DOI: 10.22092/irn.2023.363192.1540

نامه‌علمی

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۰۵/۲۱
تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۰۸/۰۷

شناسایی اولیه قارچ‌های اندوفیت گونه گیلاس وحشی (*Prunus avium* L.) ناحیه ارسباران

یوسف محمدی[۱*]

چکیده

قارچ‌های اندوفیت به میکروارگانیسم‌هایی اطلاق می‌شود که حداقل بخشی از چرخه زندگی خود را درون بافت‌های گیاهی سپری می‌کنند. این موجودات نقش بسیار مهمی در تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند و تحمل تنش‌های زیستی و غیرزیستی را در گیاه دارند، به همین خاطر مطالعات روی شناسایی قارچ‌های اندوفیت درختان جنگلی و جداسازی متابولیت‌های ثانویه به شدت افزایش یافته است. در همین رابطه شناسایی قارچ‌های اندوفیت در درختان جنگلی مثل گیلاس وحشی ضرورت و اهمیت دارد. به‌منظور انجام این پژوهش، ریزنمونه‌های برگ و ساقه از درخت گیلاس وحشی منطقه ارسباران جمع‌آوری و پس از ضدعفونی سطحی، روی محیط PDA کشت شدند. واکشت و خالص‌سازی قارچ‌های رشدیافته در محیط کشت PDA تکرار و درنهایت، در محیط PDB برای نگهداری و استخراج DNA کشت شدند. برای شناسایی مولکولی قارچ‌های اندوفیت رشدیافته، استخراج DNA انجام و با استفاده از واکنش PCR، قطعه ITS تکثیر شد. توالی‌یابی قطعه ITS گیلاس وحشی نشان داد، ۱۲ سویه قارچی جداشده متعلق به ۸ جنس متفاوت هستند. به‌طوری‌که ۳ سویه در جنس *Aspergillus* شامل گونه‌های *Aspergillus flavus*، *Aspergillus sydowii*، *Aspergillus niger*، دو گونه در جنس *Alternaria* شامل گونه‌های *Alternaria tenuissima* و *Alternaria* sp.، دو گونه در جنس *Penicillium* شامل گونه‌های *Penicillium sizovae* و *Penicillium oxalicum* و بقیه گونه‌ها در جنس‌های مختلف شامل *Xylaria corniformis*، *Ochrocladosporium elatum*، *Platychora ulmi*، *Aureobasidium pullulans* و *Sordariomycetes* sp. طبقه‌بندی شدند. خوشه‌بندی فیلوژنتیکی، ۱۲ گونه قارچی را در ۳ کلاد متمایز قرار داد.

واژه‌های کلیدی: ارسباران، رابطه همزیستی، متابولیت ثانویه، ITS.

Initial identification of endophytic fungi of Arasbaran *Prunus avium*

Y. Mohammadi[1*]

Abstract

An endophytic fungus is a microorganism that spends at least part of its life cycle inside plant tissues. These organisms play a pivotal role in producing valuable secondary metabolites and tolerance of biotic and abiotic stresses in the plant. For this reason, studies on the identification of endophytic fungi in forest trees and the isolation of secondary metabolites have significantly increased. This study aimed to identify Prunus avium endophytic fungi associated with Arasbaran. Leaf and stem explants were collected from 5 regions and, after surface disinfection, cultivated on PDA medium. Cultivation and purification of fungi grown in the PDA culture medium were repeated, and finally, they were cultured in the PDB culture medium for preservation and DNA extraction. Using PCR, DNA was extracted and the ITS fragment was amplified for molecular identification of grown endophytic fungi. Sequencing of ITS fragments showed that 12 isolated fungal strains belong to 8 different genera. Three strains in the *Aspergillus genus*, including *Aspergillus niger, Aspergillus sydowii*, and *Aspergillus flavus*, two species in the *Alternaria genus*, namely *Alternaria tenuissima* and *Alternaria* sp., two species in the *Penicillium* genus as *Penicillium sizovae* and *Penicillium oxalicum* and the rest species in different genera including *Aureobasidium pullulans, Platychora ulmi, Ochrocladosporium elatum, Xylaria corniformis*, and *Sordariomycetes* sp. were classified. Phylogenetic clustering placed 12 fungal species into three distinct clades.

