اندوفیت‌ها (مروری)

Endophytes(Review)

آیدین حسن‌زاده

Hasanzadeh.i@arc-ordc.ir

کارشناس ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات کاربردی و تولید بذر، شرکت توسعه کشت دانه‌های روغنی

۱.جمعیت و تنوع قارچ‌های اندوفیت ریشه

جمعیت و تنوع قارچ‌های اندوفیت، به عوامل مختلفی شامل نوع اندام گیاه (Kumar & Hyde, 2004; Foyer & Shigeoka, 2011)، نوع میزبان (Fisher et al., 1992; Kumar & Hyde, 2004; Arnold & Lutzoni, 2007; Huang et al., 2008; Naik et al., 2008)، سن گیاه میزبان (Wang & Gou, 2007)، وضعیت ژنتیکی قارچ و گیاه میزبان، مرحله رشدی گیاه، وضعیت تغذیه‌ای و شرایط محیطی و عوامل غیرزنده از قبیل دما و رطوبت (Arnold et al., 2003; Schulz & Boyle, 2006; Lana et al., 2011) بستگی دارد. قارچ‌های اندوفیت ریشه ممکن است علاوه بر گیاه میزبان با دیگر موجودات زنده مانند قارچ‌های میکوریز و حیوانات نیز تعامل داشته‌باشند و برای مثال قارچ‌های نماتدخوار که در همه خاک‌ها یافت‌می‌شوند، نه‌تنها می‌توانند برای تغذیه از نماتدها، از مرحله ساپروفیتی به مرحله پارازیتی تغییر کنند، بلکه در ریشه‌های گیاه نیز می‌توانند به‌صورت اندوفیت رشد نمایند (Schulz & Boyle, 2006). تنوع گونه‌های اندوفیت و فعالیت زیستی آنها، هم به گونه گیاه و هم به ناحیه نمونه‌برداری بستگی دارد (سپهری و همکاران، ۱۳۸۸). فری‌من و رودریگوز (۱۹۹۳) نقش ژنتیک در تعاملات اندوفیتی را تشریح و بیان نمودند تنها یک جهش منجر به از دست دادن یک فاکتور بیماری‌زایی و تبدیل گونه *Colletotrichum magna* به یک قارچ اندوفیت شده است (Freeman & Rodriguez, 1993). تمامی موجوداتی که به عنوان اندوفیت از بافت‌های گیاهی بدون علائم بیماری شناسایی شده‌اند، شامل میکروارگانیسم‌هایی با استراتژی‌های متفاوت زندگی هستند. اندوفیت‌ها به هر دو شکل فردی و گروهی، زنجیره‌ای از اجتماعات متغیر شامل همزیستی، همیاری، بیماری‌زایی نهفته و انگلی تشکیل‌می‌دهند. این تعاملات اغلب بسته به وضعیت ژنتیکی دو شریک تعامل، مرحله رشدی، وضعیت تغذیه‌ای و عوامل محیطی متغیر هستند (Schulz & Boyle, 2006).

۲. تعامل قارچ‌های اندوفیت با ریشه گیاهان

نتایج بسیاری از مطالعات نشان‌داده‌است که قارچ‌های اندوفیت در بافت سالم گیاه میزبان حضورداشته و هیچ‌گونه علائم بیماری در بافت میزبان ایجاد نمی‌کنند (Arnold & Lutzoni, 2007; Hyde & Soytong, 2008; Ghimire et al., 2011; Rhocha et al., 2011; Tadych et al., 2012; Douanla-Meli et al., 2013). در تعاملات همیاری، قارچ‌هایی که به‌صورت اندوفیت، ریشه‌های گیاه را کلنیزه می‌کنند، شریک میکروبی از یک منبع غذایی مطمئن و حفاظت در برابر تنش‌های محیطی سود خواهد برد. در مقابل، مزایای این تعامل برای گیاه میزبان شامل بهبود رشد و نمو، مقاومت القایی، کنترل بیولوژیکی نماتدها و قارچ‌های بیمارگر گیاهی و سنتز متابولیت‌های آنتاگونیستی است (Schulz et al., 2002; Schulz & Boyle, 2005). بهبود رشد و نمو گیاه نتیجه سنتز هورمون‌های گیاهی (Tudzynski, 1997; Tudzynski & Sharon, 2002; Kobayashi & Palumbo, 2000)، دسترسی به مواد معدنی و مغذی خاک (Caldwell et al., 2000; Barrow, 2003)

