نشریه پژوهش های کاربردی زراعی
دوره۳۴- شماره ۳- پیاپند ۱۳۲ پائیز ۱۴۰۰

ارزیابی قابلیت همزیستی ارقام کلزا (*Brassica napus* L.) با قارچ اندوفیت *Pseudogymnoascus pannorum*

Association of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.) with fungal endophyte of *Pseudogymnoascus pannorum*

داود رودی[1*]، جیمز میلنر[2]، کرگ مک گیل[2]، ریچارد جانسون[3] و استوارت کارد[3]

۱. مربی سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مرکز تحقیقات کشاورزی آموزش و منابع طبیعی خراسان رضوی ، (نگارنده مسئول)
۲. دانشیار دانشگاه مسی، دانشکده علوم کشاورزی و محیط زیست، پالمرستون نورث، نیوزیلند
۳. دانشیار مرکز تحقیقات اگری سرچ، بخش تحقیقات علوفه، پالمرستون نورث، نیوزیلند

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۲۰ – شناسانهٔ برنمود رقمی: 10.22092/aj.2021.354765.1550

چکیده

رودی، د.، میلنر، ج.، مک گیل، ک.، جانسون، ر.، کارد، ا.، . ارزیابی قابلیت همزیستی ارقام کلزا (***Brassica napus* L.**) با قارچ اندوفیت *Pseudogymnoascus pannorum*
نشریه پژوهش های کاربردی زراعی دوره ۳۴ – شماره ۳- پیاپند ۱۳۲ پاییز ۱۴۰۰ صفحه: ۴۲-۳۰

استفاده از میکروارگانیسم های همزیست اندوفیتی می تواند باعث افزایش عملکرد و نیزمقاومت گیاهان به تنش‌های محیطی شود. در این مطالعه امکان همزیستی سویه ای از قارچ اندوفیتی *Pseudogymnoascus pannorum* با گیاه کلزا مطالعه شد. برای انجام این آزمایش، بذور کلزا پس از ضدعفونی با سوسپانسیونی از اسپور قارچ آغشته گردید و بذر هر رقم در داخل گلدان کشت شد و آزمایش در قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار در گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت. درصد کلونیزاسیون قارچ در دو مرحله یک برگی و سه برگی رشد به روش ایزوله کردن قارچ از ساقه کلزا اندازه گیری شد. نتایج تجزیه واریانس آماری درصد کلونیزاسیون نشان دادکه ارقام مورد مطالعه با یکدیگر تفاوت معنی داری ندارند. بیشترین و کمترین میانگین درصد کلونیزاسیون قارچ در هر دو مرحله رشد به ترتیب مربوط به هیبرید Turan با ۱۹/۹۶درصد و هیبرید Ladoga با ۱۸/۸۱ درصد بود. مقایسه میانگین درصد کلونیزاسیون ارقام مورد مطالعه در مرحله رشد یک و سه برگی با آزمون t-student جفت نشده نشان داد که اختلاف معنی دار در سطح ۹۹ درصد است. درصد کلونیزاسیون قارچ در بافت های ساقه گیاه در مرحله یک برگی ۱۷/۷۷ درصد و در سه برگی ۲۰/۴۸درصد بود. با توجه به نتایج این آزمایش که حاکی از توانایی ایجاد همزیستی گونه قارچ مورد مطالعه با کلزا می باشد، توصیه می شود اثرات این همزیستی بر افزایش مقاومت کلزا به تنش های محیطی مانند تنش سرما و نیز افزایش عملکرد ناشی از این همزیستی در تحقیقات آینده مورد مطالعه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: دامنه میزبانی، کانولا، مایه زنی بذر، همزیستی اندوفیتی .

آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: roodi_dave@yahoo.com

مقدمه:

انواعی از میکروارگانیسم هایی مانند قارچ، باکتری و ویروس قادرند در داخل اندام‌های گیاهی رشد کنند، بدون اینکه صدمه ای به بافته‌ای میزبان وارد نمایند و اثرات سودمندی بر میزبان بجا بگذارند. به چنین میکروارگانیسم ها اندوفیت (Endophyte) گفته شده و در بسیاری از گونه های گیاهی در زیست بوم های طبیعی و کشاورزی وجود دارند (Azevedo *et al.*, 2000; Card *et al.*, 2016). وجود برخی از این اندوفیت ها در بافت میزبان همراه با القای صفات مفیدی از قبیل، بهبود رشد و عملکرد گیاه، کاهش خسارت عوامل بیماری زا و آفات، تعدیل اثرات سمی فلزات سنگین و افزایش مقاومت به تنش های غیر زنده مانند تنش شوری، خشکی و تنش سرما می باشد (Azevedo *et al.*, 2000; Card *et al.*, 2015; Roodi *et al.*, 2020). بدلیل وجود چنین مزایایی، نژادهایی از قارچ ها و باکتری های اندوفیتی پتانسیل زیادی در استفاده در سیستم‌های کشاورزی دارند(Johnson *et al.*, 2013; Roodi *et al.*, 2020; Le Cocq *et al.*, 2017)). سویه هایی از این اندوفیت‌ها که از گونه های وحشی گیاهان جداسازی شده اند (میزبان اولیه)، قابلیت انتقال از طریق روشهای مختلف مایه زنی به میزبان جدید و برقراری همزیستیرا دارا می باشند (Card *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2015; Murphy *et al.*, 2018; Roodi *et al.*, 2020).روشهای مختلف انتقال اندوفیت ها به میزبان جدید شامل مایه زنی بذر، انتقال اندام‌های اندوفیت به بافت گیاهی ار طریق ایجاد زخم در بافت میزبان، مایه کوبی بستر رشد گیاه و انتقال به ریشه و انتقال از طریق محلول‌پاشی می باشد (Bressan & Borges, 2004; Latch & Christensen, 1985; Tefera & Vidal, 2009; Usuki *et al.*, 2002).البته اگر اندوفیت جداسازی شده داری میزبان اختصاصی باشد و یا توسط میزبان جدید پذیرفته نشود، امکان ایجاد این نوع همزیستی پس از انتقال از میزبان اصلی به میزبان جدید وجود ندارد (Petrini, 1996). بطور مثال قارچ های اندوفیت خانواده Clavicipitaceae مانند گونه های*Epichloë* spp. بطور اختصاصی میزبان گراس‌های مناطق معتدل و سرد می باشند و با سایر گونه های گیاهی همزیستی ایجاد نمی‌کنند (Johnson *et al.*, 2013; Card *et al.* 2016). در مقابل طیف وسیعی از قاچ های دیگر وجود دارند که میزبان اختصاصی نداشته و می‌توانند بسیاری از گونه‌های گیاهی را به میزبانی خود درآورند (Rodriguez *et al.*, 2009). بطور مثال قارچ *Beauveria bassiana* توانایی برقراری همزیستی با بسیاری از گونه‌های گیاهی مانند موز، لوبیا، قهوه، سورگوم، گندم و براسیکاها راداشته و برخی از سویه های آن پس از ایجاد همزیستی باعث افزایش مقاومت گیاه میزبان بر علیه بیماریها و آفات می شود(Gautam *et al.*, 2016; Lohse *et al.*, 2015; Tefera & Vidal, 2009;Vega, 2008; Vega *et al.*, 2009; Vidal & Jaber; 2015).

هدف از انجام این مطالعه بررسی مایه‌زنی بذر کلزا با قارچ اندوفیتی *Pseudogymnoascus pannorum* بر ایجاد همزیستی با ارقام کلزا زراعی می باشد. این سویه قارچ اندوفیتی ازاندام‌های هوایی بوته ای از گونه وحشی شلغم

روغنی (*Brassica rapa* L.) جداسازی شده است (Roodi, 2019). این گونه قارچی که ابتدا تحت نام *Geomyces pannorum* نام گذاری شد (Zhang *et al*., 2016)، از گروه قارچ‌های رشته ای متعلق به ردهAscomycota است. این قارچ در محیط رشد، دارای کلونی‌های زرد متمایل به قهوه ای و بافت پودری است که از رشد ریسه‌هایی به شکل درختواره ایجاد می شود. در نوک و امتداد این ریسه ها، هاگ‌های (کنیدی) کوچک، تک سولی و بی رنگ تشکیل می شود (Rice &Currah, 2006). این قارچ سرما دوست (psychrophile) یکی از مهمترین قارچ هایی است که از محیط های قطبی و گیاهان مقاوم به سرمای قطبی مانند جلبک دریایی *Adenocystis utricularis* و *Desmarestia anceps* جداسازی شده است و با گیاه *Colobanthus quitensis* که در نواحی قطبی به خوبی رشد می کند، رابطه همزیستی اندوفیتی دارد(Rosa *et al.,* 2010). این قارچ در درجه حرارت ۲۵ درجه رشد خوبی دارد اما رشد آن در دمای ۳۷ درجه متوقف می‌شود و قادر است در در درجه حرات های زیر صفر و حتی در درجه حرارت های ۲۰- درجه سلسیوس هم رشد نماید (Kochkina*et al*., 2007).در واکنش با درجه حرارت‌های پایین این قارچ ترکیب اسیدهای چرب ، قندها و مسیر متابولیکی خود را تغییر داده و با سرما و یخبندان مقابله میکند(Hayas, 2012; Kochkina*et al*., 2007).نشان داده شده است که *Geomyces pannorum* ترکیبات ضد میکروبی با نام جیوماسین (geomycins) تولید می‌کند که بر علیه دو گروه باکتری‌های گرم- مثبت و گرم-منفی و برخی قارچ‌های بیماری‌زا مانند *Aspergillus fumigatus* فعال است (Li *et al*., 2008; Finotti *et al*., 1996). نتایج تاثیر مایه‌زنی این قارچ بر کنترل بیماری ساق سیاه (*Leptosphaeria maculans*)در یک رقم کلزای زراعی نشان داد که این سویه اندوفیتی باعث کاهش معنی‌دار علائم بیماری درگیاه می شود (Roodi *et al*., 2021, under publication).

در صورتیکه امکان انتقال این سویه از قارچ به ارقام کلزا وجود داشته باشد و بتواند در میزبان جدید بدون هیچ گونه علائم بیماری استقرار یابد می توان از نتایج آن در طراحی و انجام آزمایشات علمی بعدی مانند بررسی مقاومت به سرما و بیماریها استفاده کرد.