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

۱*- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات زیست‌فناوری منابع طبیعی، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران،
پست الکترونیک: y.mohamadi@rifr-ac.ir

1*- Assistant Prof., Biotechnology Research Department, Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran, E-mail: y.mohamadi@rifr-ac.ir

مقدمه

گیاهان، به‌ویژه گیاهان چندساله، با انواع مختلفی از میکروارگانیسم‌های اندوفیت رابطه همزیستی دارند (Demain, 2014). این میکروارگانیسم‌ها شامل قارچ‌ها و باکتری‌ها هستند و براساس اثرات متقابل با گیاه، به دو دسته اختیاری و اجباری طبقه‌بندی می‌شوند. اندوفیت‌های اختیاری در مراحل خاصی از چرخه زندگی خود در گیاه مستقر می‌شوند و در مراحل دیگری، در خاک ریزوسفر گیاه نیز زندگی می‌کنند، در مقابل، اندوفیت‌های اجباری در تمام مراحل زیستی خود در گیاهان زندگی می‌کنند (Abreu-Tarazi *et al.*, 2010). قارچ‌های اندوفیت میکروارگانیسم‌هایی هستند که بدون داشتن علائم بیماری درون بافت‌های گیاهی حضور دارند (Nisa *et al.*, 2015). گاهی اوقات تشخیص ظاهری بین قارچ‌های پاتوژن و اندوفیت به سختی امکان‌پذیر است، زیرا بسیاری از گونه‌های قارچی هم سویه پاتوژن و هم اندوفیت دارند (Schouten, 2019).

در طول دهه گذشته تحقیقات روی قارچ‌های اندوفیت مرتبط با گیاهان رشد چشمگیری داشته است. به‌طوری‌که درک اکوسیستم‌های گیاهی– میکروبی، همچنین کاربردهای بالقوه قارچ‌های اندوفیت در صنایع داروسازی و سایر صنایع از اهم موضوعات پژوهشی بوده است. مطالعات شیمیایی منجر به درک بهتر فیتوشیمی، جداسازی و بیوسنتز ترکیبات زیست فعال قارچ‌های اندوفیت شده و مطالعات زیست‌شناسی قارچ‌های اندوفیت نیز منجر به بهبود روش‌های جداسازی سویه‌های قارچی، خصوصیات میکروبی و درک تنوع زیستی و روابط گیاه– قارچ شده است (Rustamova *et al.*, 2020). قارچ‌های اندوفیت به‌عنوان منابع جدیدی از ترکیبات سیتوتوکسیک مانند ترکیبات ضدسرطان، ضدباکتری، ضدقارچ، ضدویروس و آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند. همچنین، به‌عنوان