و تثبیت ازت است (Reinhold-Hurek & Hurek, 1998). در جوامع تثبیت کننده ازت و تعاملات میکوریزی، برخی از مولکول‌های سیگنالی (Lapopin & Franken, 2000; Martin et al., 2001; Mirabella et al., 2002; Imaizumi-Anraku et al., 2005) و پروتئین‌های غشایی پلاستید (Imaizumi-Anraku et al., 2005)، برای ورود میکروارگانیسم به ریشه گیاه میزبان و تشکیل همزیستی بسیار مهم می‌باشند. در ارزیابی پتانسیل گونه *Piriformospora indica* برای کاهش خسارت نماتد سیست (SCN) *Heterodera glycines* به گیاهچه‌های سویا (*Glycine max*)، نتایج نشان داد تلقیح خاک با این قارچ اندوفیت ریشه، سبب کاهش تراکم تخم نماتد خواهدشد. همچنین گیاهچه‌های کشت‌شده در خاک تلقیح‌شده با اندوفیت، رشد بیشتری داشتند و میزان گلدهی در گیاهان بالغ افزایش یافت (Bajaj et al., 2015). نتایج به‌دست‌آمده از پژوهش سپهری و همکاران (۱۳۸۸)، در بررسی تأثیر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر رشد و مقاومت گیاه جو تحت تنش شوری، بیانگر اهمیت برقراری ارتباط همزیستی این گونه قارچی با گیاه جو در تحریک رشد گیاه و درنتیجه افزایش عملکرد آن است. قارچ‌های اندوفیت همزیست با گیاهان، به‌صورت بین‌سلولی در برگ‌ها، ساقه، مریستم‌های جوانه و بذرهای میزبان رشد می‌کنند و هیچ‌گونه علائم بیماری در میزبان ایجاد نمی‌کنند (Leuchtman & Schardl, 1998) و ریسه‌ها به ندرت در آوندهای چوبی و آبکش یافت‌می‌شوند (Schulz & Boyle, 2006). نقش مؤثر قارچ‌های اندوفیت در برابر حشرات و حیوانات علف‌خوار گزارش شده‌است (Vega et al., 2008). تنوع زیادی در میان اندوفیت‌های گیاهان علفی از نظر تولید آلکالوئید وجوددارد که باعث ایجاد اختلال در سلامتی حیوانات تغذیه‌کننده می‌شود و ممکن است باعث مقاومت این گیاهان به حشرات آفت شوند. تولید متابولیت‌هایی نظیر آلکالوئیدهای پرآمین و لولین باعث حفاظت میزبان علیه آفات و آلکالوئیدهایی نظیر لولیترم B و ارگووالین باعث مسمومیت حیوانات تغذیه‌کننده می‌شوند (Leuchtman & Schardl, 1998; Bacon & White, 1994). اندوفیت‌ها باعث افزایش فتوسنتز و رشد ریشه گیاه میزبان می‌شوند (Belesky & Fedders, 1995) و عملکرد گیاهان میزبان را افزایش می‌دهند (Marshall et al., 1999). گیاهان آلوده به اندوفیت، عملکرد خوبی در شرایط کمبود ترکیبات نیتروژن نسبت به گیاهان غیرآلوده دارند (دهقانپور و همکاران، ۱۳۸۵). نتایج ارزیابی تأثیر قارچ‌های اندوفیت ریشه بر تحمل گیاه ذرت به فلزات سنگین نشان‌داد که تلقیح ریشه این گیاه با گونه *Exophiala pisciphila*، با جلوگیری از جابه‌جایی یون‌های فلزات سنگین از ریشه به شاخه‌های ذرت، اثرات منفی آنها را کاهش و رشد گیاه میزبان را در خاک آلوده افزایش داده‌است (Li et al., 2011). مشاهدات نشان می‌دهد که در بین قارچ‌ها، یک قارچ میکوریز می‌تواند به‌صورت اندوفیت درون ریشه‌های یک گیاه غیرمیزبان رشد نماید (Villarreal-Ruiz et al., 2004). تنوع و تراکم کلنی‌سازی قارچ‌های اندوفیت در خلال رشد رویشی گیاه میزبان افزایش می‌یابد (Smalla et al., 2001). در فصل پائیز و در پایان مرحله رویشی گیاه میزبان، اسپوردهی غیرجنسی قارچ اندوفیت افزایش خواهدیافت. اندوفیت‌های یک میزبان ممکن است همه‌جازی باشند و یا میزبان اختصاصی داشته باشند (Carroll, 1988; Petrini, 1996; Stone et al., 2000; Berg et al., 2002; Cohen, 2004). برای میکروارگانیسم‌هایی که فقط یک میزبان را کلنیزه می‌کنند از اصطلاح تخصص میزبانی (Schulz & Boyle, 2005) و برای اندوفیت‌های همه‌جازی از اصطلاح ترجیح میزبانی (Carroll, 1999) و یا انحصار میزبانی استفاده‌می‌شود

(Zhou & Hyde, 2001). بنابراین تعامل نشان‌دهنده یک سازگاری بین میزبان و اندوفیت به‌صورت خاص، ترجیحی و یا انحصاری است. سازگاری ممکن است فقط با یک میزبان خاص نباشد اما در رشد اندوفیتی در یک اندام گیاه مانند ریشه‌ها و شاخه‌ها می‌تواند اختصاصی باشد (Petrini, 1991; Hallmann et al., 1997; Sieber, 2002; Schulz & Boyle, 2005).

نتایج تحقیق روی نقش گونه *Veronaeopsis simplex* به عنوان قارچ اندوفیت ریشه نشان‌داد که این گونه با ایجاد یک توده گسترده از میسلیوم خود در اطراف ریشه کلم و همچنین القا مکانیسم مقاومت در آن، اثرات مخرب گونه *Fusarium oxysporum* را به میزان ۷۱ درصد کاهش داده‌است (Khastini et al., 2012).

نتایج بررسی میزان رشد و تأثیر گونه‌های مختلف قارچ‌های اندوفیت و میکوریز در رشد گیاهان میزبان در طیف‌های مختلف pH خاک‌های جنگلی، نشان‌داد که در pH پائین خاک، اندوفیت‌ها جایگزین میکوریزها شده و می‌توانند اثرات منفی اسیدیته بالای خاک را برای گیاهان میزبان خود کاهش دهند. همچنین مشاهده‌شد که قارچ‌های اندوفیت می‌توانند از میزبان خود در برابر ترکیبات سمی خاک مثل آلومینیم حفاظت نمایند (Postma et al., 2007).

در ارزیابی قارچ اندوفیت *Phialocephala europaea* در کنترل گونه‌های *Phytophthora spp.*، نتایج نشان داد که این جدایه اندوفیت توانسته در شرایط آزمایشگاهی با تولید متابولیت‌های ثانویه، میزان رشد گونه *Phytophthora citricola* را کاهش دهد (Telenbach et al., 2013).

به منظور بررسی تأثیر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر برخی خصوصیات جو در شرایط تنش خشکی، آزمایش گلخانه‌ای صورت گرفت. نتایج نشان‌داد که این قارچ سبب افزایش زیست توده اندام‌های هوایی و ریشه گیاهان تلقیح شده نسبت به گیاهان شاهد شد، به طوری که وزن خشک اندام هوایی و ریشه در گیاهان تلقیح شده نسبت به شاهد به ترتیب ۳۹ و ۴۶ درصد افزایش نشان داد. در شرایط تنش، محتوای نسبی آب گیاهان تلقیح شده بالاتر بود. همچنین نتایج نشان‌داد با توجه به امکان کشت این قارچ در محیط کشت مصنوعی و بدون حضور میزبان، امکان استفاده از این قارچ به عنوان عامل محرک رشد گیاه در تولید کود بیولوژیک برای انواع گیاهان زراعی وجود دارد و این قارچ می‌تواند نقش مهمی در نیل به کشاورزی پایدار ایفانماید (قبولی و همکاران، ۱۳۸۹).

در بررسی اثرات تلقیح قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* و ریزوباکتری‌های افزاینده رشد گیاه *Azospirillum sp.* بر رشد و خصوصیات فیزیولوژیکی گیاه گندم تحت تنش شوری، آزمایشی به صورت فاکتوریل در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه انجام‌شد. تیمارهای آزمایشی شامل پنج سطح میکروارگانیسم‌های اندوفیت (قارچ، باکتری، قارچ و باکتری با هم و شاهد)، چهار سطح شوری آب آبیاری (۰/۲، ۴، ۸ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) بود. نتایج نشان‌داد که این قارچ تأثیر مثبت و معنی‌داری بر رشد، میزان زی‌توده تر و خشک اندام‌های هوایی، کلروفیل و محلول‌های اسمولیت در گیاهان گندم تلقیح شده تحت شرایط شور و غیر شور داشت، به طوری که کاربرد قارچ منجر به کاهش اثرات شوری و بهبود رشد گیاه گندم گردید. گیاهان تلقیح شده با باکتری نیز از میزان زی‌توده، تجمع اسمولیت‌ها و کلروفیل بیشتری برخوردار بودند. تلقیح با سویه سازگار به شوری باکتری، تأثیر مطلوب‌تری بر کلروفیل و میزان زی‌توده داشت. نتایج این تحقیق نشان‌داد که تحت شرایط شوری می‌توان از میکروارگانیسم‌های اندوفیت در جهت افزایش رشد و

عملکرد گیاه گندم استفاده نمود (حاجی‌نیا و همکاران، ۱۳۹۰).