مواد و روش‌ها:

برای بررسی امکان میزبانی گیاه کلزا از طریق مایه زنی بذر با قارچ*Pseudogymnoascus pannorum*، پنج رقم کلزای هیبرید با نامهای King، Ladoga، Veritas (دریافتی از شرکت DSV آلمان) و Hybrirockو Turan (دریافتی از شرکت KWS آلمان) مورد مطالعه قرار گرفتند. سویه قارچ اندوفیت مورد مطالعه توسط نویسندگان این مقاله تنها از دو بوته گونه وحشی شلغم روغنی ایزوله شده است. لذا امکان بررسی آماری درصد کلونیزاسیون در میزبان اولیه فراهم نبود. انجام مطالعه بررسی کلونیزاسیون میکروارگانیسم‌های اندوفیتی استخراج شده از میزبان اصلی بر روی میزبان ثانویه یک روش مرسوم است و توسط سایر محققین انجام می شود (Card *et al*., 2015; Murphy *et al*., 2015; Murphy *et al*., 2018;

Nejad & Johnson, 2000; Roodi *et al.*, 2020; Tefra & Vidal 2009). جهت از بین بردن میکروارگانیسم های سطحی بذر،بذور کلزا ابتدا با استفاده از محلول هیپوکلریت سدیم و الکل ضدعفونی شدند (Roodi *et al.*, 2020) و برای اطمینان از عدم وجود هر گونه قارچی در سطح بذر، بذور ضدعفونی شده به داخل پتری دیش حاوی PDA منتقل و پس از یکروز، از آن خارج و در محیط استریل بر روی کاغذ صافی استریل خشک گردید. پتری دیش مربوطه سپس در انکوباتور به مدت سه هفته در دمای ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شد و بطور روزانه رشد احتمالی هر گونه قارچی بر روی آن با میکروسوکب دو چشمی مورد بازدید قرار گرفت.سویه قارچ اندفیت *Pseudogymnoascus pannorum* که قبلا از یک گونه شلغم روغنی وحشی جدا سازی شده بود (Roodi, 2019) و در محیط گلیسرول ۲۰ درصد و در فریزر ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری می شد، بر روی محیط کشت سیب زمینی(PDA) رشد داده شد تا مقدار کافی اسپور قارچ تولید گردد. سپس سوسپانسیونی با غلظت^{۶}۱۰ اسپور قارچ در هر میلی لیتر با آب مقطر و با استفاده از اسپور شمار(Haemocytometer) تهیه شد و بذور هر رقم کلزا به مدت ۱۰ دقیقه در این محلول غوطه ور گردید. بذور شاهد (بدون مایه زنی) تنها در محلول ضدعفونی شده فاقد اسپور قارچ خیس شدند. بذور تیمار شده در محیط استریل و بر روی کاغذ صافی خشک شدند و جهت کاشت به محیط گلخانه منتقل شدند و در گلدانهایی با محیط کشت ورمی کولیت کاشته شدند. درجه حرارت گلخانه در محدوده ۲۵ درجه سلسیوس نگه داشته شد و نیاز غذایی بوته ها بصورت محلول با استفاده از بسته آماده (Thrive, Yates New Zealand) آب آبیاری اضافه می گردید.پس از جوانه زنی در داخل هر گلدان دو بوته نگه داشته شد و باقی بوته ها تنک شدند. برای هر تیمار ۸ گلدان در نظر گرفته شد و قالب طرح بلوکهای کامل تصادفی با سه تکرار انتخاب گردید.در دو مرحله رشد یک برگی و سه برگی کامل، از هر تیمار ۸ بوته انتخاب گردید، اندام‌های هوایی گیاه جدا و پس از قطع پهنک برگ، ساقه و دمبرگ با آب استریل شستشو و سپس ضدعفونی شدند. برای اینکار از محلول هیپوکلرید سدیم یک درصد (۵ دقیقه غوطه‌وری) و اتانول ۷۰ درصد (دو دقیقه غوطه‌وری)و سپس شستشو با آب استریل استفاده شد (Roodi, 2019). هر یک از ساقه‌های ضدعفونی شده پس از خشک شدن در محیط استریل به ۱۵ قطعه کوچه (۱-۲ میلیمتر) تقسیم و قطعات ریز به محیط کشت PDA منتقل شد و برای سه هفته در انکوباتور با دمای ۲۲ درجه سلسیوس منتقل گردید. در طی این مدت تعداد قطعاتی که قارچ مایه کوبی شده بر روی آن رشد نمودند، شمارش شده و با فرمول زیر درصد کلونیزاسیون بافت Tissue Colonization (Frequency)) محاسبه گردید (Tefera & Vidal, 2009)

$$\text{درصد کلونیزاسیون بافت} = \frac{\text{تعداد قطعات آلوده به قارچ}}{\text{تعداد قطعات ارزیابی شده}}$$

برای نرمال کردن توزیع آماری داده ها، اعداد بدست آمده ابتدا به فرم تبدیل درجه‌ای

تغییر یافتند و سپس با نرم افزارMstat-c تجزیه واریانس آماری شدند. مقایسه میانگین درصد کلونیزاسیون بافت ساقه مرحله رشد یک و سه برگی با آزمون t-student جفت نشده و با سطح احتمال خطای ۱ درصد و با احتساب برابری واریانس دو گروه با نرم افزارExcel۲۰۱۳ انجام شد.