جدول ۱– مثال‌هایی از قارچ‌های اندوفیت جداشده به همراه ترکیبات مهم زیست فعال

فعالیت زیستی	ترکیب زیست فعال	گونه قارچی	گیاه میزبان
Antibacterial	Periconicin A	*Pericona sp.*	*Taxus cuspidata*
	Altersolanol A	*Ampelomyces*	*Urospermum picroides*
	Pestacin	*Penicillium microspore*	*Ephedra fasciculata*
	Phomol	*Phomopsis sp.*	*Erythrina crista-galli*
	Brefeldin A	*Aspergillus clavatus*	*Americana*
	Graphislactone A	*Microsphaeropsis olivacea*	*Taxus mairei*
	Botralin	*Microsphaeropsis olivacea*	*Trachelospermum Pilgerodendron*
Antifungal	Cryptocin	*Cryptosporiopsis quercina*	*Tvipterigeum wilfordii*
	Ambuic acid	*Pestalotiopsis microspore*	*Several rain forest plants*
	Pestaloside	*P. microspore*	*Torreya taxifolia*
	Jesterone	*P. jester*	*Fragraea bodenii*
	Periconicin A	*Pericona spp.*	*Taxus cuspidata*
	Oocyndin A	*Serratia marcescens*	*Rhyncholasis pedicillata*
	Ergosterol	*Hormonema spp.*	*Cynodon dactylon*
	Clavatol	*Aspergillus clavatonanicus*	*Taxus mairei*
Antiviral	Lactone S	*Microsphaeropsis sp.*	*Buxus sempervirens*
	sequoiatones C–F	*Aspergillus parasiticus*	*Sequoia sempervirens*
	Brefeldin A and B	*Aspergillus clavatus*	*Taxus mairei*
	Mullein	*Unidentified fungus*	*Prumnopitys andina*
Anticancer	Penicillenols	*Penicillium spp.*	*Aegiceras corniculatum*
	Vincristine	*Fusarium oxysporum*	*Catharanthus roseus*
	Vinblastine	*Fusarium oxysporum*	*Catharanthus roseus*
	Paclitaxel (Taxol)	*Taxomyces andreanae*	*Taxus brevifolia*
Antioxidants	Graphislactone A	*Cephalosporium sp.*	*Trachelospermum Jasminoides*
	Pestacin	*Pestalotiopsis microspore*	*Terminalia morobensis*

محرک‌های زیستی برای تولید متابولیت‌های ثانویه، افزایش حلالیت مواد مغذی داخل خاک، تحریک رشد گیاه، کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی، تحریک تحمل به تنش‌های غیرزیستی نیز مطرح هستند (Alam *et al.*, 2021) (جدول ۱).

با توجه به اهمیت شناسایی قارچ‌های اندوفیت گیاهان به‌ویژه درختان و درختچه‌های جنگلی در بحث تنوع زیستی و تولید متابولیت‌های ثانویه ارزشمند، بررسی تنوع قارچ‌های اندوفیت و آنالیز فیلوژنتیکی قارچ‌های شناسایی‌شده در درختان جنگلی مانند درخت گیلاس وحشی ارسباران اهمیت و ضرورت دارد.

● مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌های اندوفیت گیلاس وحشی

در این مطالعه نمونه‌های برگی و ساقه از گونه گیلاس وحشی (*Prunus avium* L.) در پنج منطقه از جنگل‌های ارسباران جمع‌آوری شد. برای جلوگیری از رشد قارچ‌های پاتوژن، نمونه‌های گیاهی فاقد هر گونه آلودگی ظاهری بودند. در مرحله بعد ریزنمونه‌های برگ و ساقه به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر برش و پس از ضدعفونی سطحی (هیپوکلریت سدیم ۱/۵درصد به مدت ۲ دقیقه) و شست‌وشو با آب مقطر استریل، در محیط Potato (Dextrose Agar) PDA کشت شدند. نمونه‌های کشت‌شده به مدت یک هفته در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه نگهداری شدند. برای اطمینان از ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌های برگی و ساقه، ۲ میلی‌لیتر از آبی که در آخرین مرحله برای شست‌وشوی ریزنمونه‌ها استفاده شد، نیز در محیط PDA کشت شد. عدم ظهور کلنی قارچ در این حالت، نشان‌دهنده صحت ضدعفونی سطحی ریزنمونه‌هاست. پس از ظهور کلنی‌های قارچی، واکشت دوباره قارچ‌ها در محیط کشت PDA انجام و در شرایط قبلی نگهداری شدند. درنهایت، قارچ‌های خالص برای نگهداری و ادامه کار در محیط PDB (Potato Dextrose Broth) کشت شدند.