نتایج پژوهش بررسی جدایه‌های اندوفیت قارچی خانواده سرو نشان‌داد که گونه‌های جنس پنی‌سیلیوم شامل *Penicillium aurantiogriseum*، *P. chrysogenum*، *P. commune*، *P. echinulatum*، *P. expansum* و *P. viridicatum* دارای بیشترین فراوانی در بین تمامی گونه‌های جداسازی شده بودند. نتایج حاکی از آن بود که تنوع گونه‌های اندوفیت و فعالیت زیستی‌شان هم به گونه گیاه و هم به ناحیه نمونه‌برداری بستگی دارد. بررسی‌های بیشتر نشان‌داد که گونه‌های پنی‌سیلیوم جداسازی‌شده دارای اثرات زیستی قابل توجهی بودند (حسینی مقدم و همکاران، ۱۳۹۲).

۳. روش‌های ردیابی قارچ‌های اندوفیت

برای ردیابی قارچ‌های اندوفیت، از دو روش کلاسیک و مولکولی استفاده‌می‌شود.

۳-۱. روش کلاسیک

روش کلاسیک بر اساس مشاهده مستقیم، استفاده از محیط‌های کشت و استفاده از روش‌های بیوشیمیایی انجام‌می‌شود. در مشاهده مستقیم، ساختارهای قارچ اندوفیت در اندام زنده گیاه با استفاده از میکروسکوپ نوری و الکترونی مورد بررسی قرارمی‌گیرد و این روش برای قارچ‌های خاص در اندام‌های خاص (Stone, 1987) و قارچ‌های بیوتروف کاربرد دارد (Deckert et al., 2001; Lucero et al., 2011). در روش تشخیص کلاسیک با استفاده از محیط‌های کشت، نمونه بافت گیاه مورد بررسی، پس از ضدعفونی برای حذف میکروارگانیسم‌های سطحی از جمله قارچ‌های اپی‌فیت، بسته به نوع اندام گیاه (Hallmann et al., 2006)، روی محیط‌های مغذی مانند PDA و MEA (Gonzalez & Tello, 2011; Brum et al., 2012; Douanla-Meli et al., 2013)، کشت می‌شود. این روشی ساده برای جداسازی طیف وسیعی از قارچ‌ها می‌باشد (Stone, 1987). در روش‌های بیوشیمیایی از اسیدهای چرب و مارکرهای بیوشیمیایی استفاده‌می‌گردد (Kubicek & Druzhinina, 2007). ردیابی قارچ‌های اندوفیت در گیاهان علفی از طریق رنگ‌آمیزی با رزبنگال (Saha et al., 1988)، با استفاده از آزمون ELISA (Johnson et al., 1982)، اختلاف آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های مختلف برای گروه‌بندی قارچ‌های اندوفیت و استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال برای ردیابی گونه‌های *Neotyphodium sp.* به عنوان قارچ اندوفیت انجام شده است (Hiatt et al., 1997).

۳-۲. روش مولکولی

در روش مولکولی از انگشت‌نگاری DNA (Pancher et al., 2012)، مارکرهای DGGE[1] (Gotz et al., 2006)، SSR[2]، RAPD[3] (Burgess et al.,; Liang et al., 2005) و ردیابی‌ژنی با طراحی آغازگرهای اختصاصی بر اساس یک ژن خاص (Gao et al., 2005; Duong et al., 2006; Uren et al., 2009; Sun & Guo, 2012)، استفاده‌می‌شود. در این روش پس از نمونه‌گیری از بافت موردنظر و استخراج DNA جدایه قارچی، با استفاده از پرایمرهای اختصاصی به بررسی وجود قارچ در بافت میزبان پرداخته‌می‌شود. جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت، فرآیندی انتخابی و وابسته به روش است و قارچ جداسازی‌شده از بافت گیاهی تحت‌تأثیر روش ضدعفونی کردن سطحی، شرایط انکوباسیون و توانایی اسپوردهی جدایه قارچی در محیط

[1] Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

[2] Simple Sequence Repeat

[3] Random Amplified Polymorphic DNA

کشت قرارمی‌گیرد (Guo et al., 2001; Hyde & Soytong, 2008).

۴. روش‌های شناسایی قارچ‌های اندوفیت

شناسایی قارچ‌های اندوفیت به دو روش مبتنی بر ویژگی‌های مورفولوژیک و مبتنی بر توالی‌یابی مولکولی صورت می‌گیرد.

۴-۱. روش‌های مبتنی بر ویژگی‌های مورفولوژیکی

شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های قارچی با استفاده از کلیدهای معتبر شناسایی و بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی پرگنه شامل رنگ سطح و پشت پرگنه، نحوه رشد، تشکیل اندام باردهی، حضور یا عدم حضور رنگدانه، چین‌دار بودن یا نبودن پرگنه، وجود یا عدم وجود هاله، قطر و شکل پرگنه و ویژگی‌های میکروسکوپی پرگنه مانند مشخصات ریسه و اسپور صورت می‌گیرد (Su et al., 2010; Ghimire et al., 2011; Gonzalez & Tello, 2011; Rhocha et al., 2011). اساس شناسایی مورفولوژیکی، خصوصیات اسپور قارچ می‌باشد و با توجه به این‌که برخی از قارچ‌های اندوفیت اسپور تولید نمی‌کنند، بر این اساس این قارچ‌ها را به دو دسته دارای اسپور و فاقد اسپور تقسیم‌بندی می‌کنند. در مطالعات مبتنی بر خصوصیات مورفولوژیکی، قارچ‌های فاقد اسپور را Mycelia sterilia نام‌گذاری کرده‌اند (Petrini, 1991; Johnson & Whitney, 1992). مطالعات زیادی برای تحریک قارچ‌های اندوفیت به اسپوردهی صورت گرفته‌است (Guo et al., 1998; Wang et al., 2004).

۴-۲. روش‌های مبتنی بر توالی‌یابی مولکولی

برای شناسایی قارچ‌های اندوفیت و به‌ویژه قارچ‌های فاقد اسپور، از روش شناسایی مولکولی استفاده می‌شود. در این روش توالی اسیدهای نوکلئیک و فرآورده آن (پروتئین‌ها)، بررسی می‌گردد (Koko et al., 2011).

۴-۲-۱. ژن‌های مورداستفاده در تاکسونومی مولکولی قارچ‌های اندوفیت

ژن‌های مورداستفاده در تاکسونومی مولکولی قارچ‌ها شامل سه گروه DNA ریبوزومی هسته، DNA میتوکندریایی و مطالعه ژن‌های پروتئینی است (خداپرست، ۱۳۸۹؛ Berbee & Taylor, 2001).