شناسایی قارچ رویش یافته بر روی قطعات ساقه بامطالعه ساختار مورفولوژیکی قارچ و استفاده از میکروسکوپ نوری و مقایسه آن با ساختار مورفولوژیکی قارچ اصلی انجام گرفت. جهت مطالعه میکروسکوپی نفوذ و گسترش ریسه قارچ در داخل بافت گیاهی، بذور کلزا پس از ضدعفونی و مایه کوبی با اسپور قارچ با روشی که قبلا توضیح داده شد به محیط کشت استریل محتوی ورمی کولیت مرطوب و حاوی عناصر غذایی منتقل شد و در در اتاقک رشد با درجه حرارت ۲۲ درجه سسیوس و ۱۶ ساعت روشنایی قرار داده شد. در مرحله رشد یک برگی ساقه جدا گردید، پوسته رویی کنده شد و پس از رنگ آمیزی با محلول حاوی یک قسمت آب، یک قسمت لاکتیک اسید ، یک قسمت گلیسرول و۰/۱ درصد آنالین بلو (Aniline blue) با میکروسکوپ نوری المپیوس (BX50, Olympus, New Zealand Pty Ltd) مشاهده و با دوربین Olympus ColorView II digital camera و نرم افزار AnalySIS 3.00 image-analysis تصویربرداری شد. جهت مشاهده و شناسایی میکروسکوپی قارچ نفوذ یافته در ساقه،تکه ای از ساقه نیز داخل پتری دیش محتوی کشت سیب زمینی (PDA) قرار داده شد و در انکوباتور با درجه حرارت ۲۲ درجه سلسیوس به مدت سه هفته نگهداری شد.

نتایج و بحث:

نتایج این آزمایش نشان داد که سویه قارچ اندوفیت *Pseudogymnoascus pannorum* مورد مطالعه قادر به کلونیزه کردن بافت اندام هوایی ارقام (هیبرید) کلزا میباشد بطوریکه رشد قارچ از روی قطعات بریده شده اندام‌هایی هوایی گیاهچه‌های کلزا که با قارچ مورد مطالعه تلقیح شده بودند و بر روی محیط کشت به مدت دو هفته در انکوباتور قرار داده شدند، کاملا مشهود بود. در صورتیکه رشد قارچ مزبور در داخل بافت گیاهی بوته هایی که مایه کوبی نشده بودند، مشاهده نشد.(شکل ۱).

داده های حاصل از درصد کلونیزاسیون این قارچ در بافت‌های هوایی ارقام کلزای مورد مطالعه که میزان همزیستی این قارچ با میزبان را نشان می دهد، حاکی از میزبان پذیری مناسب این ارقام با قارچ اندوفیت مورد مطالعه است (جدول ۱). همانگونه که در تعریف قارچ اندوفیت آمده است، نفوذ این قارچ نباید باعث ایجاد تورم، زخم و یا هرگونه علامتی در بافتهای میزبان شود و یا منجر به بروز علائم بیماری گردد (Azevedo *et al.*, 2000). مشاهدات حاصل از مایه کوبی ارقام کلزا با این قارچ در طی آزمایش نشان داد که این قارچ باعث بروز هیچ گونه علائم ظاهری و یا بیماری نشد و تمامی گیاهان حاصل از مایه کوبی ظاهری سالم داشتند (شکل ۲). لذا اندوفیت مورد مطالعه که در ابتدا میزبان یک گونه وحشی شلغم می باشد، می تواند میزبان ارقام کلزا نیز باشد.

شکل ۱. ظهور اندام های میسلیوم قارچ *Pseudogymnoascu spannorum* حاصل از قطعات بریده شده اندام های هوایی گیاهچه کلزای تلقیح شده به قارچ بر روی محیط کشت (سمت چپ) و عدم ظهور آن در گیاهچه های تلقیح نشده .

Figure 1. Presence of mycelium of *Pseudogymnoascus pannorum* fungus on growth media derived from the cuts of above-ground tissues of inoculated oilseed rape (left) and lack of their presence in non-inoculated ones(right).

نتیجه تجزیه واریانس داده های درصد کلونیزاسیون در مرحله رشد یک برگی و سه برگی کلزا به درجدول۲ آورده شده است. این نتایج نشان می دهد که ارقام کلزای مورد مطالعه تفاوتی از نظر میزان میزبانی با قارچ اندوفیت *Pseudogymnoascus pannorum* ندارند و تفاوت آماری معنی داری مشاهده نشد. میانگین درصد میزبانی قارچ در بافت اندامهای

شکل ۲. عدم ظهور علائم بیماری بر روی اندام های هوایی گیاهان کلزاحاصل از تلقیح با قارچ *Pseudogymnoascus pannorum*

Figure 2. Lack of any visible signs and symptoms of plant disease on above-ground parts of oilseed rape seedlings inoculated with *Pseudogymnoascus pannorum*

هوایی ارقام کلزای مورد مطالعه در مرحله رشد یک و سه برگی مطالعه در جدول ۱ نشان داده شده است. در بین این ارقام، هیبرید Turan با ۱۹/۹۶ درصد و هیبرید Ladoga با ۱۸/۸۱درصد به ترتیب بیشترین و کمترین میزان کلونیزاسیون بافت را با قارچ اندوفیت مورد مطالعه داشتند. بررسی آماری درصدکلونیزاسیون میزبان اولیه توسط این قارچ انجام نشده است اما مشاهدات چشمی حاصل از ایزولاسیون قارچ مورد مطالعه از میزبان اصلی نشان داد که قارچ اندوفیت مورد مطالعه تقریبا از تمام قسمت‌های بریده شدهبافتهای گونه میزبان اصلی،که در محیط کشت سیب زمینی پرورش داده شد، استخراج شد. بر خلاف قارچ‌های اندوفیت خانواده Clavicipitacea که دارای میزبان اختصاصی می باشند، همانند قارچ اندوفیت گونه‌های *Epichloë* spp. که میزبان اختصاصی گراس‌های مناطق معتدله هستند، نشان داده شده است که برخی از قارچ‌های اندوفیت غیر از خانواده Clavicipitacea توانایی همزیستی با چندین میزبان را دارند. (Rodriguez *et al.*, 2009). بطور مثال، قارچ اندوفیت *Beauveria bassiana* توانایی ایجاد همزیستی با میزبان‌های از قبیل کلزا، لوبیا، سورگوم و گندم را دارد(Gautam *et al.*, ۲۰۱۶; Lohse *et al.*, ۲۰۱۵; Tefera & Vidal, ۲۰۰۹; Vega*et al.*, ۲۰۰۸; Vega *et al.*, ۲۰۰۹; Vidal &Jaber, ۲۰۱۵). همچنین قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* که یک قارچ شبه مایکوریزا می باشد و از دو گونه گیاهی *Prosopis juliflora* و *Zizyphus nummularia* جدا سازی شده است، قادر به ایجاد رابطه همزیستی با ریشه بسیاری از گونه‌های گیاهی می باشد(Johnson *et al.*, 2014). با این وجود، عواملی دیگری نیز در ایجاد ارتباط میزبانی