● شناسایی مولکولی جدایه‌ها

برای استخراج DNA، از محیط کشت مایع قارچ‌ها استفاده شد. بدین صورت که محیط‌های کشت مایع قارچی در فالکون ۵ میلی‌لیتری به مدت ۵ دقیقه و ۱۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ و ۱–۰/۵ گرم از هیف‌ها با استفاده از ازت مایع کاملاً پودر شدند. استخراج DNA ژنومی به روش SDS-CTAB (Kim *et al.*, 1990) انجام شد. برای بررسی کمیت و کیفیت DNA استخراجی از ژل آگارز ۰/۸درصد و اسپکتروفتومتری با نانودراپ ۲۰۰۰ (Thermo Fisher Scientific, USA) استفاده شد.

● واکنش PCR

ابتدا توالی آغازگرهای قطعه ITS از منابع معتبر (Xiong *et al.*, 2013) استخراج و صحت آن با نرم‌افزار آنلاین پرایمر بلاست (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) تأیید شد. توالی آغازگرهای ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) برای سنتز به شرکت متابیون آلمان ارسال شد. واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شرایط حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و با شرایط ۵ دقیقه در ۹۴ درجه و سپس ۳۰ چرخه در ۹۴ درجه به مدت ۱ دقیقه، ۵۵ درجه به مدت ۴۵ ثانیه،۷۲ درجه به مدت ۱ دقیقه و درنهایت ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه در دستگاه ترموسایکلر اپندورف (Mastercycler gradient)(اپندورف، آلمان) انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR در ژل آگارز ۱/۵درصد انجام و عکسبرداری شد.

● شناسایی قارچ‌ها

پس ازانجام واکنش PCR و تکثیر قطعه ITS موردنظر، قطعات تکثیرشده توسط شرکت Macrogen (کره جنوبی) توالی‌یابی شد. برای شناسایی قارچ‌های اندوفیت، توالی قطعات ITS با برنامه Chromas خوانش و سپس با نرم‌افزار آنلاین BLASTN (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی ایالات متحده آمریکا (NCBI) آنالیز شد. در همه موارد، حد آستانه ۹۸درصد تشابه هم‌ردیفی بین سویه‌های جداشده با توالی هدف پایگاه داده، برای شناسایی و نامگذاری قارچ‌های اندوفیت استفاده شد.

● خوشه‌بندی فیلوژنتیکی قارچ‌های اندوفیت

پس از شناسایی مولکولی قارچ‌ها با استفاده از توالی قطعه ITS، هم‌ردیفی توالی‌ها با نرم‌افزار MEGA 7 انجام و سپس درخت فیلوژنتیکی با استفاده از الگوریتم UPGMA و با بوت استرپ ۱۰۰۰ ترسیم شد.

● نتایج و بحث

شناسایی سویه‌های قارچی

پس از کشت ریزنمونه‌های برگ و ساقه درخت گیلاس وحشی، سویه‌های اندوفیت قارچی با سرعت و صفات ظاهری متفاوت در محیط کشت PDA به‌خوبی رشد کردند (شکل ۱). داده‌های حاصل از نانودراپ و الکتروفورز ژل آگارز نشان داد، DNA استخراج‌شده از قارچ‌ها، کمیت و کیفیت بالایی دارد و برای توالی‌یابی مناسب است (شکل ۲). توالی‌یابی قطعه ITS، ۱۲ سویه قارچی جداشده از گیلاس وحشی نشان داد، این سویه‌ها در ۸ جنس متفاوت قرار دارند. به‌طوری‌که ۳ سویه در جنس *Aspergillus* شامل گونه‌های *Aspergillus*، *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus*، *sydowii*، دو گونه در جنس *Alternaria* شامل گونه‌های *Alternaria tenuissima* و *Alternaria* sp.، دو گونه در جنس *Penicillium* شامل گونه‌های *Penicillium sizovae* و *Penicillium oxalicum* و بقیه گونه‌ها در جنس‌های مختلف شامل *Aureobasidium pullulans*، *Platychora ulmi*، *Ochroclado-Sordariomycetes* و *Sporium elatum*، *Xylaria corniformis* sp. طبقه‌بندی شدند. با توجه به نتایج، به‌دلیل کثرت جنس‌های قارچی جداشده از گیلاس وحشی، به نظر می‌رسد، گونه موردنظر میزبان طیف و تعداد وسیعی از قارچ‌های اندوفیت است. نتایج این مطالعه

