گونه‌های اندوفیت جنس *Neotyphodium* روی برخی از گندمیان مرتعی در ایران*

Endophytic species of *Neotyphodium* on some gramineous species in Iran

سعیده دهقانپور فراشاه، بهرام شریف نبی ** **و آقافخر میرلوحی**

دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

دریافت: ۱۳۸۴/۶/۷ پذیرش: ۱۳۸۴/۹/۱۶

چکیده

در این پژوهش، قارچ‌های اندوفیت از غلاف برگ و بذور میزبان‌های گیاهی *Festuca arundinacea*، *F. pratensis*، *F. ovina*، *Bromus tomentellus* *Melica persica* و *Lolium prenne* جداسازی گردید. خصوصیات مرفولوژیکی این قارچها روی محیط کشت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. اکثر جدایه‌های بررسی شده در این تحقیق از نظر مرفولوژیکی با توصیف عمومی جنس *Acremonium* در بخش *Albo-lanosa* و جنس *Neotyphodium* جدا شده از یک گونه جو وحشی شباهت داشتند. در آزمون حساسیت به قارچ‌کش بنومیل، محیط کشت‌های حاوی این قارچ‌کش برای هاگ‌دهی قارچ‌ها مناسب تشخیص داده شدند. در آزمون آنتی‌بیوز مشخص شد که اکثر جدایه‌های اندوفیت به کار رفته در این تحقیق از رشد قارچ بیماری‌زای *Bipolaris australiensis* جلوگیری کردند و فقط دو جدایه FoGn و MpFn روی قارچ بیماری‌زای *Pythium aphanidermatum* موثر بودند. بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی،

---

* بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول به راهنمایی دکتر بهرام شریف‌نبی و دکتر آقافخر میرلوحی ارایه شده به دانشگاه کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان

** مسئول مکاتبه

گونه *N. coenophialum* از *F. arundinacea*، گونـه *N. festucae* از *F. ovina*، گونـه *N. lolii* از *L. prenne* و گونه *N.* cf. *bromicola* از *B. tomentellus* برای نخستین بار از ایران گـزارش می‌شوند.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های اندوفیت، گندمیان مرتعی، *Neotyphodium*، *Acremonium*

مقدمه

مراتع ایران یکی از منابع طبیعی تجدید شونده با استفاده‌های متنوع هسـتند و قسـمت اعظم علوفه دامی از مراتع حاصل مـی‌شـود. ارزش مراتـع ایـران جهـت تعلیـف دام‌هـا و تولیـد فرآورده‌های دامی و همچنین به لحـاظ تـاثیر حفـاظتی بـرای آب و خـاک بسـیار زیـاد اسـت. مساحت تقریبی مراتع ایران معادل ۹۴ میلیون هکتار است (Moghaddam 2001).

گندمیان از مهمترین گونه‌هـای مرتعـی ایـران هسـتند، خصوصـاً گنـدمیانی از جـنس *Festuca, Bromus, Lolium* و *Melica* که از نظر تنوع گونه و دامنه گسترش از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. رابطه همزیستی بین چندین گونه از این گیاهان با قارچ‌های اندوفیت مشخص شده و بهره‌گیری از سودمندی‌های ایـن رابطـه همزیسـتی در جهـت تولیـد علوفـه مهـم مـی‌باشـد (Mohammadi 2001).

قـارچ‌هـای انـدوفیت گنـدمیان از شـاخه Ascomycota، رده Pyrenomycetes و تیـره Clavicipitaceae هستند (Alexopoulos *et al.* 1996). ویژگـی برجسـته قـارچ‌هـای انـدوفیت نوعی بازدارندگی برای برخی از آفات، بیماری‌ها و علفخواران می‌باشد و اغلب تحمل به خشـکی، سرما و دیگر تنش‌های محیطی نظیر آمونیوم و pH بالای خـاک را افـزایش مـی‌دهنـد و باعـث افزایش عملکرد گندمیان می‌شوند (Khayyam Nekouei *et al.* 2001, Zaurove *et al.* 2001).

وگل در سال ۱۸۹۸ یک نمونه قارچ اندوفیت را از گونه *Lolium temulentum* L. گـزارش کرد که هویت این قارچ به صورت یک راز باقی ماند (Bacon *et al.* 1997, Latch *et al.* 1984). *نیل* (Neil 1940) یک قارچ اندوفیت را از رای‌گراس (*Lolium prenne* L.) جدا کرد و عکسی از رشد پرگنه سترون آن روی آگار منتشر نمود. یک سال بعد، میکروکنیـدیوم و ماکروکنیـدیوم را در محیط کشت این اندوفیت یافـت و تشـریح کـرد. وی در همـان سـال انـدوفیت دومـی را از فسکیوی بلند *Festuca arundinacea* Schreb. جدا کـرد کـه آن را جـنس *Epichloë* از تیـره Clavicipitaceae (آسکومیسـت) معرفـی و *E. typhina* (Pers.: Fr.) Tul. نامگـذاری نمـود (Latch *et al.* 1984). *ساکاردو* در سال ۱۸۸۱، آنامورف *E. typhina* (Pers.) Tul. & C. Tul. را *Sphacelia typhina* (Fr.: Fr.) Tul. معرفـی کـرد. آنـامورف‌هـای *E. typhina* و *Claviceps purpurea* خصوصیات مرفولوژیکی پایه‌ای یکسانی داشتند و بنابراین، *ساکاردو* آن‌ها

را متعلق به یک جنس دانست (Bacon *et al.* 1997, Glenn *et al.* 1996, Latch *et al.* 1984). *دیل* (Diehl 1950) مشخص نمود که کنیدیومزایی در جنس *Epichloë* به طور مشخص از جنس *Claviceps* متمایز است و تشخیص داد که نباید شبه‌جنس *Sphacelia* را برای فرم غیرجنسی *Epichloë* به کار برد. وی *Typhodium* را به عنوان شبه‌جنس برای مرحله کنیدیومی *Epichloë* در نظر گرفت. براساس شباهت‌های آزمایشگاهی *مورگان- جونز* و *گمس* (Morgan-Jones & Gams 1982) آنامورف *E. typhina* را در شبه‌جنس *Acremonium* قرار داده و آن را *A. coenophialum* Morgan-Jones & W. Gams نامگذاری نمودند.

جنس *Acremonium* که از نظر صفات مورفولوژیکی بسیار ساده است، گونه *A. alternatum* Link *ex* S.F. Gray به عنوان lectotype آن جنس معرفی شده است. این گونه، کنیدیوم‌های خود را در سرهای کنیدیومی یا به صورت زنجیری تولید می‌کند. قارچ‌های اندوفیت که سابقاً در جنس *Acremonium* طبقه‌بندی می‌شدند، بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی و آنالیز توالی DNA ریبوزومی به جنس جدید *Neotyphodium* منتقل شده‌اند و آنامورف گونه‌های *Epichloë* spp. به حساب می‌آیند. در نتیجه، با این طبقه‌بندی همه تاکسون‌های قدیمی اندوفیت جنس *Acremonium* به جنس *Neotyphodium* منتقل شده‌اند (Bacon *et al.* 1997, Doss *et al.* 1998, Marshall *et al.* 1999).

تحقیقات نشان داده است که قارچ‌های اندوفیت در شرایط آزمایشگاه دارای اثر آنتاگونیستی روی عوامل بیماریزای قارچی هستند (Clay 1989). در یک پژوهش دیگر در آزمایشگاه، رشد قارچ *Drechslera sorokiniana* (Sacc.) Subram. & Jain توسط اندوفیت‌های فسکیوی مرتعی (*Festuca pratensis* Hudson) متوقف شده است (Christensen *et al.* 1991). بعضی از جدایه‌های اندوفیت به دست آمده از رای‌گراس روی *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson و *Drechslera erytroshila* (Drechsler) Shoemake اثر آنتاگونیستی داشتند (Bacon *et al.* 1997, Christensen *et al.* 1991).

کریستنسن و همکاران (۱۹۹۱)، اثر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش بنومیل را روی جدایه‌هایی از *Acremonium* از رای‌گراس مورد آزمایش قرار دادند و دریافتند که بعضی از این جدایه‌ها به غلظت‌های بالای بنومیل (۱۰۰µg/ml) مقاوم‌اند و جدایه‌هایی با مقاومت کم و متوسط نیز در میان جدایه‌ها وجود داشته است.