جدول ۱- میانگین درصد کلونیزاسیون بافت های هوایی ارقام کلزا به قارچ اندوفیت *Pseudogymnoascus pannorum* در مراحل مختلف رشد.

Table 1. The mean percentage of above-ground tissue colonization frequency (TCF) of oilseed rape cultivars as infected by the endophytic fungus of *Pseudogymnoascus pannorum* at different growth stages

تیمار		درصد کلونیزاسیون بافت
Treatment		Tissue colonization frequency (%)
رقم Cultivar	Ladoga	18.81
	Veritis	18.57
	Hybricok	19.14
	Turan	19.96
	King	18.93
مرحله رشد Growth stage	یک برگی One-leaf stage	17.77
	سه برگی Three-leaf stage	20.48

جدول ۲- تجزیه واریانس درصد فراوانی کلونیزاسیون بافت های هوایی کلزای به قارچ اندوفیت *Pseudogymnoascus pannorum*در مرحله یک برگی و سه برگی رشد.

Table 2. Analysis of variance for the percentage of above-groundtissue colonization frequency (TCF) of evaluated oilseed rapes as infected by the endophytic fungus of *Pseudogymnoascus pannorum*at one and three-leaf growth stage.

منابع تغییر Source of variation	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین مربعات Mean squares	
		مرحله یک برگی One-leaf stage	مرحله سه برگی Three-leaf stage
تکرار Replication	2	0.846^{ns}	2.135^{ns}
رقم Cultivar	4	0.186^{ns}	0.807^{ns}
خطا Error	8	2.063	2.711
کل Total	18	1.353	2.085
ضریب تغییرات (%) Coefficient of variation (%)		14.02	14.05

ns : عدم تفاوت معنی دار

ns: non-significant

جدید با قارچ اندوفیت استخراج شده از میزبان اولیه وجود دارد. از جمله این موارد می توان به بستر رشد ریشه، نوع بافت گیاهی و روش مایه کوبی اشاره کرد (Tefera & Vidal, 2009; Truyens *et al.*, 2015). میانگین کلونیزاسیون در مرحله رشدی یک برگی بافت‌های هوایی ارقام کلزا ۱۷/۷۷ درصد و در مرحله سه برگی ۲۰/۴۸ درصد بود(جدول ۱) که با توجه به نتیجه آزمون t-student (مقایسه میانگین دو نمونه با واریانس‌های برابر و سطح احتمال ۹۹٪) باهمدیگر تفاوت معنی‌داری دارند (جدول ۳). این بدین معنی است که با افزایش رشد گیاه درصد نفوذ قارچ به بافت‌ها بیشتر می شود.

مشاهدات میکروسکوبی بافت داخلی ساقه گیاه نیز موید نفوذ و استقرار ریسه یا هیف (Hyphae) قارچ اندوفیت در داخل بافت گیاه است. همانگونه که در شکل یک مشاهده می‌شود ریسه (هیف) قارچ در داخل بافت گیاهی و در فضای بین سلولی لایه زیر اپیدرم نفوذ و گسترش یافته و بافت گیاه را اشغال می‌نماید. رویش میسلیوم قارچ از محل برش قطعه ساقه که در محیط کشت قرار داده شده بود نیز بوسیله دوربین دو چشمی کاملا مشهود بود که حاکی اشغال بودن بافت ساقه به قارچ

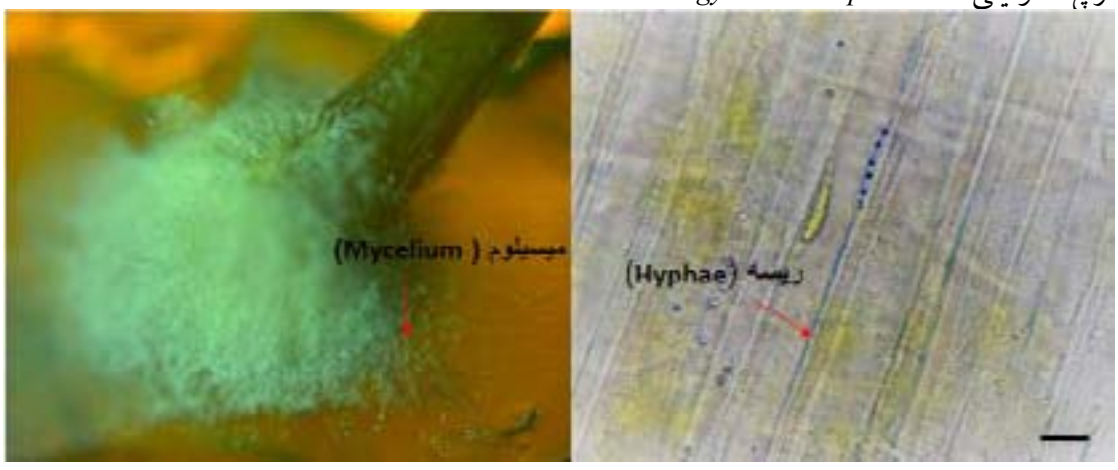
جدول ۳- نتایج حاصل از آزمون t-testدر سطح یک درصد برای مقایسه درصد کلونیزاسیونبافت های هوایی کلزای به قارچ اندوفیت *Pseudogymnoascus pannorum* در مرحله یک برگی و سه برگی رشد.

