A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت PDA، B-C) پیکنیدیوم و توده کنیدیایی و D) کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1395).

گونه *Fusarium chlamydosporum*



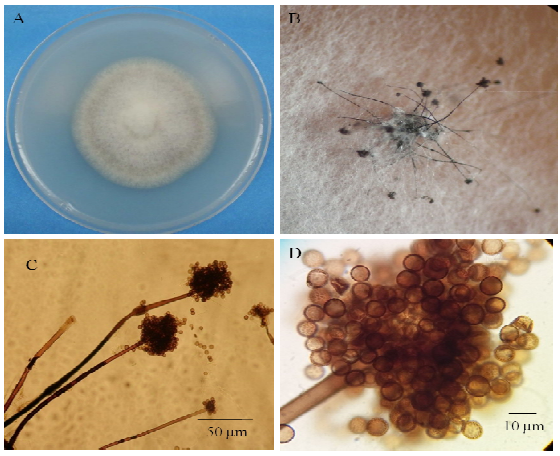
شکل 13- گونه *Fusarium chlamydosporum*: A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت PDA، B) فیالیدها و میکروکنیدیوم‌ها، C) ماکروکنیدیوم‌ها و D) کلامیدوسپورها (دولت آباد و همکاران، 1398).

گونه *Penicillium chrysogenum*



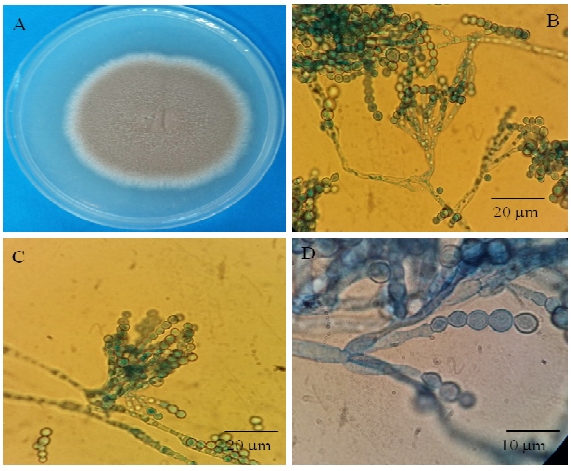
شکل 14- گونه *Penicillium chrysogenum*: A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت CYA، B) زنجیره کنیدیایی، C-E) کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1395).

گونه *Periconia byssoides*



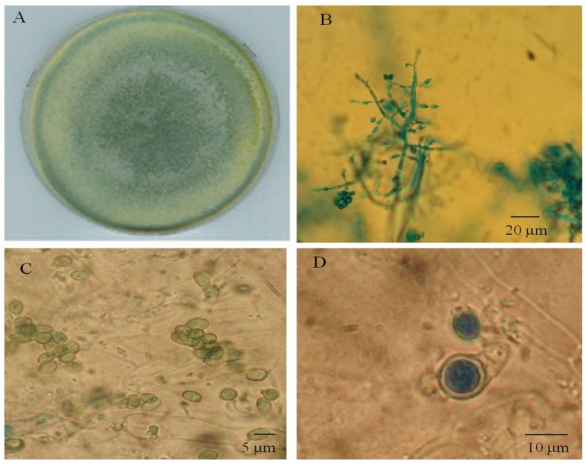
شکل 15 - گونه *Periconia byssoides*: A) پرگنه پنج روزه روی محیط کشت PDA، B-D) کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1395).

گونه *Scopulariopsis brevicaulis*



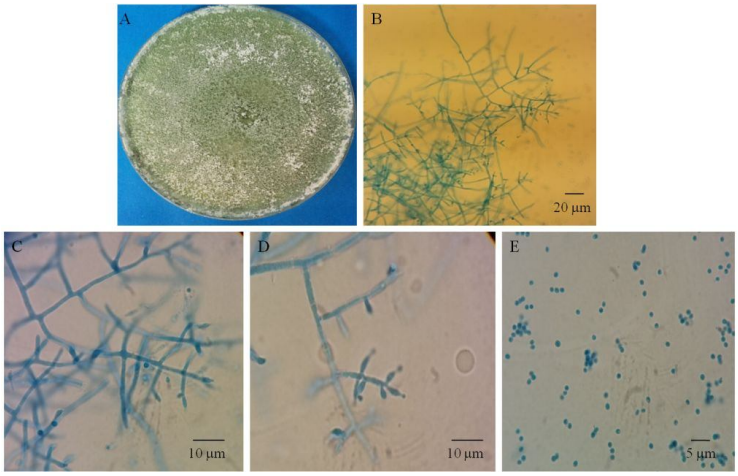
شکل 16- گونه *Scopulariopsis brevicaulis*: A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت CYA و B-D) کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1395).