۴-۲-۱-۱. DNA ریبوزومی هسته

یکی از قسمت‌های مهم ژنوم قارچ‌ها مورداستفاده در مطالعات فیلوژنتیکی و تاکسونومیکی، DNA تکرارشونده است. مهم‌ترین DNA تکرارشونده در قارچ‌ها، DNA ریبوزومی است که در همه قارچ‌ها وجود دارد. هر واحد rDNA از سه زیر واحد ژنی 5.8s، 18s و 28s تشکیل شده است. بین این سه زیر واحد، دو بخش جداکننده داخلی ITS1 و ITS2 قرار گرفته‌است که نواحی بیان‌شونده را از هم جدا کرده‌است. این سه زیر واحد همواره به دنبال همدیگر روی کروموزوم قرار می‌گیرند و به‌صورت یک واحد بیان می‌شوند. هر یک از نسخه‌های ژنی، به وسیله جداکننده بین ژنی IGS از واحد بعدی جدا می‌شود. ژن دیگری به نام *5s* وجود دارد که در قارچ‌های شاخه بازیدیومیکوتا به دنبال این سه زیر واحد قرار گرفته‌اند ولی در سایر قارچ‌ها، روی کروموزوم‌های متفاوتی قراردارند. در این توالی‌های تکرارشونده فرآیندی اتفاق می‌افتد که نسخه‌های متعدد آن را در یک فرد به طرف یکنواختی و همولوژی سوق می‌دهد و آنها را برای مطالعه آسان می‌کند. از سوی دیگر، وجود تکرارهای زیاد در این ژن‌ها، امکان استخراج، دسترسی و تکثیر آنها را به وسیله واکنش‌زنجیره‌ای‌پلیمراز فراهم می‌سازد. سرعت تغییر و جهش این نواحی یکسان نیست.

ژن‌های *5.8s* به دلیل ثبات بسیار زیاد، کارایی بالایی ندارند. هر چه سرعت جهش کمتر باشد از آن ژن می‌توان برای شناخت روابط تکاملی و تاکسونومیکی آرایه‌های بالاتر استفاده‌نمود. ژن *18s* در بررسی روابط فیلوژنتیکی راسته‌ها، خانواده‌ها و آرایه‌های بالاتر، استفاده‌می‌شود. ژن‌های *28s* برای جنس‌ها و آرایه‌های بالاتر و گاهی گونه‌های یک جنس استفاده‌می‌شوند (خداپرست، ۱۳۸۹). نواحی ITS و IGS دارای تنوع بیشتری نسبت به بخش‌های دیگر هستند و برای بررسی روابط فیلوژنتیک گونه‌های یک جنس و یا داخل گونه‌ای استفاده می‌شوند (Schoch et al., 2012).

۴-۲-۱-۲. DNA میتوکندریایی

ژنوم میتوکندریایی نیز واجد ژن‌های ریبوزومی است. یکی از این ژن‌های مورد استفاده در مورد برخی از قارچ‌ها، ژن سیتوکروم اکسیداز می‌باشد (Berbee & Taylor, 2001).

۴-۲-۱-۳. مطالعه ژن‌های پروتئین‌های خاص

تعدادی از ژن‌هایی که برای مطالعات تاکسونومیکی و فیلوژنتیکی استفاده‌شده‌است شامل EF-a1، ژن کیتین، ژن آلفا توبولین، ژن‌های کیتین سنتتاز، ژن زیر واحد بزرگ پلی‌مراز I (RPB1) و ژن زیر واحد بزرگ پلی‌مراز II (RPB2) می‌باشد. ژن‌های آلفا و بتا توبولین در قارچ‌ها و میکروسپوریدیا (Keeling, 2003) به استثنای کیتریدیومیست‌ها، تنوع ژنتیکی بالایی نشان‌می‌دهند (خداپرست، ۱۳۸۹).

۴-۲-۲. روش‌های استفاده از داده‌های مبتنی بر DNA

روش‌های استفاده از داده‌های مبتنی بر DNA شامل توالی‌یابی DNA، چند شکلی در طول قطعات برشی (RFLP)، PCR-RFLP، چند شکلی تکثیر تصادفی DNA (RAPD)، ساخت آغازگرهای اختصاصی بر اساس یک ژن خاص، PCR با آغازگرهای عمومی (UP-PCR) و نواحی تکثیرشده با توالی مشخص (SCAR) می‌باشد.

۴-۲-۲-۱. توالی‌یابی DNA

روش واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، از جمله روش‌هایی است که مشابه روش سنتز DNA در سلول، در شرایط آزمایشگاهی برای تکثیر DNA بکار می‌رود (Pancher et al., 2012). در این روش، کل DNA تکثیر نمی‌شود و تنها بخش خاصی از ژن در داخل کل ژنوم، ردیابی و به مقدار زیاد تکثیر می‌شود. ابتدا DNA قارچ مورد نظر، استخراج می‌گردد (Raeder & Broda, 1985; Prabha et al., 2012). سپس در شرایط آزمایشگاه، مواد اولیه ساخت DNA شامل نوکلئوتیدها، آغازگرها و شرایط فعالیت آنزیم در یک محلول مناسب و در داخل لوله‌آزمایش فراهم می‌شود. در طی چهار مرحله، در دستگاه ترموسایکلر، تعداد رشته‌های DNA به‌صورت تصاعدی افزایش می‌یابد و ژن مورد نظر به میزان کافی به تعداد میلیون‌ها نسخه تکثیر می‌شود. این چهار مرحله شامل واسرشت‌سازی، اتصال آغازگر، بسط و تولید رشته DNA و بسط‌نهایی است. در نهایت، توالی بدست‌آمده بر اساس داده‌های‌موجود در پایگاه بانک‌های اطلاعاتی ژن، نظیر NCBI[4]، DDBJ[5] و EMBL[6] مقایسه می‌شود (Watanabe et al., 2010; Zhang et al., 2010) که شناسایی دقیق‌تر را می‌توان با استفاده از نرم‌افزارهایی از قبیل MEGA، Splits Tree، UGENE و BioEdit انجام‌داد. این نرم‌افزارها امکان رسم درخت

[4] National Center for Biotechnology Information

[5] DNA Data Bank of Japan

[6] European Molecular Biology Laboratory

فیلوژنی نزدیک‌ترین خویشاوندی را با گونه‌های مشابه در پایگاه اطلاعاتی فراهم می‌نمایند.

۵. فیلوژنی

فیلوژنی مولکولی و مقایسه تکاملی بین گونه‌های نزدیک، نزدیک‌ترین روابط قارچی را تعیین و گروه‌های طبیعی را در داخل قارچ‌های حقیقی تعریف می‌کند. مارکرهای مولکولی روی بیولوژی جمعیت قارچ‌ها تأثیر داشته و به تعیین گونه‌های ناشناخته کمک می‌کنند و مشکلات موجود در بیولوژی، مورفولوژی و اکولوژی قارچ‌ها را توضیح می‌دهد (James et al., 2006). استفاده از آنالیز چند ژن در مطالعات فیلوژنیک مرسوم شده‌است (Hakizimana et al., 2011). آنالیز لوکوس‌های مختلف می‌تواند بسیاری از مشکلات فیلوژنی را بر طرف نماید (De Jong et al., 2001).