با توجه به اهمیت مراتع در ایران و نقش اندوفیت‌ها در بهبود کیفیت این منابع تجدید شونده و این‌که تا کنون در زمینه شناسایی قارچ‌های اندوفیت ایران با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی اقدامی صورت نگرفته است، در این پژوهش سعی شد تا با استفاده از خصوصیات مورفولوژیکی، گونه‌های اندوفیت چندین میزبان گرامینه نظیر *Festuca*، *Lolium*، *Bromus* و

Melica شناسایی گردد. علاوه بر این، حساسیت قارچ‌های اندوفیت نسبت به غلظت‌های مختلف قارچ‌کش بنومیل و اثر این قارچ‌ها روی دو گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی مانند *Pythium aphanidermatum* (Edson) Fitzpatrick و *Bipolaris australiensis* (Bugnicourt *ex* M.B. Ellis) Tsuda & Ueyama مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

۱- مواد گیاهی مورد استفاده

در این پژوهش، برای جداسازی قارچ‌های اندوفیت از بذور و غلاف برگ آلوده گونه‌های مختلف *Festuca*، *Bromus*، *Lolium* و *Melica* استفاده شد. بخشی از این نمونه‌ها از بانک بذر پژوهشکده بیوتکنولوژی کشاورزی منطقه مرکزی کشور و بقیه از سایر مناطق کشور جمع‌آوری شد که مشخصات آن‌ها در جدول ۱ آمده است. برای تشخیص حضور قارچ‌های اندوفیت در قسمت‌های مختلف گیاهی از روش رنگ‌آمیزی با رز بنگال استفاده شد (Rice *et al.* 1990).

جدول ۱- فهرست جدایه‌های مورد استفاده در این مطالعه

Table 1. List of isolates used in this study

ردیف No.	کد جدایه Isolate Code	نام میزبان Host	محل جمع‌آوری Location
۱	FaAh	*Festuca arundinacea*	اصفهان- ابیانه
۲	FaEn	*F. arundinacea*	اصفهان- اسفرجان
۳	FaHn	*F. arundinacea*	اصفهان- هونجان
۴	FaKh	*F. arundinacea*	اصفهان- روستای کشه
۵	$FaKn_1$	*F. arundinacea*	کردستان کامیاران- ۱
۶	$FaKn_2$	*F. arundinacea*	کردستان کامیاران- ۲
۷	$FaFn_1$	*F. arundinacea*	خراسان- فریمان- ۱
۸	$FaFn_2$	*F. arundinacea*	خراسان- فریمان- ۲
۹	$FaFn_3$	*F. arundinacea*	خراسان- فریمان- ۳
۱۰	FaYj	*F. arundinacea*	کهگیلویه و بویراحمد- یاسوج
۱۱	FoGn	*F. ovina*	گلستان- گرگان
۱۲	FoFn	*F. ovina*	خراسان- فریمان

ادامه جدول ۱

۱۳	FoTn	*F. ovina*	تهران- نیاوران
۱۴	FpBn	*F. pratensis*	چهار محال و بختیاری- بروجن
۱۵	FpEn	*F. pratensis*	اصفهان- ایستگاه تحقیقاتی شهید فزوه
۱۶	FpKn	*F. pratensis*	کردستان کامیاران
۱۷	BtBi	*Bromus tomentellus*	اصفهان- بانه غربی
۱۸	BtBn	*B. tomentellus*	چهارمحال و بختیاری- بروجن
۱۹	BtChn	*B. tomentellus*	اصفهان- چادگان
۲۰	BtFd	*B. tomentellus*	اصفهان- فخرآباد
۲۱	BtFn	*B. tomentellus*	اصفهان- فریدن
۲۲	BtGh	*B. tomentellus*	اصفهان- قرق موته
۲۳	BtHi	*B. tomentellus*	چهارمحال و بختیاری- حمزعلی
۲۴	BtKn	*B. tomentellus*	اصفهان- کنده قبرستان
۲۵	BtSm	*B. tomentellus*	اصفهان- سمیرم
۲۶	BtShd	*B. tomentellus*	چهارمحال و بختیاری- شهرکرد
۲۷	MpEn	*Melica persica*	اصفهان- اسفرجان
۲۸	MpFn	*M. persica*	چهارمحال و بختیاری- فارسان
۲۹	MpHi	*M. persica*	چهارمحال و بختیاری- حمزعلی
۳۰	$MpKhr_1$	*M. persica*	اصفهان- خمینی‌شهر
۳۱	$MpKhr_2$	*M. persica*	اصفهان- خمینی‌شهر
۳۲	LpNh	*Lolium prenne*	آذربایجان غربی- نقده
۳۳	LpYd	*L. prenne*	اصفهان- یحیی‌آباد

۲- جداسازی قارچ‌های اندوفیت از بذور و غلاف گیاهان آلوده

برای جداسازی قارچ‌های اندوفیت از بذور، ابتدا گلوم‌های بذر طبق روش به کار گرفته شده توسط *گنجعلی* و همکاران (Ganjali *et al.* 2004) جداسازی گردید و سپس با اسکالپل سترون بذور نصف شده و داخل محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) حاوی ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر آنتی‌بیوتیک استروپتومایسین به طوری‌که نیمی از بذر خارج از محیط کشت باشد، کشت داده شدند. تشتک‌های پتری حاوی بذور کشت داده شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. برای جداسازی قارچ‌های اندوفیت از غلاف برگ‌های آلوده ابتدا غلاف‌ها به قطعات حدود نیم سانتی‌متر تقسیم شدند و پس از شستشو با مقداری آب و

مایع ظرفشویی بقیه مراحل مانند روش جداسازی قارچ‌های اندوفایت از بذور انجام شد. پس از رشد قارچ‌های اندوفیت، خالص‌سازی آن‌ها با دو روش تک‌اسپور و نوک ریسه انجام شد. از محیط‌های کشت Potato Carrot Agar (PCA)، Malt Agar (MA) دو درصد، Corn-meal Dextrose Agar (CMD) و Oat-meal Agar (OA) برای هاگ‌دهی بعضی از جدایه‌ها استفاده گردید.

۳- بررسی خصوصیات مورفولوژیکی قارچ‌های اندوفیت

پس از جداسازی و خالص نمودن قارچ‌های اندوفیت، خصوصیات مورفولوژیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. صفات مرفولوژیکی نظیر خصوصیات پرگنه، شکل و رنگ آن از رو و پشت تشتک پتری، شکل حاشیه پرگنه نحوه قرار گرفتن حاشیه در محیط آگار، مسطح یا برآمده بودن پرگنه، هاله‌دار یا بدون هاله بودن آن، وضعیت ریسه‌های هوایی، وضعیت چین‌خوردگی پرگنه، قطر پرگنه و میزان رشد روزانه قارچ روی محیط‌های کشت مختلف بررسی شد. زیر میکروسکوپ نوری، صفاتی نظیر شکل، طول و عرض کنیدیوم، قطر ریسه، طول کنیدیوفور، قطر کنیدیوفور در قاعده و راس، وجود یا عدم وجود دیواره در قاعده کنیدیوفور، وضعیت رنگ‌پذیری پایه کنیدیوفور، نحوه هاگ‌دهی قارچ مشاهده و بررسی شد.

۴- آزمون حساسیت به قارچ‌کش بنومیل

غلظت‌های ۱، ۲/۵، ۷/۵ و ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر از قارچ‌کش بنومیل ۵۰٪ در محیط PDA تهیه شد. جدایه‌های قارچی به طور جداگانه روی هر کدام از این غلظت‌ها کشت داده شدند و در طول مدت یک ماه میزان رشد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. جدایه‌هایی که دارای مقاومت به غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بنومیل بودند نسبت به غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر این قارچ‌کش نیز مورد آزمایش قرار گرفتند.

۵- آزمون آنتی‌بیوز

ابتدا قارچ‌های اندوفیت به مدت سه هفته روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. سپس قارچ‌های *Pythium aphanidermatum* و *Bipolaris australiensis* در چهار گوشه تشتک پتری و در اطراف قارچ اندوفیت بازکشت شدند. بعد از یک هفته اثر بازدارندگی قارچ‌های اندوفیت روی قارچ‌های بیماریزا مورد بررسی قرار گرفت.

۶- تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیکی

در این پژوهش صفات مورفولوژیکی نظیر طول و عرض کنیدیوم، طول کنیدیوفور، قطر کنیدیوفور در قاعده و انتها، قطر ریسه و میزان رشد روزانه روی PDA اندازه‌گیری شد. به صفاتی نظیر رنگ پرگنه، هاله‌دار بودن یا عدم وجود هاله در اطراف پرگنه، برآمدگی یا فرورفتگی حاشیه پرگنه در محیط کشت، منظم یا نا منظم بودن حاشیه، میزان چین‌خوردگی پرگنه، مسطح یا برآمده بودن پرگنه، بافت پرگنه، آنتی بیوز نسبت به دو قارچ *P. aphanidermatum* و *B. australiensis* و حساسیت نسبت به غلظت‌های مختلف قارچ‌کش بنومیل، به ترتیب با اعداد یک و صفر کد داده شد. داده‌های مورفولوژیکی با استفاده از نرم‌افزار SPSS V. 11 استاندارد مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. پس از وارد کردن داده‌ها و تشکیل ماتریس تشابه (ستون برای جدایه‌ها و سطرها برای صفات)، با استفاده از روش Ward و ضریب تشابه مربع فاصله اقلیدسی دندروگرام مربوط رسم شد.

نتیجه و بحث

پس از رنگ‌آمیزی بذور و غلاف گیاهان جمع‌آوری شده با محلول رنگی رز بنگال و مشاهده میکروسکوپی، هیف‌های قارچی به صورت مارپیچ و به رنگ صورتی تا قرمز رویت شدند. این ریسه‌ها دارای دیواره عرضی بوده و به صورت متمایز از یاخته‌های گیاهی قابل مشاهده بودند.