گونه *Trichoderma atroviride*



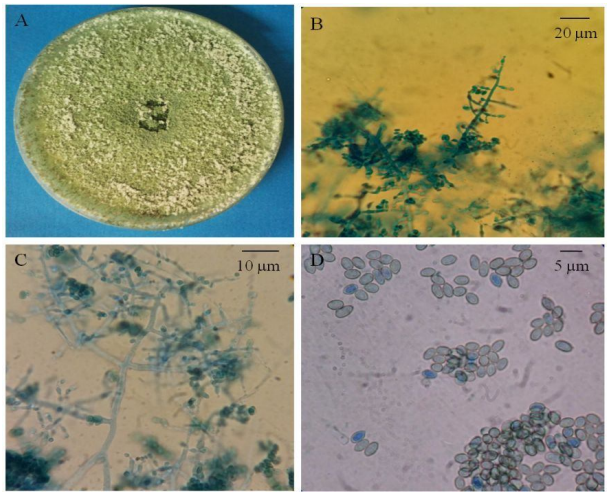
شکل 17- گونه *Trichoderma atroviride*: A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت MEA، B)کنیدیوفورها، C) کنیدیوم‌ها و D) کلامیدوسپورها (دولت آباد و همکاران، 1398).

گونه *Trichoderma harzianum*



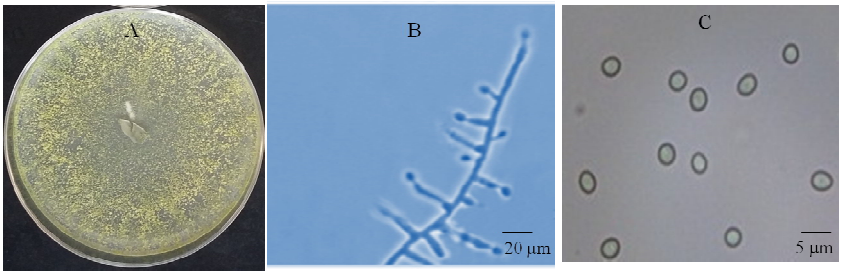
شکل 18- گونه *Trichoderma harzianum*: A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت MEA، B-D) کنیدیوفورها و E) کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1398).

گونه *Trichoderma longibrachiatum*



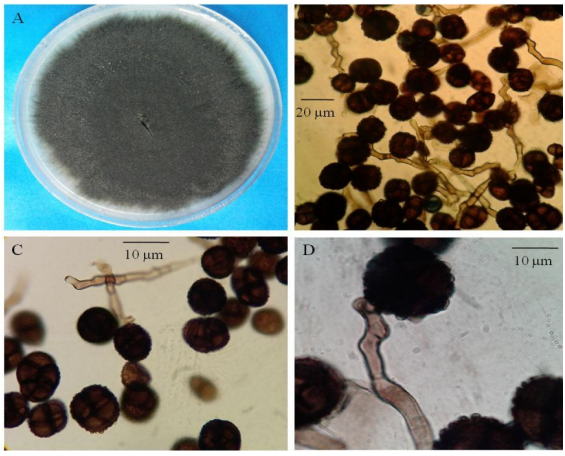
شکل 19- گونه *Trichoderma longibrachiatum*: A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت MEA، B-C) کنیدیوفورها و D) کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1398).

گونه *Trichoderma reesei*



شکل 20- گونه *Trichoderma reesei*: A) پرگنه هفت روزه روی محیط کشت MEA، B) کنیدیوفور و C) کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1395).

گونه *Ulocladium atrum*



شکل 21- گونه *Ulocladium atrum*: A) پرگنه ده روزه روی محیط کشت PCA و B-D) کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها (دولت آباد و همکاران، 1395).

7- منابع

دولت‌آباد، ح.ک.، اسدی‌رحمانی، ه. و رجالی، ف. 1398. شناسایی و بررسی ویژگی‌های محرک رشدی و بیوکنترلی قارچ‌های اندوفیت جدا شده از برگ و میوه پسته. نشریه زیست‌شناسی خاک، 7(1): 53-71.

دولت‌آباد، ح.ک.، جوان‌نیکخواه، م.، احمدزاده، م. و فتوحی‌فر، خ. 1395. بررسی فعالیت ضد قارچی قارچ‌های اندوفیت جدا شده از برخی گیاهان؛ بهبود کارآیی استرین منتخب به روش امتزاج پروتوپلاست‌ها. دانشگاه تهران. 270 ص.

