بیماری‌های گیاهی / جلد ۵۸ / شماره ۲ / سال ۱۴۰۱: ۱۲۷-۱۰۹ DOI: 10.22034/ijpp.2023.2001220.405

CC BY

مقاله پژوهشی

مهار زیستی بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی با استفاده از اندوفیت‌های قارچی بازیدیومیکوتا

جهانشیر امینی[۱]، مهران بهپور[۲]، کیوان کریمی[۳*]، علی حسینی بردبانی[۴]

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۲/۱۷؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۵/۱۶)

چکیده

بیماری پژمردگی فوزاریومی یکی از مهمترین بیماری‌های گوجه‌فرنگی است که بطور جدی کشت و توسعه این محصول را در سراسر جهان تهدید می‌کند. در این مطالعه توان مهار زیستی چهار جدایه اندوفیت قارچی بازیدیومیکوتا جداسازی شده از گندم و یولاف وحشی شامل *Rhizoctonia endophytica* M32، *R. zeae* M9، *Fomes inzengae* M40 و *Coprinopsis urticicola* M2، علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. در شرایط آزمایشگاه ابتدا هویت و نژاد بیمارگر با استفاده از استنباط تبارشناختی و آغازگرهای اختصاصی مورد بررسی قرار گرفت. در ادامه با استفاده از آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای شامل کشت متقابل، تولید متابولیت فرار، کشت داخل گلدان و آزمون‌های تقسیم و برش ریشه، توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های اندوفیت در بازدارندگی از رشد بیمارگر و امکان القای مقاومت در گیاه مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از شواهد مولکولی هویت و نژاد بیمارگر به صورت *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* نژاد ۳ تعیین گردید. آزمون‌های آزمایشگاهی در مقایسه با شاهد نشان داد که در آزمون کشت متقابل تمامی جدایه‌ها در روزهای پنجم و هفتم بعد از کشت سبب کاهش معنی‌دار قطر پرگنه قارچ بیمارگر شدند. در آزمون متابولیت فرار نیز تمامی جدایه‌ها، بجز جدایه *R. zeae* M9 در روزهای سوم و پنجم، بطور معنی‌داری کاهش رشد میسلیومی بیمارگر را موجب شدند. بررسی‌های انجام شده در شرایط گلخانه نیز نشان داد که تنها جدایه *C. urticicola* M2 به طور معنی‌داری در مقایسه با تیمار شاهد و سایر اندوفیت‌ها سبب کاهش شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی و افزایش فاکتورهای رشدی گیاه گردید. از طریق آزمون‌های تقسیم و برش ریشه، سازوکار احتمالی کاهش شدت بیماری توسط *C. urticicola* M2 تحریک سیستم دفاعی گیاه و القای مقاومت در گیاه گوجه‌فرنگی تشخیص داده شد. این تحقیق اولین گزارش از ارزیابی توان بیوکنترلی قارچ اندوفیت *C. urticicola* M2 در بازدارندگی از بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی است.

کلمات کلیدی: *Lycopersicum esculentum* Miller.، شدت بیماری، نژاد بیمارگر، اندوفیت‌های قارچی، فعالیت آنتاگونیستی

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: k.karimi@areeo.ac.ir

۱. استاد، بخش گیاه پزشکی دانشگاه کردستان، سنندج

۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد، بخش گیاه پزشکی دانشگاه کردستان، سنندج

۳. استادیار پژوهشی بخش گیاه پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی صفی آباد دزفول

۴. دانشجوی دکتری، بخش گیاه پزشکی دانشگاه کردستان، سنندج

Iran. J. Plant Path., Vol. 58, No .2, 2022: 109-127

CC BY

DOI: 10.22034/ijpp.2023.2001220.405

Research Article

Biological control of fusarium wilt of tomato using basidiomycota fungal endophytes

Jahanshir amini[1], Mehran Behpour[2], Kaivan Karimi[3*], Ali Hoseini badrbani[4]

(Received: 07.05.2023; Accepted: 08.07.2023)