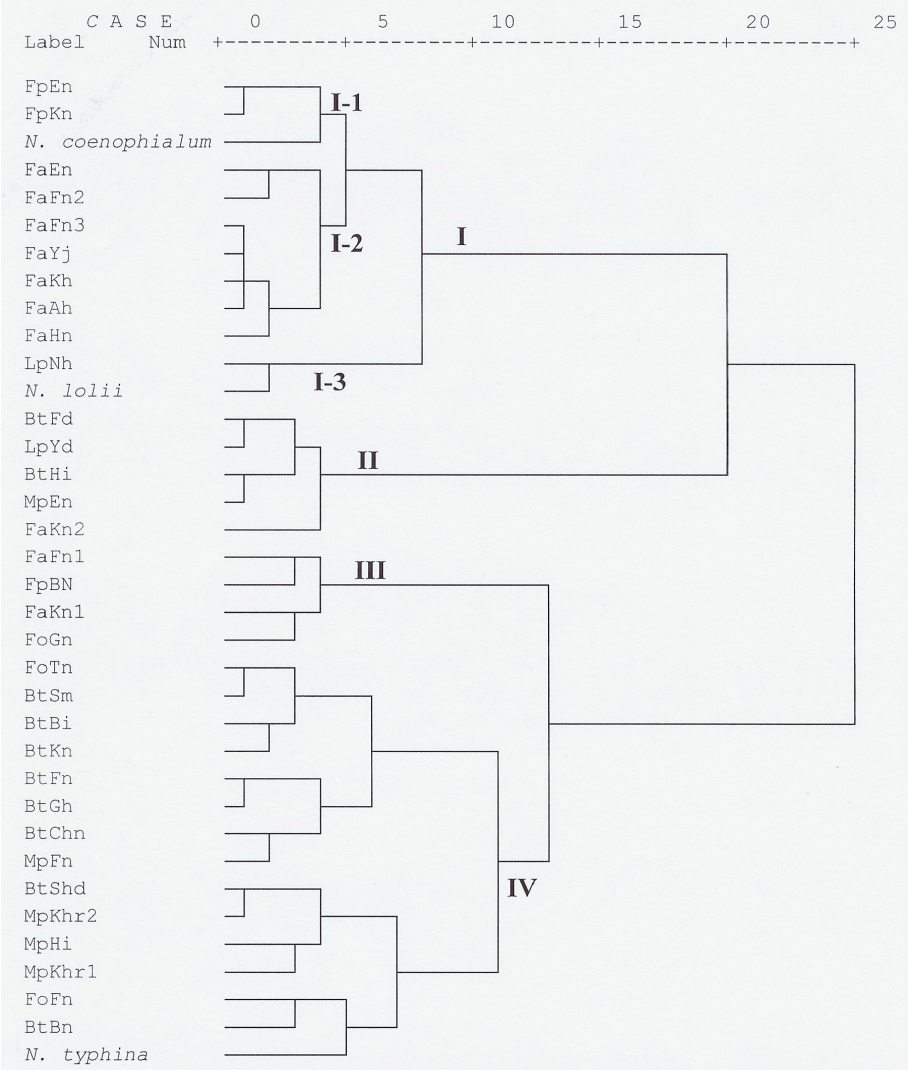
تعدادی از جدایه‌ها قادر به تولیدکنیدیوم روی محیط کشت PDA نبودند، بنابراین از محیط‌های کشت CMD، PCA، OA و MA برای هاگ‌دهی بعضی از جدایه‌ها استفاده شد و مشخص شد که بعضی از جدایه‌ها روی هیچ‌کدام از محیط‌های کشت ذکر شده قادر به تولید کنیدیوم نیستند و تنها روی محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف قارچ‌کش بنومیل هاگ تولید کردند.

خصوصیات مورفولوژیکی قارچ‌های اندوفیت

اکثر قارچ‌های جدا شده از *B. tomentellus* Boiss. روی محیط کشت PDA به خوبی قادر به تولید کنیدیوم بودند ولی قارچ‌های جدا شده از سایر میزبان‌ها برای کنیدیوم‌زایی نیاز به شرایط و محیط کشت خاصی داشتند. برای بررسی خصوصیات مرفولوژیکی قارچ‌های اندوفیت، گونه‌های تیپ *N. lolii* (Latch, M.J. Chr. & Samuels) Glenn, C.W. Bacon & Hanlin، *N. coenophialum* و *N. typhina* از مرکز CBS (Centraal bureau voor Schimmelcultures) هلند دریافت شد و تمام جدایه‌ها با این نمونه‌ها مقایسه شدند.

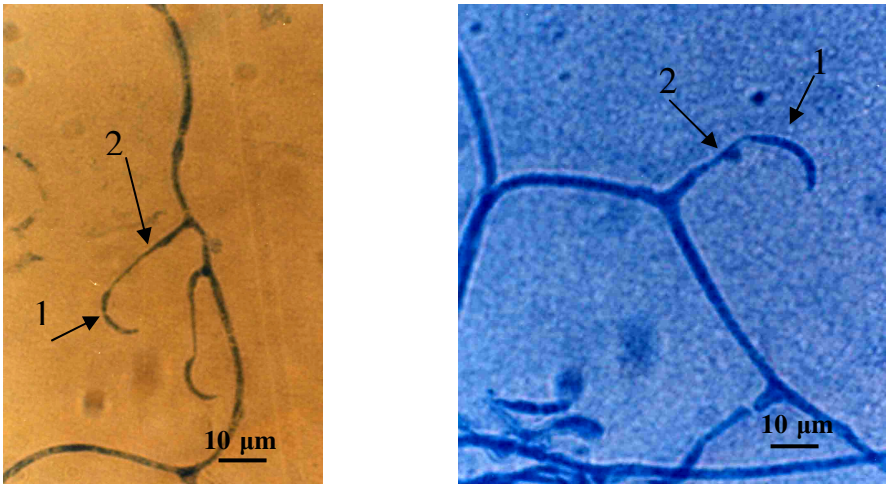
اکثر جدایه‌های به کار رفته در این پژوهش از نظر صفات مرفولوژیکی با توصیف عمومی از بخش *Albo-lanosa* از جنس *Acremonium* شباهت داشتند. پرگنه‌های این جنس، سفید تا زرد رنگ، کند رشد، پنبه‌ای و شامل تعداد زیادی ریسه‌های هوایی هستند. فیالیدها به صورت منفرد و از ریسه‌های هوایی منشا می‌گیرند و در قاعده معمولا باریکتر از هیف‌های مجاور هستند. کنیدیوم‌ها بیضوی، استوانه‌ای یا به صورت قایقی شکل، خمیده یا بدون خمیدگی، روشن با دیواره نرم هستند (Koga *et al.* 1994). این خصوصیات با توصیف *Neotyphodium* sp. جدا شده از یک گونه جو وحشی توسط *دوگان* و همکاران (Dugan *et al.* 2002) نیز شباهت داشت. دندروگرام حاصل از داده‌های مورفولوژیکی در شکل ۱ آورده شده است.

اگر دندروگرام حاصل از تجزیه و تحلیل داده‌های مورفولوژیکی در مقیاس تغییر یافته ۱۱ قطع شود چهار دسته به دست می‌آید که در دسته اول، دو زیر گروه وجود دارد. در زیر گروه اول، جدایه‌های مربوط به *F. pratensis* Hudson، *F. arundinacea* Schreb. و گونه تیپ *N. coenophialum* (Morgan-Jones & W. Gams) Glenn, C.W. Bacon & Hanlin قرار گرفتند. دو جدایه FpEn و FpKn نیز در زیر گروه اول در کنار گونه تیپ *N. coenophialum* قرار گرفتند که خصوصیات این دو جدایه بسیار شبیه به هم بود و اندکی با جدایه‌های مربوط به *F. arundinacea* از نظر شکل کنیدیوم و وضعیت دیواره در قاعده کنیدیوفور متفاوت بودند. پرگنه جدایه‌های FpEn و FpKn روی PDA به رنگ کرم و از پشت تشتک پتری قهوه‌ای، برآمده و گنبدی شکل، نمدی، چین‌خورده و مغزی شکل، با حاشیه نامنظم بودند. حاشیه پرگنه به صورت سطحی روی محیط آگاردار قرار گرفته بود و در اطراف پرگنه هاله وجود نداشت. پرگنه‌ها در مدت ۱۰ روز به میزان چهار میلی‌متر روی PDA و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد کردند. روی MA دو درصد، ریسه‌های رویشی ۲-۱ میکرومتر قطر داشتند. طول کنیدیوفور (۲۴-)۲۰-۱۱/۷(-۹/۵) میکرومتر اندازه‌گیری شد. این اندام بدون انشعاب، کشیده و در قاعد بدون دیواره یا با دیواره بودند. قطر کنیدیوفور در قاعده دو میکرومتر بود که به طرف انتها باریک می‌شد و اندازه آن به یک میکرومتر می‌رسید، قاعده کنیدیوفور رنگ‌پذیر بود. کنیدیوم‌ها به صورت منفرد و مورب در انتهای فیالیدها قرار داشتند. کنیدیوم‌ها بیضوی تا خمیده بودند و در انتها گرد تا نوک‌تیز و در قاعده گرد یا دارای برجستگی‌هایی بودند. کنیدیوم‌ها، تک‌یاخته‌ای، روشن و رنگ‌پذیر بودند و اندازه آن‌ها ۱/۶-۱(-۰/۸) × (۲۰-)۱۷-۱۲ میکرومتر بود. در شکل ۲ وضعیت هاگ و فیالید این دو جدایه نشان داده شده است.