Table 3. Results of t-student (α=0.01) for the comparison of the percentage of above-ground tissue colonization frequency (TCF) of evaluated oilseed rape as infected by the endophytic fungus of *Pseudogymnoascus pannorum*at one and three-leaf growth stage.

گروه مقایسه Compared group	درجه آزادی Degree of freedom	میانگین Mean	انحراف معیار Standard of deviation	آماره t t-value	سطح معنی داری P-value
یک برگی One-leaf stage	14	17.78	2.001	3.071	0.004
سه برگی Three-leaf stage	14	20.31	2.468		

اندوفیت مورد مطالعه است (شکل ۳). شکل ظاهری قارچ رشد یافته از قطعه ساقه کلزا مایه کوبی شده بر روی محیط کشت سیب‌زمینی (PDA) وساختار میکروسکوپی مورفولوژی آن توسط میکروسکوپ نوری بررسی شد که مشابهت کامل با قارچ *Pseudogymnoascus pannorum* مورد مطالعه دارد (شکل ۴).

این مطالعه اولین تحقیقی است که میزبانی قارچ اندوفیتی P*seudogymnoascus pannourm* را بررسی می کند. این قارچ اندوفیتی که اولین بار از برگ‌های یک گونه دولپه‌ای *Colobanthus quitensis* بسیار مقاوم به سرما که در مناطق قطبی زندگی می کند، جداسازی شده است (Rosa *et al.*, 2010) در برگ‌های یک گونه سوزنی برگ بنام *Pinusmonticola* نیز دیده شده است. گزارش شده است که گونه های قارچی متعلق به جنس *Pseudogy mnoascus* (مترادف *Geomyces*) درای مواد متابولیکی منحصر به



شکل ۳. میسلیوم قارچ *Pseudogymnoascus pannorum* حاصل از ساقه گیاهچه کلزای تلقیح شده به قارچ بر روی محیط کشت (سمت چپ) و مشاهده نفوذ ریسه قارچ در لایه زیر اپیدرم ساقه (خط مقیاس ۲۰ میکرون)

Figure 3. Presence of mycelium of *Pseudogymnoascus pannorum* fungus on growth media derived from the cuts of inoculated oilseed rape stem (left) and extension of unbranched hypha (right)inside epidemical layer of inoculated oilseed rape stem (bar 20 µm).

شکل ۴. شکل ظاهری قارچ *Pseudogymnoascus pannorum* رشد یافته از قطعه ساقه کلزا مایه کوبی شده بر روی محیط کشتسیب زمینی (PDA) و ساختار موروفولوژیکی آن در زیر میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۴۰۰ برابر (مقیاس ۱۰ میکرون).

Figure 4. Culture morphology of *Pseudogymnoascus pannorum*isolated from a stem piece of inoculated oilseed rape stem on PDA (left) andits structural morphology (right) under 400x magnification light microscope (bar 10 µm).

فردی هستند که بقاء آنها در مناطق سرد قطبی را ممکن می سازد (Vohník *et al.*, 2007). آنها همچنین در شرایط کاهش درجه حرارت محیط قادر به تغییر مسیر متابولیکی و ترکیب اسیدهای چرب می باشند تا بتوانند شرایط سرد را بخوبی تحمل نمایند (Hayes, 2012) از آنجاییکه قارچ های اندوفیتی قادر به ایجاد صفاتی مانند افزایش تحمل به تنش‌های زنده و غیر زنده در میزبان خود از جمله خانواده براسیکا هستند(Card *et al.*, 2015)، ایجاد همزیستی بین قارچ *Pseudogymnoascus pannourm* ممکن است باعث افزایش تحمل به سرما در کلزای زمستانه بخصوص در مراحل اولیه رشد شود و آنرا از خطر سرمازدگی در شرایطی که با تاخیر در تاریخ کاشت مواجه گردد، محافظت کند. نتایج مطالعه حاضر امکان بررسی و مطالعات بیشتر در آینده را در این زمینه فراهم می آورد.

قدردانی:

این مطالعه با حمایت سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی ایران و منابع مالی و آزمایشگاهی دانشگاه مسی و مرکز تحقیقات کشاورزی اگری سرچ نیوزیلند انجام شده است.

References:

Azevedo, J. L., Maccheroni, J.R.W., Pereira, J.O.,and de Araújo, W.L. 2000. Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. *Electronic Journal of Biotechnology,*3: 15-16.

Bressan, W.,and Borges, M.T. 2004. Delivery methods for introducing endophytic bacteria into maize. *BioControl,*49: 315-322.