نشان می‌دهد، ۱۲ گونه قارچی توانایی ارتباط همزیستی را با گیلاس وحشی دارند که نشان از مناسب بودن گونه گیلاس وحشی برای ایجاد ارتباطات متقابل بین میزبان- قارچ در ارسباران است. مطالعات معدودی روی قارچ‌های اندوفیت درختان و درختچه‌های جنگلی ایران انجام شده است. قاسمی‌اسفهلان و همکاران (۱۳۹۸) با مطالعه روی بافت‌های پوست و شاخه بلوط ارسباران موفق به شناسایی ۲۵ گونه قارچی شدند، به‌طوری‌که *Aspergillus flavus*، گونه مشترک با پژوهش پیش‌رو است. حاجی‌زاده و همکاران (۱۳۹۴) در مطالعات خود روی درختان بلوط استان کردستان موفق به شناسایی ۵ گونه قارچ شدند که گونه مشترکی با این پژوهش نداشت.

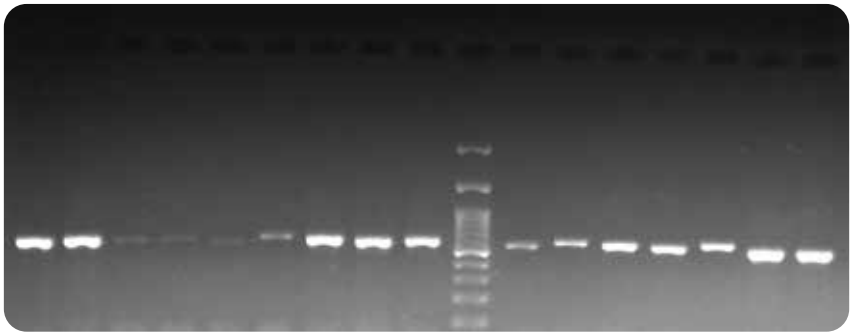
Roopa و همکاران (۲۰۱۵) با مطالعه روی گیاه *Salacia oblonga* موفق به شناسایی قارچ‌های مختلف شدند که تنها جنس Alternaria با پژوهش پیش‌رو مطابقت داشت. حضور گونه‌های مختلف جنس Alternaria به‌عنوان قارچ همزیست در گیاهان مختلف ازجمله خارشتر، جو، سالیکورنیا، چمن شور، آفتابگردان و انبه گزارش شده است (جان بزرگی و همکاران، ۱۳۹۸). طی تحقیقات Deng و همکاران (۲۰۰۹) از درخت سرخدار، قارچ *Fusarium solani* جداسازی شد که توانایی تولید تاکسول را دارد.

در این پژوهش، ۱۲ گونه قارچی از ۸ جنس برای اولین بار از گیلاس وحشی شناسایی شد که در شناسایی متابولیت‌های ثانویه ارزشمند و در تکمیل کلکسیون قارچ‌های اندوفیت مفید است. پیشنهاد می‌شود، در تحقیقات بعدی، غربال قارچ‌های اندوفیت برای شناسایی متابولیت‌های ثانویه ارزشمند همچون تاکسول، وین کریستین، وین بلاستین و کامپتوتسین انجام شود.