شکل ۱- دندروگرام حاصل از داده‌های مرفولوژیکی مربوط به گونه‌های اندوفیت.

Fig. 1. Dendrogram based on morphological characters belonging to endophytic fungi.



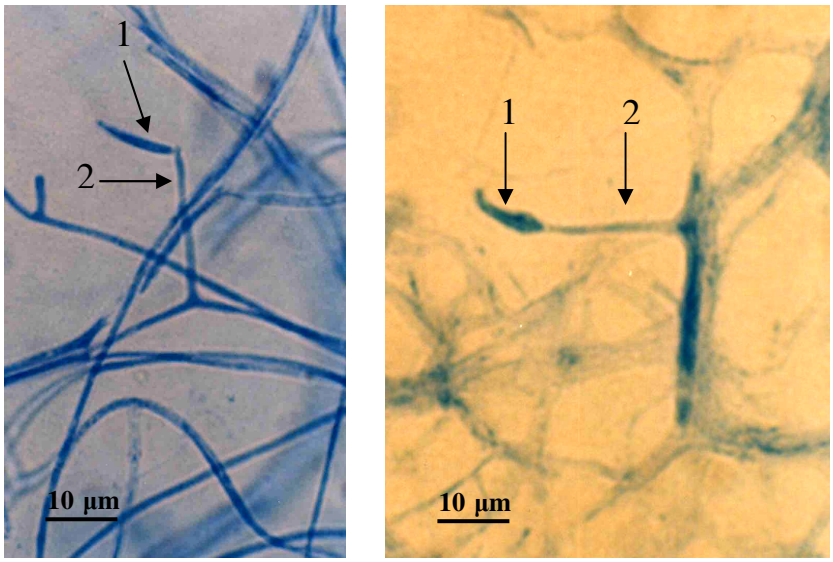
شکل ۲- نحوه قرار گرفتن کنیدیوم (۱) روی فیالید (۲) در جدایه‌های FpEn (سمت راست) و FpKn (سمت چپ).

Fig. 2. Spore (1) and phialide (2) in FpEn (right) and FpKn (left) isolates.

قرار گرفتن نمونه تیپ *N. coenophialum* در کنار این دو جدایه ولی در یک شاخه جداگانه نشان‌دهنده شباهت این دو جدایه به نمونه تیپ بود. با بررسی‌های مرفولوژیکی مشخص شد که این دو جدایه از نظر شکل و اندازه هاگ بسیار شبیه به نمونه تیپ بودند ولی از نظر طول کنیدیوفور و وضعیت دیواره در قاعده کنیدیوفور با آن تفاوت داشتند. بنابر نظر *مورگان جونز گمس* (۱۹۸۲)، *لچ* و همکاران (۱۹۸۴) و همچنین با مشاهدات نمونه تیپ در آزمایشگاه، نمونه تیپ *N. coenophialum* در قاعده فاقد دیواره کنیدیوفور بود ولی در دو جدایه FpKn و FpEn در قاعده بعضی از کنیدیوفورها دیواره وجود داشت و بعضی از کنیدیوفورها فاقد دیواره در قاعده بودند، به علاوه در نمونه تیپ *N. coenophialum* کنیدیوفورها از نظر اندازه طویل‌تر از کنیدیوفورهای دو جدایه FpKn و FpEn بودند. از نظر رنگ پرگنه نیز نمونه تیپ مورد بحث، کاملا سفید رنگ و دو جدایه FpKn و FpEn کرم رنگ بودند. البته رنگ پرگنه صفت دقیقی برای طبقه‌بندی نیست ولی به دلیل این‌که تمام صفات مرفولوژیکی اعم از میکروسکوپی و ماکروسکوپی در نرم افزار SPSS وارد شده‌اند بنابراین، احتمالا علت قرارگرفتن گونه تیپ *N. coenophialum* در یک شاخه جداگانه در کنار جدایه‌های FpKn و FpEn دلایل ذکر شده در بالا باشد. مقایسه این دو جدایه با گونه *N. uncinatum* (W. Gams, Petrini & D. Schmidt) Glenn, C.W. Bacon & Hanlin گزارش شده از *F. pratensis* در ژاپن، اروپا و نیوزیلند (Latch *et al.* 1984) شباهت این دو جدایه را از نظر شکل پرگنه، میزان رشد روزانه، شکل و اندازه کنیدیوم و کنیدیوفور به این گونه نشان داد،

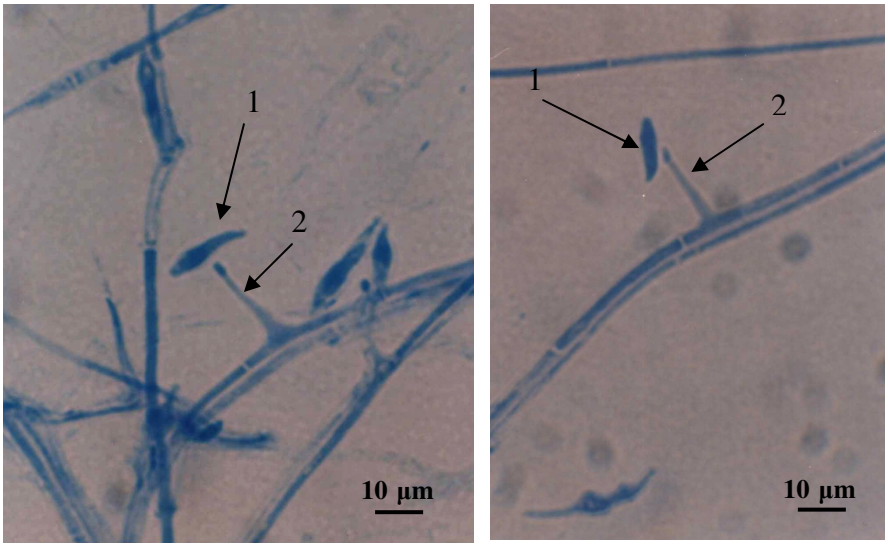
ولی در این پژوهش نمونه تیپ *N. uncinatum* در دسترس نبود تا در بررسی‌های مورفولوژیکی مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین، برای تعیین دقیق گونه این دو جدایه نیاز به بررسی‌های بیشتر و استفاده از توالی یابی نوکلئوتیدی دارد.

جدایه‌های مربوط به *F. arundinacea* شامل $FaFn_3$، $FaFn_2$، FaYj، FaKh، FaEn، FaHn و FaAh همگی از نظر صفات مورفولوژیکی شبیه به هم و شبیه به نمونه تیپ *N. coenophialum* بودند. این جدایه‌ها روی PDA، بعد از شش هفته رشد دارای پرگنه‌های کرم رنگ از روی تشتک پتری و دارای رنگ قهوه‌ای از پشت تشتک پتری بودند. پرگنه، برآمده و گنبدی شکل، نمدی، چین خورده، دارای حاشیه نامنظم که حاشیه به صورت فرورفته در محیط آگاردار قرار گرفته بود و در اطراف پرگنه در بعضی از جدایه‌ها دارای هاله و بعضی بدون هاله بود. در مدت ۱۰ روز به میزان چهار میلی‌متر روی PDA و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد کرد. ریسه‌های رویشی ۲-۱ میکرومتر قطر داشتند. طول کنیدیوفور (۷۲ -)۳۳-۵/۶ میکرومتر اندازه‌گیری شد که کنیدیوفورها بدون انشعاب و بدون دیواره بودند. قطر کنیدیوفور در قاعده دو میکرومتر بود که به طرف انتها باریک می‌شد و اندازه آن به یک میکرومتر می‌رسید. قاعده کنیدیوفور رنگ‌پذیر بود. کنیدیوم‌ها به صورت منفرد و مورب در انتهای



شکل ۳- کنیدیوم (۱) و کنیدیوفور (۲) در نمونه تیپ *Neotyphodium coenophialum* (سمت چپ) و جدایه FaKh (سمت راست).

Fig 3. Conidium (1) and conidiophore (2) in the type isolate of *Neotyphodium coenophialum* (left) and the FaKh isolate (right).



شکل ۴- کنیدیوم (۱) و کنیدیوفور (۲) در جدایه FaEn.

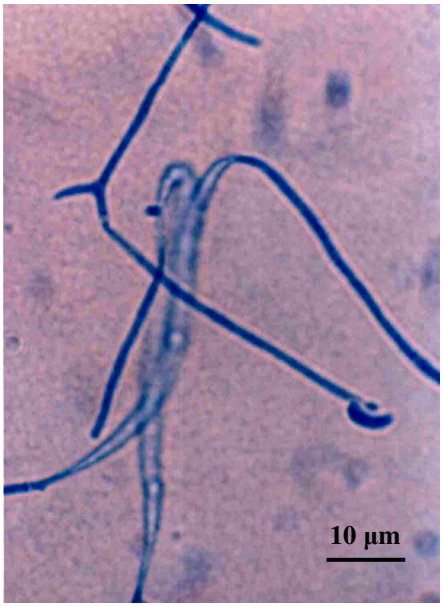
Fig. 4. Spore (1) and conidiophore (2) in FaEn isolates.