Card, S., Johnson, L., Teasdale, S.,and Caradus, J. 2016. Deciphering endophyte behaviour: the link between endophyte biology and efficacious biological control agents. *FEMS Microbiolgy Ecology,*92(8).

Card, S.D., Hume, D.E., Roodi, D., McGill, C.R., Millner, J.P.,and Johnson, R.D. 2015. Beneficial endophytic microorganisms of Brassica – A review. *Biological Control*90: 102-112.

Finotti, E., Paolino, C., Lancia, B., and Mercantini, R. 1996. Metabolic differences between two Antarctic strains of *Geomyces pannorum*. *Current Microbiology*, 32(1), 7-10.

Gautam, S., Mohankumar, S.,and Kennedy, J. 2016. Induced host plant resistance in cauliflower by *Beauveria bassiana*. *Journal of Entomology and Zoology Studies*4: 476-482.

Hayes, M.A. 2012. The Geomyces Fungi: Ecology and Distribution. *Bioscience*62: 819-823.

Johnson, J.M., Alex, T.,and Oelmüller, R. 2014.*Piriformospora indica*: The versatile and multifunctional root endophytic fungus for enhanced yield and tolerance to biotic and abiotic stress in crop plants. *Journal of Tropical Agriculture,*52: 103-122.

Johnson, L.J., de Bonth, A.C.M., Briggs, L.R.*, et al.,*.2013. The exploitation of epichloae endophytes for agricultural benefit. *Fungal Diversity,*60: 171-188.

Kochkina, G. A., Ivanushkina, N. E., Akimov, V. N., Gilichinskii, D. A., and Ozerskaya, S. M. 2007. Halo-and psychrotolerant Geomyces fungi from Arctic cryopegs and marine deposits. Microbiology, 76(1), 31-38.

Latch, G.and Christensen, M. 1985. Artificial infection of grasses with endophytes. *Annals of Appiedl Biology,*107: 17-24.

Le Cocq, K., Gurr, S.J., Hirsch, P.R.,and Mauchline, T.H. 2017. Exploitation of endophytes for sustainable agricultural intensification. *Molecular Plant Pathology,*18: 469-473.

Lohse, R., Jakobs-Schönwandt, D., Vidal, S.,and Patel, A.V. 2015. Evaluation of new fermentation and formulation strategies for a high endophytic establishment of *Beauveria bassiana* in oilseed rape plants. *Biological Control,*88: 26-36.

Murphy, B.R., Doohan, F.M.,and Hodkinson, T.R. 2015. Fungal root endophytes of a wild barley species increase yield in a nutrient-stressed barley cultivar. *Symbiosis*, 65: 1-7.

Murphy, B.R., Hodkinson, T.R., and Doohan, F.M. 2018. Endophytic Cladosporium strains from a crop wild relative increase grain yield in barley. In Biology and Environment.*Proceedings of the Royal Irish Academy,* 118(3): 147-156. Royal Irish Academy (2018, January).

Nejad, P.,and Johnson, P.A. 2000. Endophytic bacteria induce growth promotion and wilt disease suppression in oilseed rape and tomato. *Biological Control,*18: 208-215.

Petrini. O. 1996. Ecological and physiological aspects of host specificity in endophytic fungi. 87-100. St Louis, USA.

Rice, A.V., and Currah, R.S. 2006. Two new species of *Pseudogymnoascus* with *Geomyces* anamorphs and their phylogenetic relationship with Gymnostellatospora. Mycologia, 98(2): 307-318.

Rodriguez, R.J., White, J.Rr. J.F., Arnold, A.E.,and Redman, R.S. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist,*182: 314-330.

Roodi, D., Millner, J.P., McGill, C.R., Johnson, R.D., Jauregui, R.,and Card, S.D.2020. Methylobacterium, a major component of the culturable bacterial endophyte community of wild Brassica seed. *PeerJ*. 2020(7), doi: 10.7717/peerj.9514.

Roodi, D., Millner, J.P., McGill, C.R., Johnson, R.D.,and Card, S.D. 2019.*Bio-prospecting of endophytes of Brassica*. PhD dessertation. Faculty of plant science, Massey University. Palmerston North. New Zealand.

Rosa, L.H., Almeida, Vieira. Md.L., Santiago, I.F.,and Rosa, C.A. 2010. Endophytic

fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl. (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology,*73: 178-189.

Tefera, T.,and Vidal, S. 2009. Effect of inoculation method and plant growth medium on endophytic colonisation of sorghum by the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *BioControl,*54: 663-669.

Truyens, S., Beckers, B., Thijs, S., Weyens, N., Cuypers, A.,and Vangronsveld, J. 2015. The effects of the growth substrate on cultivable and total endophytic assemblages of Arabidopsis thaliana. *Plant and Soil,*405: 325-336.

Usuki, F., Narisawa, K., Yonezawa, M., Kakishima, M.,and Hashiba, T. 2002. An efficient inoculation method for colonisation of Chinese cabbage seedlings by the root endophytic fungus *Heteroconium chaetospira*. *Journal of General Plant Pathology,*68: 326-332.

Vega, F.E. 2008. Insect pathology and fungal endophytes. *Journal of Invertebrate Pathology,*98: 277-279.

Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M.*, et al.* 2009. Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology,*2: 149-159.

Vidal, S.,and Jaber, L.R. 2015. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Current Science,* 45-54.

Vohník, M., Fendrych, M., Albrechtová, J.,and Vosátka, M. 2007. Intracellular colonisation of *Rhododendron* and *Vaccinium* roots by *Cenococcum geophilum*, *Geomyces pannorum* and *Meliniomyces variabilis*. *Folia Microbiologica,*52: 407-414.