● خوشه‌بندی مولکولی سویه‌های قارچی جداشده

با استفاده از روش UPGMA، ۱۲ گونه قارچی به همراه گونه‌هایی که توالی مشابهی داشتند، همچنین ژن هیستون گونه *Alternaria tenuissima* به‌عنوان اوت گروپ

شکل ۱- نمونه‌ای از قارچ اندوفیت جداشده از گیلاس وحشی

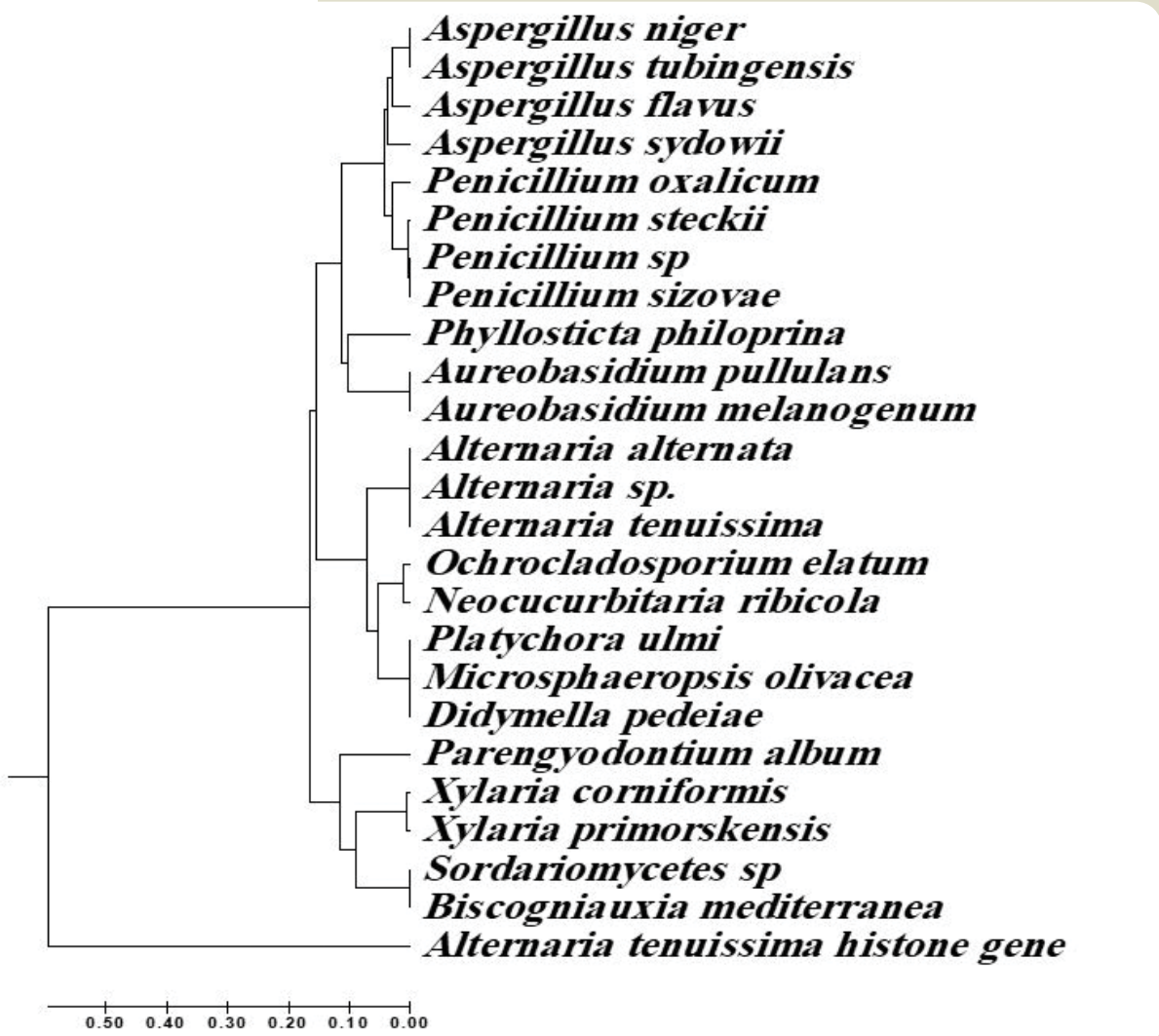


شکل ۲- وجود قطعه تکثیرشده برای ناحیه ITS در جدایه‌های قارچی

خوشه‌بندی شد (شکل ۳). به‌طوری‌که با ضریب فاصله ۰/۱۵ سه کلاد تشکیل شد. کلاد I از گونه‌های *Xylaria corniformis*، *Sordariomycetes* sp، *Xylaria primorskensis* و *Biscogniauxia mediterranea*، کلاد II از قارچ‌های *Alternaria tenuissima*، *Alternaria sp.*، *Alternaria alternata*، *Platychora ulmi*، *Neocucurbitaria ribicola*، *Ochrocladosporium elatum* و *Microsphaeropsis olivacea* و کلاد III از گونه‌های *Didymella pedeiae* و *Aureobasidium pullulans*، *Aureobasidium melanogenum*، *Phyllosticta philoprina*، *Penicillium sizovae*، *Penicillium* sp.، *Penicillium steckii*، *Penicillium oxalicum*، *Aspergillus niger*، *Aspergillus sydowii*، *Aspergillus flavus* و *Aspergillus tubingensis* تشکیل شده است.

● منابع

جان‌بزرگی، س.، مهرابی کوشکی، م. و فرخی‌نژاد، ر.، ۱۳۹۸. جداسازی و شناسایی اندوفیت‌های قارچی لوبیا چشم بلبلی در استان خوزستان، زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها، ۸ (۲۹): ۱۱۵-۹۷.



شکل ۳- درخت فیلوژنتیک سویه‌های جداشده از گیلاس وحشی

حاجی‌زاده، ا.، امینی، ج. و عبداله‌زاده، ج.، ۱۳۹۴. معرفی آرایه‌های جدید از قارچ‌های اندوفیت بلوط در استان کردستان، رستنیها، ۱۶ (۱): ۱۲۲-۱۰۹.