فیالیدها قرار داشتند. کنیدیوم‌ها بیشتر اشکی شکل بودند ولی اشکال خمیده و بیضوی نیز در میان آن‌ها مشاهده شد. کنیدیوم‌ها تک‌یاخته‌ای، روشن و رنگ‌پذیر بودند و اندازه آن‌ها ۳-۱/۵(-۱/۲)×(۱۷/۷-)۱۲-۶/۵ میکرومتر بود. در شکل‌های ۳ و ۴ وضعیت میکروسکوپی هاگ و فیالیدها قابل مشاهده است.

به دلیل شباهت خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌های مربوط به *F. arundinacea* با نمونه تیپ *N. coenophialum* به نظر می‌رسد که جدایه‌های $FaFn_3$، $FaFn_2$، FaYj، FaKh، FaEn، FaHn و FaAh، متعلق به گونه *N. coenophialum* باشند. *لچ* و همکاران (۱۹۸۴) و *مورگان- جونز* و *گمس* (۱۹۸۲) نیز جدایه‌های مربوط به *F. arundinacea* را که از نظر خصوصیات مورفولوژیکی بسیار شبیه به این جدایه‌ها بودند را تحت گونه *N. coenophialum* معرفی کردند.

جدایه LpNh و نمونه تیپ *N. lolii* در یک گروه مشترک قرار گرفتند جدایه LpNh که از نظرخصوصیات مورفولوژیکی بسیار شبیه به گونه تیپ *N. lolii* بود. پرگنه این جدایه روی PDA به رنگ کرم و از پشت پتری قهوه‌ای، برآمده و گنبدی شکل، نمدی، چین‌خورده و مغزی شکل، دارای حاشیه نامنظم بود. حاشیه به صورت فرو رفته در محیط آگار دار قرار گرفته بود و در اطراف پرگنه هاله وجود نداشت. پرگنه در مدت ۱۰ روز به میزان چهار میلی‌متر روی PDA و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد کرد. روی PCA ریسه‌های رویشی این جدایه ۲-۱ میکرومتر

قطر داشتند. طول کنیدیوفور (۱۶۸-) ۸۴/۵-۱۰/۴ میکرومتر اندازه‌گیری شد. کنیدیوفورها بدون انشعاب، کشیده و بدون دیواره بودند. قطر کنیدیوفور در قاعده دو میکرومتر بود که به طرف انتها باریک می‌شد و اندازه آن به یک میکرومتر می‌رسید. قاعده کنیدیوفور رنگ‌پذیر بود. کنیدیوم‌ها به صورت منفرد و به ندرت دوتایی و مورب در انتهای فیالیدها قرار داشتند. کنیدیوم‌ها بیشتر خمیده، بیضوی، تک‌یاخته‌ای، روشن و رنگ‌پذیر بودند. اندازه آن‌ها ۱/۷-۱(-۰/۸) × (۶/۴-)۶-۳/۲ میکرومتر بود. با توجه به شباهت جدایه LpNh و نمونه تیپ *N. lolii* و قرار گرفتن آن‌ها در یک گروه بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، به نظر می‌رسد که این جدایه متعلق به گونه *N. lolii* باشد. *کریستنسن* (Christensen 1993) و *لچ* (۱۹۸۴) نیز گونه *N. lolii* را از *L. prenne* جداسازی نمودند که خصوصیات مورفولوژیکی شرح داده شده توسط آنان برای *N. lolii* با خصوصیات مرفولوژیکی جدایه LpNh همخوانی دارد. در شکل ۵ نحوه تولیدکنیدیوم در جدایه LpNh آورده شده است.



شکل ۵- نحوه تولید کنیدیوم در جدایه LpNh.

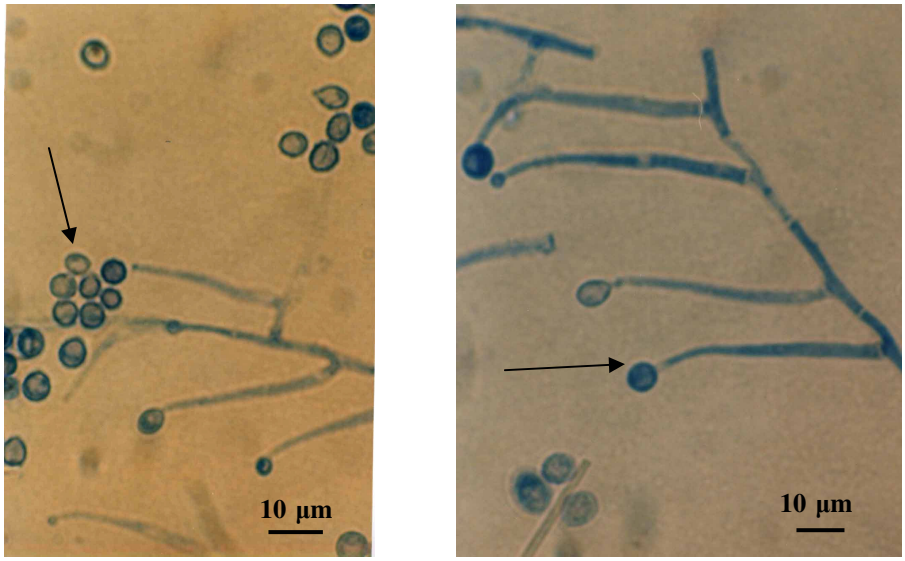
Fig. 5. Position of conidia of LpNh isolate on conidiophore.

در دندروگرام مربوط به تجزیه و تحلیل داده‌های مرفولوژیکی، در کلاستر دوم تمام گونه‌های عقیم که روی هیچ یک از محیط‌های به کار رفته در این پژوهش کنیدیومی تولید نکردند، قرار گرفتند. جدایه‌های MpEn، BtHi و $FaKn_2$ دارای پرگنه‌های مومی شکل بودند و جدایه‌های

LpYd و BtFd دارای پرگنه‌های نمدی شکل بودند. برای یافتن ماهیت این جدایه‌ها نیاز به پژوهش‌های بیشتر و بررسی توالی نوکلئوتیدی قسمت‌های مختلف ژنوم می‌باشد.

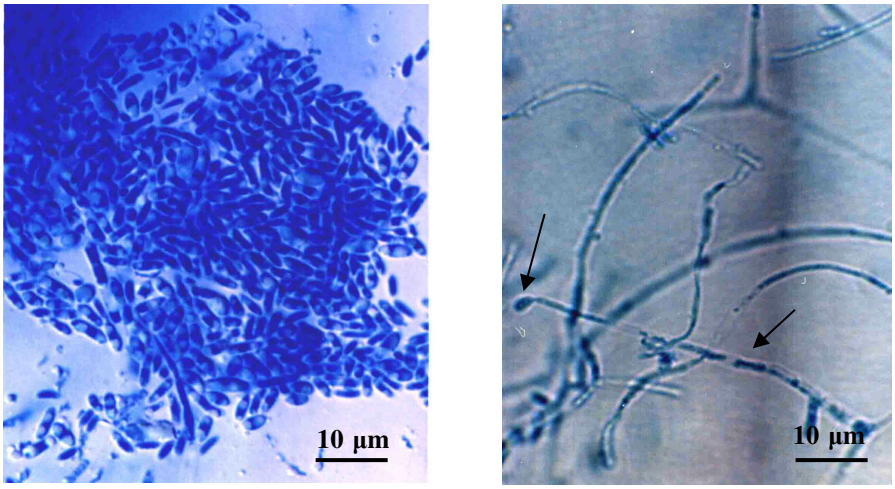
در گروه سوم جدایه‌های $FaFn_1$ ، FpBn ،$FaKn_1$ و FoGn قرار گرفتند که از نظر صفات مورفولوژیکی بسیار شبیه به هم و با بقیه جدایه‌ها متفاوت بودند. این جدایه‌ها دارای پرگنه‌های سریع‌الرشد و کنیدیوم‌های مستقیم و بیضوی بودند ولی اشکال خمیده نیز در میان آن‌ها مشاهده شد. برخلاف بقیه جدایه‌ها که کنیدیوم‌زایی به صورت منفرد یا دوتایی بود، در این جدایه‌ها کنیدیوم‌ها در سرهای کنیدیومی تشکیل شدند. فیالیدها، کشیده و در قاعده آن‌ها دیواره وجود داشت. در شکل‌های ۸-۶، وضعیت تولیدکنیدیوم و فیالید در جدایه‌های $FaFn_1$، FpBn و FoGn مشخص شده است. این چهار جدایه به خاطر داشتن پرگنه‌های سریع‌الرشد با توصیف عمومی جنس *Acremonium* مبنی بر داشتن پرگنه‌های کند رشد مغایرت دارند. از طرف دیگر جدایه FoGn دارای کنیدیوم‌های گرد بود که شکل کنیدیوم در این جدایه نیز با توصیف عمومی جنس *Acremonium* متفاوت است. طی مکاتبات شخصی با پروفسور *والتر گمس* (W. Gams)، جدایه FoGn، گونه *N. festucae* Leuchtmann, Schardl & Siegel تشخیص داده شد که این گونه برای اولین بار در ایران از *F. ovina* L.، در این پژوهش گزارش می‌شود. پرگنه این جدایه بعد از دو هفته رشد، مورد بررسی قرار گرفت. پرگنه روی PDA به رنگ کرم و از پشت پتری قهوه‌ای، مسطح، نمدی، چین‌خورده، دارای حاشیه منظم که حاشیه به صورت سطحی روی محیط آگاردار قرار گرفته بود و در اطراف پرگنه هاله وجود نداشت. در مدت ۱۰ روز به میزان ۲۹ میلی‌متر روی PDA و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد رشد کرد. روی PDA ریسه‌های رویشی ۱-۰/۸ میکرومتر قطر داشتند. طول کنیدیوفور (۵۶-)۳۶-۱۶/۵-(-۱۶) میکرومتر اندازه‌گیری شد که کنیدیوفورها بدون انشعاب، کشیده و دارای دیواره بودند. قطر کنیدیوفور در قاعده ۱-۲/۴ میکرومتر بود که به طرف انتها باریک می‌شد و اندازه آن به ۱-۰/۵ میکرومتر می‌رسید. قاعده کنیدیوفور رنگ‌پذیر بود. کنیدیوم‌ها در سرهای کنیدیومی و در انتهای فیالیدها قرار داشتند. کنیدیوم‌ها بیشتر گرد بودند. کنیدیوم‌ها تک‌یاخته‌ای، روشن و رنگ‌پذیر بودند. اندازه آن‌ها ۴/۸-۲/۴ میکرومتر بود.