Zhang, Y.J., Huo, L.Q., Zhang, S., and Liu, X.Z. 2016. The complete mitochondrial genome of the cold-adapted fungus *Pseudogymnoascus pannorum* syn. *Geomyces pannorum*. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(4): 2566-2567

Association of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.) with fungal endophyte of *Pseudogymnoascus pannorum*

Davood Roodi1[,3*], James P. Millner[2], Craig R. McGill[2], Richard D. Johnson[1] , Stuart D. Card[1]

1. Forage Science, AgResearch Limited, Grasslands Research Centre, Private Bag 11008, Palmerston North, New Zealand .
2. School of Agriculture & Environment, Massey University, Private Bag 11222, Palmerston North, New Zealand
3. Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Mashhad, Iran. (Corresponding author)

Received: June 2021 Accepted: August 2021- DOI: 10.22092/aj.2021.354765.1550

Extended Abstract

Roodi, D., P.millner, J., R.Mcgill, C., D.Johnson, R., D.Card, S., Association of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L.) with fungal endophyte of *Pseudogymnoascus pannorum*
Applied Research in Field Crops Vol 34, No. 3, 2021 4-6: 30-42(in Persian)

Introduction:

Microorganisms that live inside plant tissues, termed endophytes, may offer benefits to their host affected by the biotic and abiotic stress conditions including extreme temperatures (Card *et al.*, 2016). Characterized endophytic strains which show no host specificity could be transferred from their original wild plant hosts into elite cultivars through different method of inoculation.

Fungal endophyte of *Pseudogymnoascus pannorum.* is a psychotolerant fungus resistant to frosting temperature and associated with the plants grown in the arctic regions. The association of a strain of *Pseudogymnoascus pannorum* which has been previously isolated from a wild turnip was investigated using five oilseed rape hybrids in this study (Roodi, 2019).

Materials and Methods:

The seeds of five oilseed rape hybrids were surface-disinfected and inoculated by immersing in spore suspension of the fungus. The seeds were then transferred to pots and placed in a glasshouse in a completely randomized block design with

Email address of the corresponding author: roodi_dave@yahoo.com

three replications. The colonization frequencies of brassica seedlings inoculated with fungal endophyte was assessed at two vegetative plant growth stages. This was done by plating the 15 small piece of disinfected tissue of stem of each hybrids in a Perti dish usingpotato dextrose agar medium. The petri plates were incubated at 22˚C and checked regularly for microbial growth. The colonization tissue frequency of each hybrid was calculated and the data were statistically analyzed. The penetration of fungal hyphae was also studied by a light microscope.

Results and Discussion:

The results from re-isolation of fungal endophyte from inoculated oilseed rape hybrids demonstrated that the fungal endophyte of *Pseudogymnoascus pannorum* colonized shoot tissues of all five studied hybrids and established a close association with all oilseed rape hybrids. The analysis of variance of colonization tissue frequency showed that there is no significant difference between hybrids. The highest and lowest colonization rate were obtained with hybrid Turan and Ladoga at 19.96 and 18.81 percent respectively. The visual observation of inoculated plants showed that the endophytes does not induce any disease symptoms or change in plant growth and development of brassica plants. Control plants were not infected with the fungal endophyte. Although the origin host of the fungal endophyte was a wild turnipof *Brassica rapa* species, the result from inoculation indicates that this strain shows no host specificity. This is consistent with the result of another study that showed a strain of *Beauveria bassiana* isolated from another host can colonize other species such as oilseed rape (Vidal & Jaber, 2015). However, there was a significant difference between rates of colonization at two different growth stages. The mean colonization frequency at one and three-leaf stages was statistically compared using t-student (unpaired group) which was found to be significantly different (99%). The mean colonization rate of hybrids was 17.77 and 20.48 percent at one and three-leaf stages, respectively. Microscopic study of stem tissues also illustrated that the hyphae of fungus penetrate inside the epidermal layer of stem tissue.

Conclusion:

In this study, we demonstrated that a specific strain of *Pseudogymnoascus*

*pannorum*is able to colonize the areal parts of oilseed rape hybrids and establish a close association. This genus of fungus is an endophyte with psychotolerant properties that occupies the plants grown in the arctic regions. The results from this study can be used for further investigations on symbiosis benefits of this association, especially to study the induction of resistance in oilseed rape in terms of environmental stresses such as frosting, particularly at early growth and development stages.

Acknowledgment:

This study was supported by Agricultural Research, Education and Extension Organization of Iran, Massey University and AgResearch Ltd. (Grasslands campus), Grasslanz Technology and Ellet Trust foundation, New Zealand.

Keywords: Canola, endophytic association, host specificity, seed inoculation

References:

Card, S.D., Hume, D.E., Roodi, D., McGill, C.R., Millner, J.P.,and Johnson, R.D. 2015. Beneficial endophytic microorganisms of Brassica – A review. *Biological Control,*90: 102-112.

Roodi, D., Millner, J/P., McGill, C.R., Johnson, R.D.,and Card, S.D. 2019. *Bio-prospecting of endophytes of Brassica*. PhD dessertation. School of Agriculture and Environment, Massey University. Palmerston North. New Zealand.

Vidal, S.,and Jaber, L.R. 2015. Entomopathogenic fungi as endophytes: plant-endophyte-herbivore interactions and prospects for use in biological control. *Current Science,* 45-54.