قاسمی‌اسفهلان، س.، ارزنلو، م.، بابای اهری، ا.، تربتی، م. و نرمانی، ا.، ۱۳۹۸. شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی قارچ‌های اندوفیت سرشاخه و شاخه درختان بلوط در جنگل‌های ارسباران. پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی، ۸ (۱): ۱۷-۱.

Abreu-Tarazi, M.F., Navarrete, A.A., Andreote, F.D., Almeida, C.V., Tsai, S.M., and Almeida, M., 2010. Endophytic bacteria in long-term in vitro cultivated “axenic” pineapple microplants revealed by PCR–DGGE. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 26: 555–560. doi: 10.1007/s11274-009-0191-3

Alam, B., Lǐ, J., Gě, Q., Khan, M.A., Gōng, J., Mehmood, S., Yuán, Y. and Gǒng, W., 2021. Endophytic fungi: From symbiosis to secondary metabolite communications or vice versa? Frontiers in Plant Science, 12: 3060.

Demain, A.L., 2014. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. Journal of industrial microbiology and biotechnology, 41(2): 185–201.

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

Nisa, H., Kamili, A.N., Nawchoo, I.A., Shafi. S., Shameem, N. and Bandh, S.A., 2015. Fungal endophytes as prolific source of phytochemicals and other bioactive natural products: a review. Microbial Pathogenesis, 82: 50–59.

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

Rustamova, N., Bozorov, K., Efferth, T. and Yili, A., 2020. Novel secondary metabolites from endophytic fungi: synthesis and biological properties. Phytochemistry reviews, 19:425–448.

Schouten, A., 2019. Endophytic fungi: definitions, diversity, distribution and their significance in plant life. In: Schouten, A. (ed.) Endophyte biotechnology: potential for agriculture and pharmacology. CABI biotechnology series. CABI, Wallingford, pp 6–31.