در گروه چهارم که شامل دو زیر گروه است، جدایه‌های مربوط به *B. tomentellus* Boiss.، *F. ovina* L. و *M. persica* Hunth در کنار هم قرار گرفتند که با نظریات *کریستنسن* و همکاران (Christensen *et al.* 1993) و *گنجعلی* و همکاران (۲۰۰۴) مبنی بر قرار گرفتن جدایه‌های مربوط به یک میزبان در کنار هم مغایرت دارد. به نظر می‌رسد



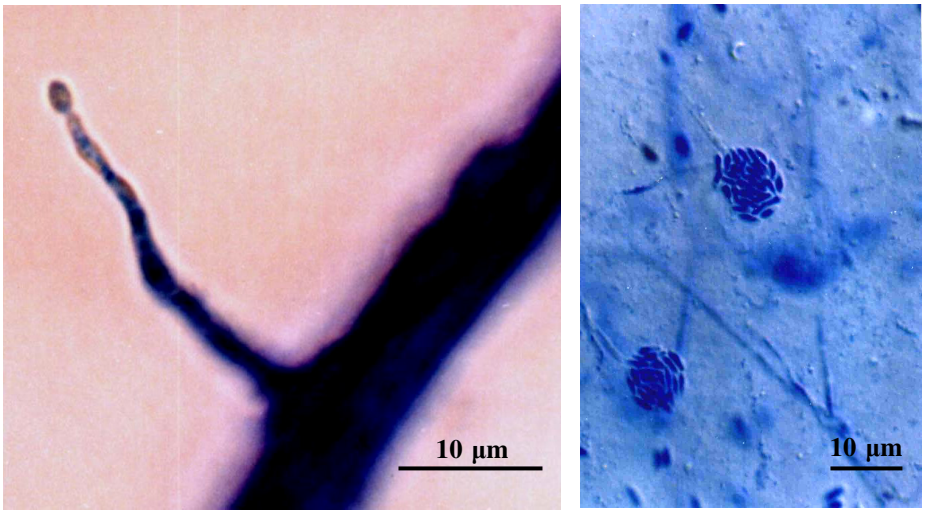
شکل ۶- وضعیت کنیدیوم‌زایی در جدایه FoGn.

Fig. 6. Position of conidia in isolate FoGn.



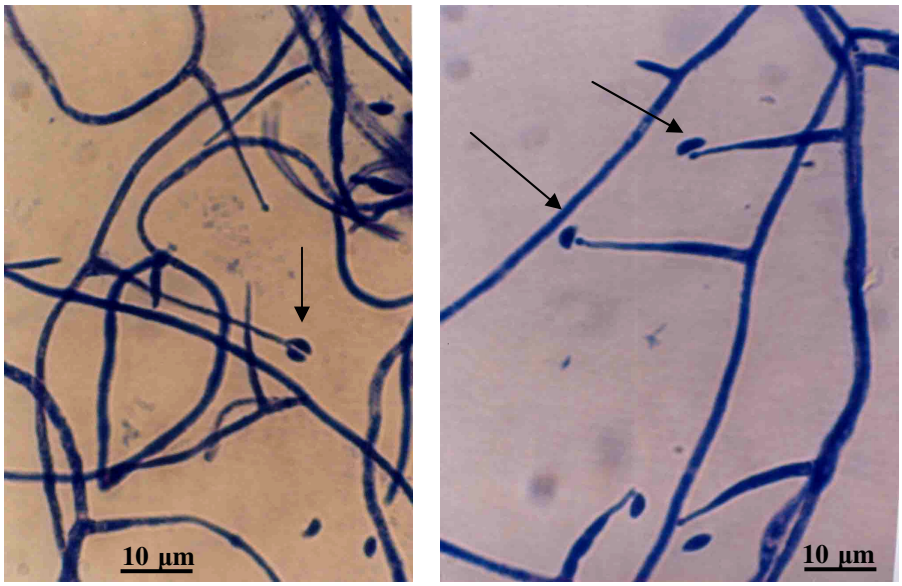
شکل ۷- وضعیت کنیدیوم‌زایی به صورت سر (سمت چپ - Nomarski) و فیالید (سمت راست) در جدایه $FaFn_1$.

Fig. 7. Position of conidia in head (left-Nomarski) and phialide (right) in $FaFn_1$ isolate.

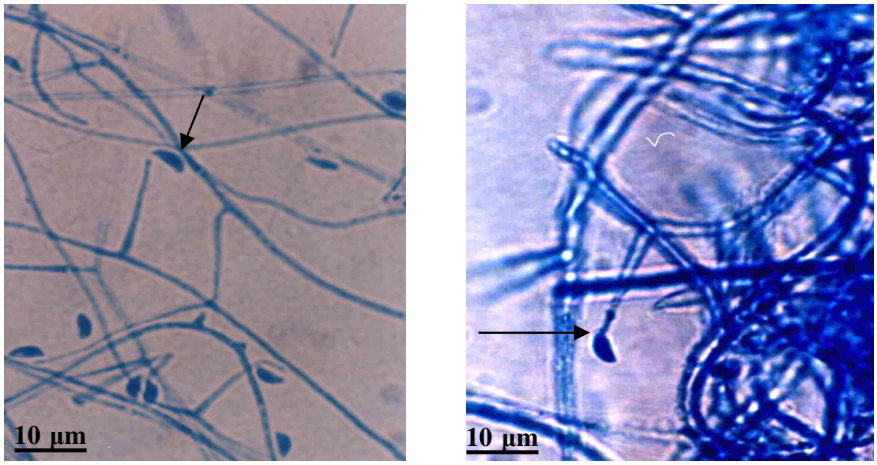


شکل ۸- فیالید (سمت چپ) وکنیدیوم‌زایی به صورت سر (سمت راست) در جدایه FpBn.
Fig. 8. Phialide (left) and conidia in head (right) of FpBn isolate.