۶. بارکدگذاری DNA برای تشخیص گونه در قارچ‌ها

بارکدگذاری DNA برای شناسایی گونه‌های قارچی بر اساس توالی کوتاه یک یا چند ژن ابداع شد. به منظور ایجاد یک روش مولکولی استاندارد برای تشخیص گونه‌های یوکاریوت، پروژه بارکدگذاری حیات زنده، نخستین‌بار در دانشگاه گلف شروع شد (IBOL:www.ibol.org).

۷. نواحی ژنی مورد مطالعه

تمام ناحیه ITS در قارچ‌های آسکومیکوتا و بازیدیومیکوتا در حد متوسط ۵۰۰ الی ۶۰۰ جفت باز می‌باشد و مابقی قارچ‌ها در محدوده ۶۰۰ جفت می‌باشد (Porter & Brian Golding, 2011). **ITS** از جمله ژن‌هایی است که در قارچ‌ها برای بارکدگذاری DNA به‌طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌است (Debeeck et al., 2014). بیشتر پرایمرهایی که برای شناسایی قارچ‌ها استفاده‌شده شامل پرایمرهای ITS1، ITS2، ITS3 و ITS4 (White et al., 1990)، پرایمرهای ITS1F و ITS4B (Gardes & Bruns, 1993)، پرایمرهای ITS86F و ITS4 (Debeeck et al., 2014) و پرایمرهای ITS4 و ITS5 (Ahmed et al., 1999; Bellemain et al., 2010) بوده‌است. مطالعات زیادی در رابطه با جفت پرایمرهای نواحی ITS انجام شده‌است (Jumpponen & Jones, 2009; Tedersoo et al., 2010) تا جفت پرایمرهای مناسب را معرفی نمایند.

در تحقیقی به منظور بررسی روش‌های کلاسیک و آغازگرهای اختصاصی در ردیابی قارچ‌های اندوفیت در گیاهان علفی تیره گندمیان، بیست جدایه قارچ از چهار میزبان مرتعی جداسازی‌شد. نتایج نشان‌داد که با توجه به تفسیر دندوگرام، قارچ‌های اندوفیت در هر میزبان مشابه بودند. در این تحقیق، DNA قارچ‌های اندوفیت پس از استخراج، با استفاده از یک گروه آغازگر عمومی ITS1 و ITS4 و دو گروه آغازگر اختصاصی IS1 و IS3، طی واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شده و حضور قارچ اندوفیت *Neotyphodium sp.* در آنها مورد بررسی قرارگرفت. تمام نمونه‌ها با آغازگرهای ITS1 و ITS4 ایجاد باندی بین bp ۷۵۰-۵۵۰ نمودند که این باند براساس منابع موجود، نشانه وجود قارچ اندوفیت است. آغازگرهای 1-11 و 2-11 با برخی نمونه‌ها ایجاد باند bp ۱۰۰۰ نمودند که این باند مختص جنس *Neotyphodium sp.* است (گنجعلی و همکاران، ۱۳۸۳).

در بررسی قارچ‌های اندوفیت، با کاربرد مقایسه‌ای الگوهای PCR-RFLP مناطق ITS و ژن *5.8S* در تاکسونومی قارچ‌های اندوفیت *Neotyphodium*، قارچ‌های اندوفیت از میزبان‌های گیاهی *Festuca ovina*، *F. pratensis*، *F. arundinacea*، *Bromus tomentellus*، *Melica persica* و *Lolium prenne* جداسازی و شناسایی شد. پس از استخراج

ژنومی این جدایه‌ها، به منظور تائید حضور گونه‌های اندوفیت، از سه جفت آغازگر ITS1/ITS4، IS1I/S3 و $11_1/11_2$ استفاده گردید. نتایج حاصل از PCR نشان داد که اکثر جدایه‌های مورد استفاده در این پژوهش، از گروه قارچ‌های اندوفیت و از جنس *Neotyphodium* بودند. نتایج PCR-RFLP نشان داد که جز در چند مورد، نتایج حاصل از هضم آنزیمی با نتایج حاصل از بررسی خصوصیات مورفولوژیکی و انجام واکنش PCR با سه جفت آغازگر مذکور هم‌خوانی داشت (دهقانپور و همکاران، ۱۳۸۵).

کریمی و همکاران (۱۳۸۸) در پژوهشی مشابه، تنوع ژنتیکی قارچ‌های اندوفیت از جنس *Neotyphodium* در گندمیان *Festuca arundinacea*، *F. pratensis* و *Lolium prenne* با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP مورد بررسی قراردادند. بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، قارچ‌های اندوفیت جنس *Neotyphodium* انتخاب گردید. ترکیب آغازگری IS1/IS3 با قارچ‌های انتخابی، باند ۴۴۴ bp که اختصاصی جنس *Neotyphodium* است تکثیر نمود که موید شناسایی درست مورفولوژیک جنس قارچ‌های مورد نظر بود.

منابع

حاجی‌نیا، س.، زارع، م.، محمدی گل‌تپه، ا. و رجالی، ف. (۱۳۹۰). بررسی سودمندی قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* و باکتری *Azospirillum* sp. درافزایش تحمل گندم رقم سرداری (*Triticum aestivum*) به تنش شوری. تنش‌های محیطی در علوم زراعی، جلد ۴ (۱)، صفحات ۳۱-۲۱.

حسینی‌مقدم، م.، سلطانی، ج.، باب‌الحوائجی، ف.، حمزه‌ای، ج.، ناظری، س. و میرزایی، س. (۱۳۹۲). فعالیت‌های زیستی پنی‌سیلیوم‌های اندوفیت گیاهان خانواده سرو. بیماری‌های گیاهی، جلد ۲ (۴)، صفحات ۴۴۵-۴۳۳.

خداپرست، س.ا. (۱۳۸۹). سلسله قارچ‌ها. دانشگاه گیلان.

دهقانپور، س.، شریف‌نبی، ب. و میرلوحی، آ. (۱۳۸۵). کاربرد مقایسه‌ای الگوهای PCR-RFLP مناطق ITS و ژن *5.8S* در تاکسونومی قارچ‌های اندوفیت *Neotyphodium*. رستنیها، جلد ۷ (۱)، صفحات ۱۵-۱.

سپهری، م.، صالح‌راستین، ن.، حسینی‌سالکده، ق. و خیام‌نکویی، م. (۱۳۸۸). بررسی تأثیر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر بهبود رشد و افزایش مقاومت گیاه جو به تنش شوری. مرتع، سال ۳ (۳)، صفحات ۵۱۸-۵۰۸.