Aly, A.H., Debbab, A. and Proksch, P. 2011. Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90(6), 1829-1845.

Bayman, P. 2006. Diversity, scale and variation of endophytic fungi in leaves of tropical plants. Microbial ecology of aerial plant surfaces. CABI International, Cambridge, pp.37-50.

Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section *Longibrachiatum* sect. nov. *Canadian Journal of Botany*, 62(5), 924-931.

Boerema, G.H., de Gruyter, G., Noordeloos, M.E. & Hamers, M.E.C. (2004). *Phoma* identification manual. CABI, London, UK. pp.479.

Carroll, G.C. 1986. The biology of endophytism in plants with particular reference to woody perennials. In: Fokkema N.J. & Heuvel J.V.D. (Eds.). Microbiology of the Phyllosphere. Cambridge University Press, Cambridge, England. pp.205–222.

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

Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi. *Ecology*, 69(1), 10-16

Davet, P. and Rouxel, F. 2000. Detection and isolation of soil fungi. Science Publishers, Inc..

De Beer, Z.W., Duong, T.A., Barnes, I., Wingfield, B.D. and Wingfield, M.J. 2014. Redefining Ceratocystis and allied genera. *Studies in Mycology*, 79, 187-219.

Debbab, A., Aly, A.H. and Proksch, P. 2011. Bioactive secondary metabolites from endophytes and associated marine derived fungi. *Fungal Diversity*, 49(1), 1-12.

Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England. pp.608.

Ellis, M.B. 1976. More Dematiaceous Hyphomycetes. Commonweath Mycological Institute, Kew, England. pp.507.

Faeth, S.H. and Hammon, K.E. 1997. Fungal endophyte in oak trees: Long-term patterns of abundance and association with leaf miners. *Ecology*, 78(3), 810-819.

González, V. and Tello, M.L. 2011. The endophytic mycota associated with *Vitis vinifera* in central Spain. *Fungal Diversity*, 47(1), 29-42.

Klich, M.A. 2002. Identification of common *Aspergillus* species. Central voor Schimmeltures, Uterch, The Netherlands. pp.116.

Kumar, S. and Kaushik, N. 2013. Endophytic fungi isolated from oil-seed crop *Jatropha curcas* produces oil and exhibit antifungal activity. *PloS one*, 8(2), p.e56202.

Kumar, S., Kaushik, N., Edrada-Ebel, R., Ebel, R. and Proksch, P. 2011. Isolation, characterization, and bioactivity of endophytic fungi of *Tylophora indica*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(3), 571-577.

Kumaresan, V. and Suryanarayanan, T.S. 2002. Endophyte assemblages in young, mature and senescent leaves of *Rhizophora apiculata*: evidence for the role of endophytes in mangrove litter degradation. *Fungal Diversity*, 9, 81-91.

Li, H.Y., Zhao, C.A., Liu, C.J. and Xu, X.F. 2010. Endophytic fungi diversity of aquatic/riparian plants and their antifungal activity in vitro. *The Journal of Microbiology*, 48(1),

Liang, H., Xing, Y., Chen, J., Zhang, D., Guo, S. and Wang, C. 2012. Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1.

Manamgoda, D.S., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E. and Hyde, K.D. 2014. The genus *bipolaris*. *Studies in Mycology*, 79, 221-288.

Maria, G.L., Sridhar, K.R. and Raviraja, N.S. 2005. Antimicrobial and enzyme activity of mangrove endophytic fungi of southwest coast of India. *Journal of Agricultural Technology*, 1(1), 67-80.

Narisawa, K., Kawamata, H., Currah, R.S. and Hashiba, T. 2002. Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *European Journal of Plant Pathology*, 108(2), 103-109.

Nelson, P.E., Toussoun, T.A. and Cook, R.J. 1981. *Fusarium*: diseases, biology and taxonomy. Pennsylvania State University Press, University Park, USDA, pp.457.

Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In Microbial ecology of leaves. Springer New York. pp.179-197.

Pratt, R.G. 2005. Variation in occurrence of dematiaceous Hyphomycetes on forage Bermuda grass over years, sampling times, and locations, ecology and epidemiology. *Phytopathology*, 95, 1184-1190.

Puri, S.C., Verma, V., Amna, T., Qazi, G.N. and Spiteller, M. 2005. An Endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces Camptothecin. *Journal of Natural Products*, 68(12), 1717-1719.

Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M. and Sullivan, T.J. 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29, 319-343.