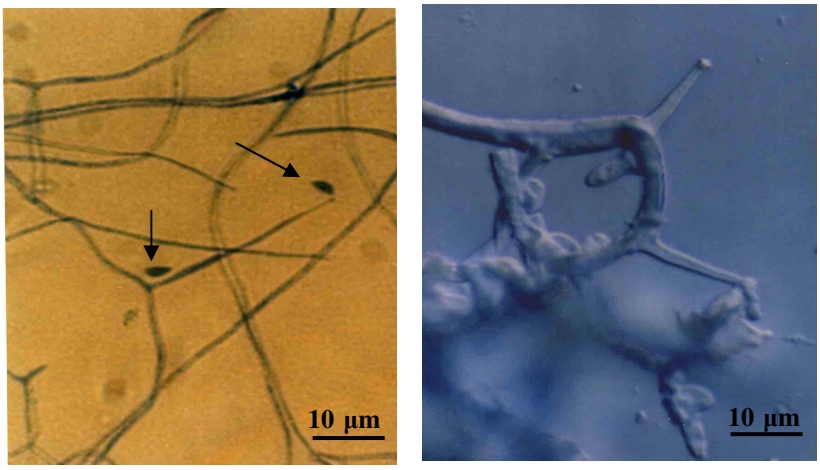
دلیل این عدم هماهنگی، عدم یکنواختی صفات در نظر گرفته باشد. چنانچه *کریستنسن* و همکاران (۱۹۹۳) فقط داده‌های آیزوزایمی، حساسیت به بنومیل، بعضی از صفات پرگنه و اندازه هاگ را در نظر گرفتند و *گنجعلی* و همکاران (۲۰۰۴) صفاتی نظیر رنگ پرگنه، نحوه چین‌خوردگی و شکل پرگنه، وضعیت پرز، برجستگی پرگنه و قطر پرگنه را نیز در نظر گرفتند ولی صفات میکروسکوپی قارچ را در نظر نگرفته بودند. در این گروه تمام جدایه‌ها به هم شبیه بودند و از نظر صفات مرفولوژیکی، با خصوصیات مورفولوژیکی جنس *Acremonium* هماهنگی داشتند. اعضای این گروه دارای کنیدیوم‌های کلیه‌ای شکل، فیالیدهای کشیده که بعضی فاقد دیواره در قاعده کنیدیوفور و بعضی دارای دیواره در قاعده کنیدیوفور بودند. در همه جدایه‌ها تولید کنیدیوم به صورت منفرد بود ولی در چهار جدایه FoTn، BtSm، BtBi و BtKn تولیدکنیدیوم به صورت منفرد و دوتایی بود که در دندروگرام در یک گروه جداگانه قرار گرفتند. در مکاتبات شخصی با پروفسور گمس جدایه‌های BtFn، BtBi، BtChn، BtKn، BtGh، BtBn و BtShd را ایشان، *N.* cf. *bromicola* Leuchtmann & Schardl تشخیص دادند. تاکنون گزارشی از این گونه قارچی روی *B. tomentellus* منتشر نشده است. در این پژوهش برای اولین بار گونه *N.* cf. *bromicola* از *B. tomentellus* بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی گزارش می‌شود. در شکل‌های ۱۱-۹، نحوه کنیدیوم‌زایی و شکل فیالیدها در جدایه‌های BtSm، BtBi، BtBn و $MpKhr_2$ قابل مشاهده است.



شکل ۹- کنیدیوم‌زایی به صورت منفرد (سمت راست) و دوتایی (سمت چپ) در جدایه BtSm.
Fig. 9. Single spore (right) and double (left) conidium production by BtSm isolate.



شکل ۱۰- فیالید و نحوه کنیدیوم‌زایی در جدایه BtBi.
Fig.10. Phialide and conidium position in BtBin isolate.



شکل ۱۱- فیالید و نحوه کنیدیوم‌زایی در جدایه BtBn (سمت راست - Nomarski) و جدایـه $MpKhr_2$ (سمت چپ).

Fig. 11. Phialide and conidium position in BtBn (right- Nomarski) and $MpKhr_2$ (left) isolates.

قرارگرفتن نمونه تیپ *N. typhina* (Morgan-Jones & W. Gams) Glenn, C.W. Bacon & Hanlin در کنار بقیه جدایه‌ها نشان‌دهنده شباهت این جدایه‌ها به گونه تیپ بود. *N. typhina* یک شاخه جداگانه را تشکیل داد که در این گونه تیپ فیالیدها کشیده با دیواره‌ای در قاعده بودند ولی در اکثر جدایه‌ها چنین دیواره‌ای در قاعده کنیدیوفور مشاهده نشد، به علاوه، گونه تیپ سریع‌الرشد بود و در طول ۱۰ روز به میزان ۲۸ میلی‌متر روی PDA رشد کرد در صورتی که بقیه جدایه‌هایی که دارای صفاتی شبیه به این گونه بودند چنین رشد سریعی را نداشتند. برای روشن شدن میزان شباهت این جدایه‌ها با گونه تیپ *N. typhina* نیاز به بررسی‌های مورفولوژیکی و مولکولی بیشتری است تا به طور دقیق بتوان گونه این جدایه‌ها را تشخیص داد.

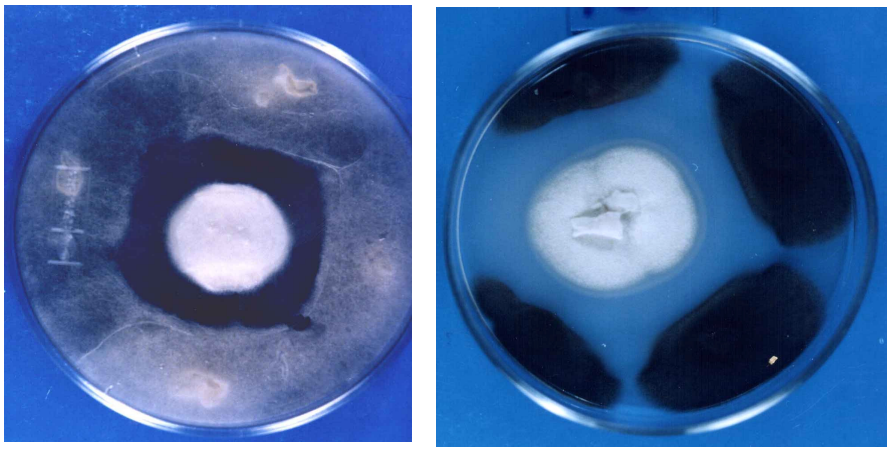
با توجه به این‌که *گنجعلی* و همکاران (۲۰۰۴) و *خیام نکویی* و همکاران (۲۰۰۱) فقط بر اساس یافته‌های مولکولی جنس *Neotyphodium* را از جدایه‌های اندوفیت ایران گزارش کرده بودند و صفات مورفولوژیکی را در نظر نگرفته بودند و یا فقط به صفات ظاهری پرگنه پرداخته بودند، لذا در این پژوهش بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی برای اولین بار در ایران جنس *Neotyphodium* برای قارچ‌های اندوفیت میزبان‌های *F. arundinacea*، *F. pratensis* Hudson، *F. ovina*، *B. tomentellus*، *M. persica*، *L. prenne* و گونه *N. lolii*، گونه *L. prenne* گونه

N. coenophialum برای گیاه *F. arundinacea* گونه *N. festucae* از *F. ovina* و گونه *N.* cf. *bromicola* برای *B. tomentellus* تشخیص داده شد.

آزمون آنتی‌بیوز

در بررسی اثر آنتی‌بیوز جدایه‌های قارچ اندوفیت روی دو قارچ بیماری‌زای *Pythium aphanidermatum* و *Bipolaris australiensis*، مشخص شد که تمامی جدایه‌ها به جز جدایه‌های FoGn و MpFn روی *P. aphanidermatum* اثر بازدارندگی نداشتند ولی بیشتر جدایه‌ها روی *B. austrulensis* مؤثر بودند. در بیشتر موارد که اثر آنتی‌بیوز روی هر یک از قارچ‌های مذکور مثبت بود، هاله‌ای در اطراف قارچ اندوفیت تشکیل شده و رشد قارچ بیماری‌زا متوقف گردید. در بعضی از جدایه‌ها نظیر FoGn چنین هاله‌ای در اطراف قارچ اندوفیت تشکیل نشد ولی قارچ اندوفیت دارای اثر بازدارندگی روی رشد قارچ بیماری‌زا بود. محققان اثر بازدارندگی قارچ‌های اندوفیت روی قارچ‌های بیماری‌زا را به تولید آنتی‌بیوتیک توسط این قارچ‌ها نسبت داده‌اند (Christensen *et al.* 1991).

کریستنسن و همکاران (۱۹۹۱) اثر قارچ‌های اندوفیت جدا شده از *L. prenne* در بازدارندگی دو قارچ *Colletotrichum graminicola* و *Drechslera erythrospila* را بررسی کردند و گزارش نمودند که بعضی از جدایه‌ها روی این دو قارچ اثر بازدارندگی داشته‌اند. بر اساس نظر این پژوهشگران جدایه‌های اندوفیت با پرگنه مومی و مغزی شکل که حاشیه آن‌ها داخل محیط کشت فرو رفته نبود و کند رشد بودند قادر به تولید آنتی‌بیوتیک نبوده و اثر آنتی‌بیوز روی قارچ‌های دیگر ندارند. در تحقیق حاضر مشخص شد سه جدایه $FaKn_2$، BtHi و MpEn که دارای خصوصیات مورفولوژیکی شبیه به خصوصیات بیان شده توسط کریستنسن و همکاران (۱۹۹۱) بود، دارای اثر آنتی‌بیوز روی دو قارچ بیماری‌زای به کار رفته در پژوهش نبودند، ولی علاوه بر این سه جدایه، جدایه‌هایی نظیر MpKhr و BtChn که از نظر خصوصیات مورفولوژیکی، نمدی، نرم و سریع‌الرشد بودند و یا جدایه FpEn که از نظر شکل پرگنه، نمدی و مغزی شکل بود نیز دارای آنتی بیوز منفی بودند. بنابراین، به نظر می‌رسد که شکل پرگنه در تولید آنتی‌بیوتیک نقشی نداشته باشد. البته این پژوهشگران فقط اثر جدایه‌های مربوط به *L. prenne* را روی دو قارچ *Colletotrichum graminicola* و *Drechslera erythrospila* بررسی کرده‌اند و اگر با جدایه‌های بیشتری از میزبان‌های مختلف، این آزمون را انجام داده بودند به نتایجی مشابه این تحقیق دست می‌یافتند. در شکل ۱۲ اثر جدایه MpFn روی *B. australiensis* و اثر آنتی بیوزی FoGn روی *P. aphanidermatum* نشان داده شده است.