قبولی، م.، شهریاری، ف.، سپهری، م.، مرعشی، ح. و حسینی‌سالکده، ق. (۱۳۸۹). تأثیر قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* بر برخی خصوصیات جو در شرایط تنش خشکی. بوم‌شناسی کشاورزی، جلد ۳ (۳)، صفحات ۳۳۶-۳۲۸.

کریمی، س.، میرلوحی، آ.، سیدطباطبایی، ب. و شریف‌نبی، ب. (۱۳۸۸). تنوع ژنتیکی قارچ‌های اندوفیت از جنس *Neotyphodium* در سه گونه از گندمیان ایران با استفاده از نشانگرهای مولکولی AFLP. رستنیها، جلد ۱۰ (۱)، صفحات ۴۸-۳۸.

گنجعلی، ر.، شریف‌نبی، ب. و میرلوحی، آ. (۱۳۸۳). روش‌های کلاسیک و آغازگرهای اختصاصی در ردیابی قارچ‌های اندوفیت در برخی گرامینه‌های علفی. رستنیها، جلد ۵ (۱)، صفحات ۵۱-۳۷.

Ahmed, A.O., Mukhtar, M.M., Kools-Sijmons, M., Fahal, A.H., De Hoog, S., Van De Ende, B.G., Zijlstra, E.E., Verbrugh, H., El Sir, A. and Elhassan, A.M. (1999). Development of a species-specific PCR-restriction fragment length polymorphism analysis procedure for identification of *Madurella mycetomatis*. Journal of clinical microbiology 37 (10):3175-3178.

Arnold, A.E., Mejia, L.C., Kyllo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N. and Herre, E.A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. Proceedings of the national academy of sciences 100 (26):15649-15654.

Arnold, A.E. and Lutzoni, F. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes: are tropical leaves biodiversity hotspots? Ecology 88 (3):541-549.

De Beeck, M.O., Lievens, B., Busschaert, P., Declerck, S., Vangronsveld, J. and Colpaert, J.V. (2014). Comparison and validation of some ITS primer pairs useful for fungal metabarcoding studies. PLOS One 9 (6):1-11.

Deckert, R.J., Melville, L.H. and Peterson, R.L. (2001). Structural features of a *Lophodermium* endophyte during the cryptic life-cycle phase in the foliage of *Pinus strobus*. Mycological Research 105 (8):991-997.

De Jong, S.N., Levesque, C.A., Verkley, G.J., Abeln, E.C., Rahe, J.E. and Braun, P.G. (2001). Phylogenetic relationship among *Neofabraea* species causing tree cankers and bull's-eye rot of apple based on DNA sequencing of ITS nuclear rDNA, mitochondrial rDNA and the β-tubulin gene. Mycological Research 105 (6):658-669.

Douanla-Meli, C., Langer, E. and Mouafo, F.T. (2013). Fungal endophyte diversity and community patterns in healthy and yellowing leaves of *Citrus limon*. Fungal Ecology 6 (3):212-222.

Duong, L.M, Jeewon, R., Lumyong, S. and Hyde, K.D. (2006). DGGE coupled with ribosomal DNA gene phylogenies reveal uncharacterized fungal phytotypes. Fungal Diversity 23 (1):121-138.

Fisher, P., Petrini, O. and Scott, H.L. (1992). The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). New Phytologist 122 (2):299-305.

Foyer, C.H. and Shigeoka, S. (2011). Understanding oxidative stress and antioxidant functions to enhance photosynthesis. Plant physiology 155 (1):93-100.

Freeman, S. and Rodriguez, R.J. (1993). Genetic conversion of a fungal plant pathogen to a nonpathogenic, endophytic mutualist. Science 260:75-78.

Gao, X.X., Zhou, H., Xu, D.Y., Yu, C.H., Chen, Y.Q. and Qu, L.H. (2005). High diversity of endophytic fungi from the pharmaceutical plant, *Heterosmilax japonica* Kunth revealed by cultivation-independent approach. FEMS Microbiology letters 249 (2):255-266.

Gardes, M. and Bruns, T.D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rust. Molecular Ecology 2 (2):113-118.

Ghimire, S.R., Charlton, N.D., Bell, J.D., Krishnamurthy, Y.L. and Craven, K.D. (2011). Biodiversity of fungal endophyte communities inhabiting switchgrass (*Panicum virgatum* L.)

Bacon, C. and White, J. (1994). Biotechnology of endophytic fungi of grasses. CRC press, Inc. 47-56.

Bajaj, R., Hu, W., Huang, Y., Chen, S., Prasad, R., Varma, A. and Bushley, K.E. (2015). The beneficial root endophyte *Piriformospora indica* reduces egg density of the soybean cyst nematode. Bio Control. 90:193-199.

Barrow J.R. (2003). A typical morphology of dark septate fungal root endophytes of *Bouteloua* in arid southwestern USA rangelands. Mycorrhiza 13:239-247.

Belesky, D.P. and Fedders, J.M. (1995). Tall fescue development in response to *Acremonium coenophialum* and soil acidity. Crop sci. 35:529-553.

Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P. and Kauserud, H. (2010). ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an *in silico* approach reveals potential PCR biases. BMC Microbiology 10:189.

Berbee, M.L. and Taylor, J.W. (2001). Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time. Systematics and Evolution, Springer, pp. 229-245.

Berg, G., Roskot, N., Steidle, A., Eberl, L., Zock, A. and Smalla, K. (2002) Plant-dependent genotypic and phenotypic diversity of antagonistic rhizobacteria isolated from different *Verticillium* host plants. Appl Environ Microbiol 68:3328-3338.

Brum, M.C., Araujo, W.L., Maki, C.S. and Azevedo, J.L. (2012). Endophytic fungi from *Vitis labrusca* L. (Niagara Rosada) and its potential for the biological control of *Fusarium oxysporum*. Gen. Mol. Res. 11 (4):4187-4197.

Burgess, T., Wingfield, M.J. and Wingfield, B.W. (2001). Simple sequence repeat markers distinguish among morphotypes of *Sphaeropsis sapinea*. Applied and Environmental Microbiology 67 (1):354-362.

Caldwell, B.A., Jumpponen, A. and Trappe, J.M. (2000). Utilization of major detrital substrates by dark-septate, root endophytes. Mycologia 92:230-232.

Carroll, G.C. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology 69:2-9.

Carroll, G.C. (1999). The foraging Ascomycete. XVI International Botanical Congress, St Louis, MN.

Cohen, S.D. (2004). Endophytic-host selectivity of *Discula umbrinella* on *Quercus alba* and *Quercus rubra* characterized by infection, pathogenicity and mycelial compatibility. Eur J Plant Pathol 110:713-721.

crucial for symbiotic fungal and bacterial entry into plant roots. Nature 433:527-531.