Schulz, B. and Boyle, C. 2006. What are endophytes? En: B. Schulz, CJ Boyle & TN Sieber.(eds.). Microbial root endophytes. Springer, Berlin, Heidelberg, 9, p.13.

Seifert, K., Morgan-Jones, G., Gams, W. and Kendrick, B. 2011. The genera of Hyphomycetes. Utrecht: CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre. pp.997.

Sieber, T.N. 2007. Endophytic fungi in forest trees: are they mutualists?. *Fungal Biology Reviews*, 21(2), 75-89.

Simmons, E.G. (2007). *Alternaria* an Identification Manual. CBS Biodiversity Series, No. 6. the Netherlands. pp.775.

Sivanesan, A. 1987. Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers*, 158, pp. 261.

Stone, J.K., Polishook, J.D. and White, J.J.F. 2004. Endophytic fungi. pp. 241–270. In: Mueller G.M. Bills G.F. and Foster M.S. (Eds.). Biodiversity of Fungi, Inventory and Monitoring Methods. Elsevier Academic Press, USA.

Strobel, G., Daisy, B., Castillo, U. and Harper, J. 2004. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, 67(2), 257-268.

Strobel, G.A. 2003. Endophytes as sources of bioactive products. *Microbes and infection*, 5(6), 535-544.

Tan, R.X. and Zou, W.X. 2001. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*, 18(4), 448-459.

Todd, D. 1988. The effects of host genotype, growth rate, and needle age on the distribution of a mutualistic, endophytic fungus in Douglas-fir plantations. *Canadian Journal of Forest Researc*h, 18(5), 601-605.

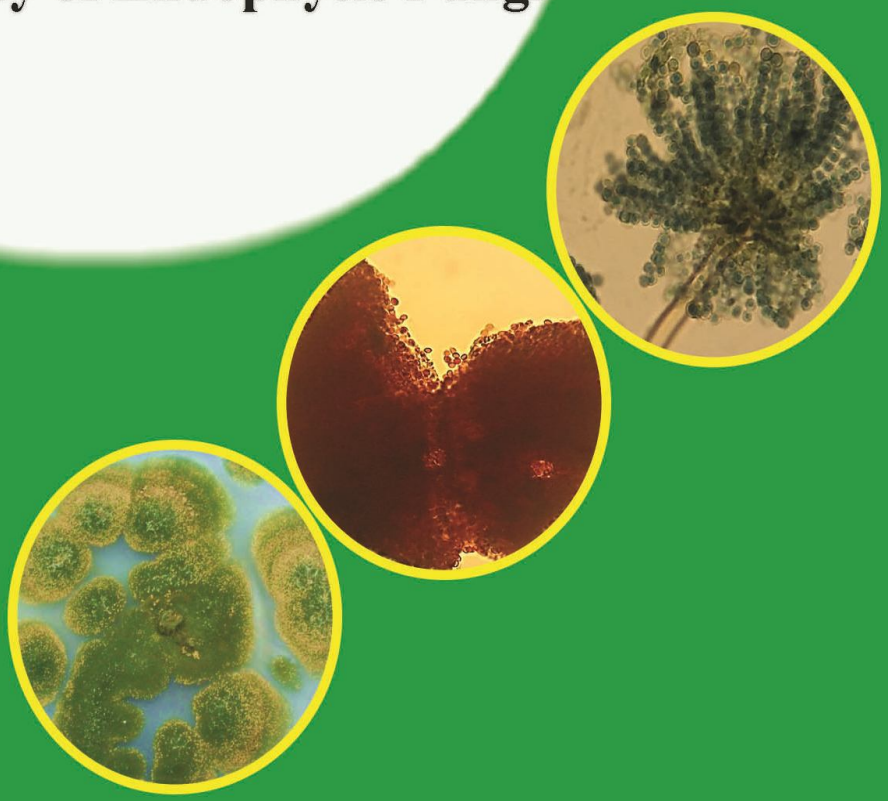
Vaz, A.B., Mota, R.C., Bomfim, M.R.Q., Vieira, M.L., Zani, C.L., Rosa, C.A. and Rosa, L.H. 2009. Antimicrobial activity of endophytic fungi

associated with Orchidaceae in Brazil. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(12), 1381-1391.

Woudenberg, J.H.C., Groenewald, J.Z., Binder, M. and Crous, P.W. 2013. *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171-212.

MINISTRY OF AGRICULTURE – JAHAD
Agricultural Research, Education and Extension Organization
Soil and Water Research Institute

Laboratory Methods for the Study of Endophytic Fungi



Hossein Kari Dolatabad

2023