شکل ۱۲- اثر جدایه MpFn روی *Bipolaris australiensis* (سمت راست) و جدایه FoGn روی *Pythium aphanidermatum* (سمت چپ).

Fig. 12. Effect of MpFn isolate on *Bipolaris australiensis* (right) and FoGN isolate on *Pythium aphanidermatum* (left).

سپاسگزاری

نگارندگان از آقای دکتر رسول زارع به خاطر مشورت‌های ارزنده و آقای دکتر مجتبی خیام نکویی به خاطر در اختیار گذاشتن برخی مواد گیاهی و از آقای پروفسور والتر گمس از مرکز CBS هلند به خاطر شناسایی و تایید برخی از گونه‌ها و ارسال گونه‌های تیپ *Neotyphodium* صمیمانه سپاسگزاری می‌نمایند. زحمات آقای مهندس علیرضا اخوان در آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه صنعتی اصفهان قابل تقدیر و تشکر است.

منابع

جهت ملاحظه منابع به صفحات 50-48 متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: سعیده دهقانپور فراشاه (E-mail: sdfarashah@yahoo.com)، دکتر بهرام شریف نبی (E-mail: sharifna@cc.iut.ac.ir) و دکتر آقافخر میرلوحی (E-mail: mirlohi@cc.iut.ac.ir)، دانشکده کشاورزی دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان.

ENDOPHYTIC SPECIES OF *NEOTYPHODIUM* ON SOME GRAMINEOUS SPECIES IN IRAN

S. DEHGHANPOUR FARASHAH, B. SHARIFNABI* and **A. F. MIRLOHI**
College of Agriculture, Isfahan Univ. of Technology, Isfahan, Iran

Received: 29.08.2005 Accepted: 07.12.2005

Some members of the family Clavicipitaceae are endophytic and have mutualistic relationship with the plant family Poaceae. Their relationship is beneficial for both host and fungus. In the present investigation, endophytic fungi were isolated from seed and leaf sheath of hosts *Festuca arundinacea*, *F. ovina*, *F. pratensis*, *Bromus tomentellus*, *Melica persica* and *Lolium prenne*. Morphological characters were checked on different culture media. Most of the isolates obtained from wild barley belonged to the section *Albo-lanosa* of the genus *Acremonium* and *Neotyphodium*. Sensitivity of the isolates to benomyl was tested and it was found that, media containing benomyl enhanced sporulation of non-sporulating isolates. In antibiosis test, it was found that most of isolates were effective against the phytopathogenic fungus *Bipolaris australiensis* and only two isolates of FoGn and MpFn were effective against *Pythium aphanidermatum*. Based on morphological characters, the genus *Neotyphodium* on *F. arundinaceae*, *F. pratensis*, *F. ovina*, *B. tomentellus*, *M. persica* and *L. prenne* and *N. coenophialum* on *F. arundinacea* and *N. festucae* on *F. ovina* and *N. lolii* on

* Corresponing author

L. prenne and *N*. cf. *bromicola* on *B*. *tomentellus*, were identified and this is the first report of these fungi from Iran.

Key words: Endophytic fungi, Poaceae, *Neotyphodium*, *Acremonium*

To look at the figures and table, please refer to the Persian text (pages: ۱۳۱-۱۵۰).

References

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W. and BLACKWELL, M., 1996. Introductory Mycology, 4th ed., John Wiley & Sons, New York.

BACON, C.W., RICHARDSON, M.D. and WHITE, Jr., J.F. 1997. Modification and uses of endophyte-enhanced turfgrasses: A role for molecular technology. Crop Sci. 37: 1415-1425.

CHRISTENSEN, M.J. 1993. A concise guide to the taxonomy of *Acremonium* endophytes, in particular with those from *Lolium prenne* and *Festuca arundinacea*. Proceedings of the 2nd International Symposium on *Acremonium* Grass Interaction, New Zealand, 1993, P. 59-61.

CHRISTENSEN, M.J., LEUCHTMANN, A., ROWAN, D.D. and TAPPER, B.A. 1993. Taxonomy of *Acremonium* endophytes of tall fescue (*Festuca arundinacea*), meadow fescue (*F. pratensis*) and perennial ryegrass (*Lolium prenne*). Mycol. Res. 97: 1083-1092.

CHRISTENSEN, M.J., LUTCH, G.C.M. and TAPPER, B.A. 1991. Variation within isolates of *Acremonium* endophytes from perennial rye-grasses. Mycol. Res. 95: 918-923.

CLAY, K. 1989. Clavicipitaceous endophytes of grasses, their potential as biocontrol agent. Mycol. Res. 92: 1-12.

DIEHL, W.W. 1950. *Balansia* and Balansiae in America. U.S. Government Printing Office (ed.) USDA Agric. Monograph 4. U.S. Gov. Print. Office. Washington DC.

DOSS, R.P., CLEMENT, S.L., KUY, S.R. and WELTY. R.E. 1998. A PCR-based technique for detection of *Neotyphodium* endophytes in diverse accessions of tall fescue. Plant Dis. 82: 738-740.

DUGAN, F.M., SITTON, J.W., SULLIVAN, R.F. and WHITE, Jr., J.F. 2002. The *Neotyphodium* endophyte of wild barley (*Hordeum brevisubulatum* sub.sp. *violaceum*) grows and sporulates on leaf surfaces of the host. Symbiosis 32: 147-159.

GANJALI, R., SHARIFNABI, B. and MIRLOHI, A.F. 2004. Classical methods and specific primers in detection of endophytic fungi in some gramineous plants. Rostaniha 5: 37-51 (in Persian with English summary).

GLENN, A.E., BACON, C.W., PRICE, R. and HANLIN, R.T. 1996. Molecular phylogeny of *Acremonium* and taxonomic implications. Mycologia 88: 369-383.

KHAYYAM NEKOUEI, M., MIRLOHI, A.F., NADERI SAHAB, M., MEON, S., MANAF ALI, A. and NAPIS, S. 2001. Prevalence and viability assessment of endophytic fungi in Iranian tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). Asia Pacific J. Mol. Biol. and Biotech. 9: 60-66.

KOGA, H., TSUKIBOSHI, T. and UEMATSU, T. 1994. Incidence of the endophytic fungus, *Acremonium uncinatum*, in meadow fescue (*Festuca pratensis*) ecotypes in Hokkaido. Bull. Natl. Grassl. Res. Inst. 49: 35-40.

LATCH, G.C.M., CHRISTENSEN, M.J. and SAMUELS, G.J. 1984. Five endophytes of *Lolium* and *Festuca* in New Zealand. Mycotaxon 20: 535-550.

MARSHALL, D., TUNALI, B. and NELSON, L.R. 1999. Occurence of fungal endophytes in species of wild *Triticum*. Crop Sci. 39: 1507-1512.

MOGHADDAM, M.R. 2001. Range and range management. (2nd ed.). University of Tehran, Iran.

MOHAMMADI, R. 2001. Comparison of phenotypic characteristics in endophyte infected and endophyte-free plants of tall fescue and meadow fescue. M.Sc. Thesis. Isfahan University of Technology (in Persian with English summary).

MORGAN-JONES, G. and GAMS, W. 1982. Notes on Hyphomycetes XLI. An endophyte of *Festuca arundinaceae* and the anamorph of *Epichloë typhina*, new taxa in one of two sections of *Acremonium*. Mycotaxon 15: 316-318.

NEIL, J.C.1940. The endophyte of rye-grass (*Lolium prenne*). New Zealand J. Sci. Tech. 21: 281-301.

RICE, J.S., PINKERTON, B.W., STRINGER, W.C. and UNDERSANDER, D.J. 1990. Seed production in tall fescue as affected by fungal endophyte. Crop Sci. 33: 145-149.

SACCARDO, P.A. 1881. Fungi Veneti novi vel critici v. Mycologiae venetae addendi. Michelia 2: 241-301.

VOGL, A. 1898. Mehl und die anderen Mehlprodukte der Cerealien und Leguminosen. Zeit. Nahrungsmittle Untersuchung. Hyg. Warenkunde. 12: 25-29.

ZAUROVE, D.E., BONOS, S., MURPHY, J.A., RICHARDSON, M. and BELANGER, F.C. 2001. Endophyte infected can contribute to Aluminium tolerance in fine fescues. Crop Sci. 41: 1981-1984.

Addresses of the authors: S. DEHGHANPOUR FARASHAH, Former graduate student of Plant Pathology (E-mail: sdfarashah@yahoo.com); Dr. B. SHARIFNABI, Assist. Prof. of Mycology (E-mail: sharifna@cc.iut.ac.ir), and Dr. A.F. MIRLOHI, Associate Prof. of Plant Breeding (E-mail: mirlohi@cc.iut.ac.ir), College of Agriculture, Isfahan Univ. of Technology, Isfahan Iran.