James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E. and Miadlikowska, J. (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. Nature 443 (7113):818-822.

Johnson, M., Pirone, T., Siegel, M. and Varney, D. (1982). Detection of *Epichloe typhina* in tall fescue by means of enzyme-linked immunosorbent assay. Phytopathology 72 (6):647-650.

Johnson, J. and Whitney, N. (1992). Isolation of fungal endophytes from black spruce (*Picea mariana*) dormant buds and needles from New Brunswick, Canada. Canadian Journal of Botany 70 (9):1754-1757.

Jumpponen, A. and Jones, K. (2009). Massively parallel 454 sequencing indicates hyperdiverse fungal communities in temperate *Quercus macrocarpa* phyllosphere. New Phytologist 184 (2):438-448.

Keeling, P.J. (2003). Congruent evidence from α-tubulin and β-tubulin gene phylogenies for a zygomycete origin of microsporidia. Fungal Genetics and Biology 38 (3):298-309.

Khastini, R.O., Ohta, H. and Narisawa, K. (2012). The role of a dark septate endophytic fungus, *Veronaeopsis simplex* Y34, in *Fusarium* disease suppression in Chinese cabbage. The microbiology. 50 (4):618-624.

Kobayashi, D.Y. and Palumbo, J.D. (2000). Bacterial endophytes and their effects on plants and uses in agriculture. In: Bacon C.W., White J.F. (eds) Microbial endophytes. Dekker, New York, pp199-236.

Koko, T.W., Stephenson, S.L., Bahkali, A.H. and Hyde, K.D. (2011). From morphology to molecular biology: can we use sequence data to identify fungal endophytes? Fungal Diversity 50 (1):113-120.

Kubicek, C.P. and Druzhinina, I.S. (2007). Environmental and microbial relationships. The mycota IV. Springer Berlin Heidelberg NewYork, pp. 215.

Kumar, D.S. and Hyde, K.D. (2004). Biodivrsity and tissue-recurrence of endophytic fungi in *Tripterygium wilfordii*. Fungal Divers 17:69-90.

Lana, T., Azevedo, J., Pomella, A., Monteiro, R., Silva, C. and Araujo, W. (2011). Endophytic and pathogenic isolates of the cacao fungal pathogen *Moniliophthora perniciosa* (Tricholomataceae) are growing in the native tallgrass prairie of northern Oklahoma. Fungal Diversity 47 (1):19-27.

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

Gotz, M., Nirenberg, H., Krause, S., Wolters, H., Draeger, S., Buchner, A., Lottmann, J., Berg, G. and Smalla, K. (2006). Fungal endophytes in potato roots studied by traditional isolation and cultivation-independent DNA-based methods. FEMS microbiology ecology 58 (3):404-413.

Gou, L.D., Hyde, K.D. and Liew, E.C. (1998). A method to promote sporulation in palm endophytic fungi. Fungal Diversity 1:109-113.

Gou, L.D., Hyde, K.D. and Liew, E.C. (2001). Detection and taxonomic placement of endophytic fungi within frond tissues of *Livistona chinensis* based on rDNA sequences. Molecular phylogenetics and evolution 20 (1):1-13.

Hakizimana, J., Gryzenhout, M., Coutinho, T. and Van Den Berg, N. (2011). Endophytic diversity in *Persea americana* (avocado) trees and their ability to display biocontrol activity against *Phytophthora cinnamomi*. Proceeding VII World Avocado Congress, Cairns, Australia, pp. 1-10.

Hallmann, J., Quadt-Hallmann, A., Mahaffee, W.F. and Kloepper, J.W. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. Can J Microbiol 43:895-914.

Hallmann, J., Berg, G. and Schulz, B. (2006). Isolation procedures for endophytic microorganisms. Microbial Root Endophytes. Schulz B.E., Boyle C.C. and Sieber T., Springer Berlin Heidelberg. 9:299-319.

Hiatt, E., Hill, N., Bouton, J. and Mims, C. (1997). Monoclonal antibodies for detection of *Neotyphodium coenophialum*. Crop Science 37 (4):1265-1269.

Huang, W., Cai Y., Hyde, K., Corke, H. and Sun, M. (2008). Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese **medicinal plants. Fungal divers 33:61-75.**

Hyde, K. and Soytong, K. (2008). The fungal endophyte dilemma. Fungal Divers 33:163-173.

Imaizumi-Anraku, H., Takeda, N., Charpentier, M., Perry, J., Miwa, H., Umehara, Y., Kouchi, H., Murakami, Y., Mulder, L., Vickers, K., Pike, J., Downie, J.A., Wang, T., Sato, S., Asamizu, E.E., Tabata, S., Yoshikawa, M., Murooka, Y., Wu, G., Kawaguchi, M., Kawasaki, S., Parniske, M. and Hayashi, M. (2005). Plastid proteins

grasses and woody plants. APS, St Paul, MN, pp87-100.

Porter, T.M. and Brian Golding, G. (2011). Are similarity or phylogeny based methods more appropriate for classifying internal transcribed spacer (ITS) metagenomics amplicons? New Phytologist 192 (3): 775-782.

Postma, J.W., Olsson, P.A., Falkengren-Grerup, U. (2007). Root colonisation by arbuscular mycorrhizal, fine endophytic and dark septate fungi across a pH gradient in acid beech forests. Soil biology and biochemistry, 39:400-408.

Prabha, T., Revathi, K., Vinod, M., Shanthakumar, S. and Bernard, P. (2012). A simple method for total genomic DNA extraction from water moulds. Curr. Sci. 104:345-347.

Raeder, U. and Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. Letters in Applied Microbiology 1 (1):17-20.

Reinhold-Hurek, B. and Hurek, T. (1998). Life in grasses: diazotrophic endophytes. Trends Microbiol 6:139-144.

Rhocha, A.C., Garcia, D., Uetanabaro, A.P., Carneiro, R.T., Araujo, I.S., Mattos, C.R. and Goes-Neto, A. (2011). Foliar endophytic fungi from *Hevea brasiliensis* and their antagonism on *Microcyclus ulei*. Fungal Diversity 47 (1):75-84.

Saha, D., Jackson, M. and Johnson-Cicalese, J. (1988). A rapid staining method for detection of endophytic fungi in turf and forage grasses. Phytopathology 78 (2):237-239.

Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium and Fungal Barcoding Consortium Author List (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal Dna barcode marker for Fungi. PNAS 109 (16):6241-6246.

Schulz, B., Boyle, C., Draeger, S., Römmert, A.K. and Krohn, K. (2002). Endophytic fungi: a source of biologically active secondary metabolites. Mycol Res 106:996-1004.

Schulz, B. and Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. Mycol Res 109:661-687.

Schulz, B. and Boyle, C. (2006). What are Endophytes? Soil biology, Volume 9, pp 1-13.

Sieber, T.N. (2002). Fungal root endophytes In: Waisel Y, Eshel A, Kafkafi U (eds) The hidden half. Dekker, NewYork, pp 887-917.

Smalla, K., Wieland, G., Buchner, A., Zock, A., Parzy, J., Roskot, N., Heuer, H. and Berg, G. (2001). Bulk and rhizosphere soil bacterial indistinguishable based on genetic and physiological analysis. Gen. Mol. Res. 10:326-334.

Lapopin, L. and Franken, P. (2000). Modification of plant gene expression. In: Kapulnik Y., Douds D.D. (eds) Arbuscular mycorrhizas: physiology and function. Kluwer, Dordrecht, pp69-84.

Leuchtman, A. and Schardl, C. (1998). Mating compatibility and phylogenetic relationships among two new species of *Epichloe* and other congeneric European species. Myco. Res. 102:1169-1182.

Li, T., Liu, M.J., Zhang, H.B., Sha, T. and Zhao, Z.W. (2011). Improved tolerance of maize (*Zea mays* L.) to heavy metals by colonization of a dark septate endophyte (DSE) *Exophiala pisciphila*. Science of the total environment. 409:1069-1074.

Liang, Y., Guo, L.D. and Ma, K.P. (2005). Population genetic structure of an ectomycorrhizal fungus Amanita manginiana in a subtropical forest over two years. Mycorrhiza 15 (2):137-142.

Lucero, M.E., Unc, A., Cooke, P., Dowd, S. and Sun, S. (2011). Endophyte microbiome diversity in micropropagated *Atriplex canescens* and *Atriplex torreyi* var griffithsii. PLOS One 6 (3):1-12.

Marshall D., Tunali B. and Nelson L. (1999) Occurrence of fungal endophytes in species of wild *Triticum*. Crop sci. 39:1507-1512.

Martin, F., Duplessis, S., Ditengou, F., Lagrange, H., Voiblet, C. and Lapeyrie, F. (2001). Developmental cross talking in the ectomycorrhizal symbiosis: signals and communication genes. New Phytol 151:145-154.

Mirabella, R., Franssen, H. and Bisseling, T. (2002). LCO signalling in the interaction between rhizobia and legumes In: Scheel D., Wasternack C. (eds) Plant signal transduction. Oxford University Press, Oxford, New York, pp250-271.

Naik, B.S., Shashikala, J. and Krishnamurthy, Y. (2008). Diversity of fungal endophytes in shrubby medicinal plants of Malnad region, Western Ghats, Southern India. Fungal Ecology 1 (2):89-93.

Pancher, M., Ceol, M., Corneo, P.E., Longa, C.M., Yousaf, S., Pertot, I. and Campisano, A. (2012). Fungal endophytic communities in grapevines (*Vitis vinifera* L.) respond to crop management. Appl. Environ. Microbiol. 78 (12):4308-4317.

Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In: Andrews J., Hirano S. (eds) Microbial ecology of leaves. Springer, New York Berlin Heidelberg, pp179-197.

Petrini, O. (1996). Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi In: Redlin S.C., Carris L.M. (eds) Endophytic fungi in

neotropical pioneer tree: a case study for analysing fungal environmental samples. Mycol. Res. 113 (4):432-449.

Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F. and Rehner, S.A. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. Biological Control 46 (1):72-82.

Villarreal-Ruiz, L., Anderson, I.C. and Alexander, I.J. (2004). Interaction between an isolate from the *Hymenoscyphus ericae* aggregate and roots of *Pinus* and *Vaccinium*. New Phytol 164:183-192.

Wang, J., Ren, A., Xie, F., Wie, Y. and Gao, Y. (2004). Some methods in promoting sporulation of endophytic fungi in *Lolium perenne*. Mycosystema 24 (4):590-596.

Wang, Y. and Gou, L.D. (2007). A comparative study of endophytic fungi in needles, bark and xylem of *Pinus tabulaeformis*. Canadian journal of botany 85 (10):911-917.

Watanabe, K., Motohashi, K. and Ono, Y. (2010). Description of *Pestalotiopsis pallidotheae*: a new species from Japan. Mycoscience 51 (3):182-188.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. PCR protocols: a guide to methods and applications 18:315-322.

Zhang, X., Ren, A., Ci, H. and Gao, Y. (2010). Genetic diversity and structure of *Neotyphodium* species and their host *Achnatherum sibiricum* in a natural grass-endophyte system. Microbial Ecology 59 (4):744-756.

Zhou, D. and Hyde, K. (2001). Host-specificity, host-exclusivity and host-recurrence in saprobic fungi. Mycol Res 105:1449-1457

communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant dependent enrichment and seasonal shifts. Appl Environ Microbiol 67:4742-4751.

Stone, J.K. (1987). Initiation and development of latent infections by *Rhabdocline parkeri* on Douglas-fir. Can J Bot 65:2614-2621.

Stone, J.K., Bacon, C.W. and White, J.F. (2000). An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In: Bacon C.W., White J.F. (eds) Microbial endophytes. Dekker, New York, pp3-30.

Su, Y.Y., Guo, L.D. and Hyde, K. (2010). Response of endophytic fungi of *Stipa grandis* to experimental plant function group removal in Inner Mongolia steppe China. Fungal Diversity 43 (1):93-101.

Sun, X. and Guo, L.D. (2012). Endophytic fungal diversity: review of traditional and molecular techniques. Mucology 3 (1):65-76.

Tadych, M., Bergen, M.S., Johnson-Cicalese, J., Polashock, J., Vorsa, N. and White, Jr, J.F. (2012). Endophytic and pathogenic fungi of developing cranberry ovaries from flower to maturefriut: diversity and succession. Fungal Diversity 54 (1):101-116.

Tedersoo, L., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Jairus, T., Sadam, A., Saar, I., Bahram, M., Bechem, E., Chuyong, G. and Koljalg, U. (2010). 454 Pyrosequencing and Sanger sequencing of tropical mycorrhizal fungi provide similar results but reveal substantial methodological biases. New Phytologist 188 (1):291-301.

Telenbach, C., Sumarah, M.W., Grunig, C.R. and Miller, J.D. (2013). Inhibition of *Phytophthora* species by secondary metabolites produced by the dark septate endophyte *Phialocephala europaea*. Fungal ecology. 6:12-18.

Tudzynski, B. (1997). Fungal phytohormones in pathogenic and mutualistic associations In: Carroll, G.C., Tudzynski, P. (eds) The mycota V. Springer, Berlin Heidelberg NewYork, pp167-184.

Tudzynski, B. and Sharon, A. (2002). Biosynthesis, biological role and application of fungal hormones. In: Osiewacz H.D. (ed) The mycota X Industrial applications, Springer, Berlin Heidelberg NewYork, pp 183-211.

Uren, J.M., Dalling, J.W., Gallery, R.E., Maddison, D.R., Davis, E.C., Gibson, C.M. and Arnold, A.E. (2009). Diversity and evolutionary origins of fungi associated with seeds of a