Abstract

Fusarium wilt is one of the most important diseases of tomato seriously threatening the cultivation and development of this crop worldwide. In this study, the biocontrol potential of four basidiomycota fungal endophytes isolated from wheat and wild oat, namely *Rhizoctonia endophytica* M32, *R. zeae* M9, *Fomes inzengae* M40 and *Coprinopsis urticicola* M2, was evaluated against fusarium wilt of tomato under laboratory and greenhouse conditions. In lab, identity and race of the pathogen was first determined using phylogenetic inference and specific primers. In addition, antagonistic potential of fungal endophytes in inhibiting the pathogen and possible plant resistance induction was assessed through dual culture, volatile metabolite production, pot cultivation, split-root and root-cutting tests. Molecular evidence determined the identity of the pathogen as *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3. Lab tests showed that in duel culture test all four fungal endophytes were able to reduction of colony diameter of pathogen significantly five and seven days after inoculation compared to control. In volatile metabolite test all isolates could reduce mycelial growth of the pathogen significantly compared to control except *R. zeae* M9 in third and fifth day. Under greenhouse condition, only *C. urticicola* M2 isolate could significantly reduce the severity of fusarium wilt of tomato and increase plant growth factors compared to the control and other fungal endopytes. Through split-root and root-cutting tests, the possible mechanism of disease severity reduction caused by *C. urticicola* M2 was identified as stimulation and induction of resistance in tomato plant. This study is the first report on the evaluation of the biocontrol ability of the endophytic fungus, *C. urticicola* M2, in suppression of fusarium wilt disease of tomato.

Key words: *Lycopersicum esculentum* Miller., Disease severity, Physiological race, fungal endophytes, Antagonistic activity.

* Corresponding author's E-mail: k.karimi@areeo.ac.ir

1. Professor, respectively. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
2. Graduated MSc student, respectively. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
3. Ph.D Student, respectively. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
4. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Safiabad Agricultural Research and Education and Natural Resources center, Dezful. Iran.

مقدمه

گوجه‌فرنگی با نام علمی *Lycopersicum esculentum* Miller. گیاهی چند ساله از تیره بادمجانیان (*Solanaceae*) است که اکثراً به صورت یکساله کشت شده و سالانه با تولید حدود ۱۹۰ میلیون تن، بعد از سیب زمینی از مهم‌ترین سبزیجات در سراسر دنیا محسوب می‌شود و یکی از فرآورده‌های مهم کشاورزی و ماده اولیه برای صنایع تبدیلی و غذایی است (Dorais Jones *et al.* 1991; *et al.* 2008; FAO 2021). همچنین این محصول به دلیل دارا بودن انواع ویتامین‌ها، کاروتن، اسیدهای مفید، قند و املاح معدنی نقش بسیار مهمی در صنایع فرآوری، تغذیه و سلامت انسان ایفا می‌کند (Dorais *et al.* 2008). طبق آمار سازمان فائو، از سال ۲۰۱۱ تا ۲۰۲۱ متناسب با کاهش سطح زیر کشت، میزان تولید محصول گوجه‌فرنگی در ایران روند نزولی داشته و از شش میلیون تن به حدود سه و نیم میلیون تن رسیده است (FAO 2021). یکی از عوامل اصلی محدود کننده‌ی کشت و توسعه محصول گوجه‌فرنگی تنش‌های ناشی از عوامل زنده می‌باشند که همواره تهدید جدی برای افزایش عملکرد این محصول بشمار می‌روند. در این میان بیماری پژمردگی فوزاریومی با عامل (Fol) *Fusarium oxysporum* Schlechtend.:Fr. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) W.C. Snyder یکی از شایع‌ترین و مخربترین بیماری‌های گوجه فرنگی در جهان و ایران محسوب می‌شود. این بیماری اولین بار در سال ۱۸۹۵ از کشور انگلستان گزارش شد و تقریبا در سراسر دنیا شیوع پیدا کرده است (Jones *et al.* 1991). در ایران، بهداد (Behdad 1982) برای اولین بار پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی را از اصفهان گزارش نمود. از لحاظ ظاهری گیاهان آلوده بصورت پژمرده و رنگ پریده (زرد رنگ) نمایان می‌شوند که به علت انسداد آوند چوبی و تولید زهرابه توسط بیمارگر می‌باشد (Sirinivas *et al.* 2019).

بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* دارای سه نژاد فیزیولوژیک ۱، ۲ و ۳ می‌باشد که براساس میزان پرآزاری و تیپ علائم روی ارقام افتراقی قابل تفکیک می‌باشند (Sirinivas *et al.*, 2019). خسارت شدید بیماری موجب کاهش عملکرد محصول در مزرعه و گلخانه می‌گردد. بیمارگر به علت دارا بودن ویژگی‌هایی از قبیل: خاکزی بودن، تولید فرم مقاوم (کلامیدوسپور) و بقای طولانی در خاک، داشتن نژادهای فیزیولوژیک مختلف و سخت بودن مبارزه شیمیایی در زمره مهمترین بیمارگرهای گوجه‌فرنگی بشمار می‌رود (Agrios 2005; Cha *et al.* 2019). روش‌های متنوعی شامل روش‌های زراعی، آفتاب دهی خاک، استفاده از ارقام مقاوم و مبارزه شیمیایی در یک برنامه تلفیقی برای مدیریت این بیماری بکار برده می‌شود (Mwangi *et al.* 2019). امروزه بدلیل آلودگیهای زیست محیطی ناشی از کاربرد سموم شیمیایی، امکان توسعه مقاومت در میان جمعیت‌های بیمارگر به قارچکش‌ها و ناپایداری مقاومت ارقام، کنترل بیماری‌های گیاهی بوسیله میکروارگانیسم‌های متعارض توجه محققان زیادی را به خود جلب کرده است (Asad 2022). این روش به دلیل سازگار بودن با محیط زیست و حفظ سلامت جامعه به عنوان یکی از روش‌های موثر در مبارزه تلفیقی بیماری‌های گیاهی مطرح می‌باشد (Asad 2022). اندوفیت‌های قارچی از جمله مهمترین عوامل بالقوه بشمار می‌روند که در سال‌های اخیر ارزیابی توان مهار زیستی آنها در مقابل برخی از بیمارگرهای گیاهی انجام شده است. اندوفیت‌ها، میکروارگانیسم‌هایی هستند که در درون بافت گیاه میزبان بدون ایجاد هیچ علایمی زندگی می‌کنند و توانایی کلونیزه کردن ریشه گیاه میزبان را دارند (Chaudhary *et al.* 2022). ویروس‌ها، فیتوپلاسماها، باکتری‌ها و قارچ‌ها از جمله اندوفیت‌های شناخته شده هستند (Pancher *et al.* 2012). نقش اندوفیت‌ها در تحریک رشد گیاه (Gasoni and Gurfinkel 2009;

Pancher *et al*. 2012)، مهار زیستی عوامل بیمارگر گیاهی (Martini *et al*. 2009)، افزایش قدرت زیست‌پالایی گیاه (Porass-Alfaro and Bayman 2011; Russell *et al*. 2011)، تولید متابولیت‌های ثانویه (Zhao *et al*. 2011)، آنزیم‌ها (Rajulu *et al*. 2011)، همزیستی (Ramawat and Merillon 2013) و القای مقاومت (Golami *et al*. 2019) در گیاه شناخته شده می‌باشد. در مبحث مهار زیستی یکی از سازوکارهای اصلی اندوفیت‌های قارچی عمدتا تحریک سیستم دفاعی گیاه میزبان می‌باشد (Fontana *et al*. 2021). اغلب اندوفیت‌هایی که تاکنون جداسازی و شناسایی شده‌اند متعلق به آسکومیست‌ها بوده‌اند (Rungjindamai *et al*. 2008). با این وجود، برخی محققین توان مهارزیستی قارچ‌های اندوفیت بازیدیومیکوتا را گزارش کرده‌اند (Wemheuer *et al*. 2019). اندوفیت‌های بازیدیومیستی منبع غنی از آنتی بیوتیک‌های طبیعی هستند. متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط آن‌ها دارای خواص ضدمیکروبی، ضدتوموری و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (Sivanandhan *et al*. 2017). چندین ترکیب از بازیدیومیست‌های جنگلی جدا شده است که از رشد باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها جلوگیری می‌کنند (Wang *et al*. 2012). مطالعات اخیر پتانسیل اندوفیت‌های قارچی در مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی را بخوبی آشکار ساخته‌اند (Kavroulakis *et al*. 2007; Fadiji *et al*. 2020; Redman *et al*. 2022).

در این پژوهش نیز پتانسیل مهار زیستی چهار جدایه از قارچ‌های اندوفیت بازیدیومیکوتا شامل *Coprinopsis urticicola* M2 و *Rhizoctonia endophytica* M32 جداسازی شده از گندم (*Triticum aestivum* L.) و *R. zeae* M9 و *Fomes inzengae* M40 جداسازی شده از یولاف وحشی (*Avena sterilis* subsp. *ludoviciana*) (Gholami *et al*. 2019) روی عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش

قارچ بیمارگر و جدایه‌های اندوفیت

استرینی (UoKFol) از قارچ بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*، که از گیاهان آلوده گوجه‌فرنگی جداسازی شده بود توسط کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه کردستان تامین شد و روی محیط غذایی WA (water agar) از طریق نوک ریسه خالص‌سازی شد. چهار جدایه از قارچ‌های اندوفیت بازیدیومیکوتا جدا شده از گندمیان شامل *R. endophytica* M32، *R. zeae* M9، *F. inzengae* M40 و *C. urticicola* M2 نیز از کلکسیون قارچ‌های دانشگاه کردستان تامین شد (Gholami *et al*. 2019).

شناسایی مولکولی قارچ بیمارگر

استخراج DNA ژنومی قارچ بیمارگر بر اساس روش مبتنی بر CTAB انجام گرفت (Möller *et al*. 1992). بخشی از ژن فاکتور بسط‌دهنده رونویسی ۱-آلفا (*tef 1-α*) با استفاده از آغازگرهای EF1 و EF2 (O'Donnell *et al*. 1998) تکثیر گردید. مخلوط واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۱۲/۵ میکرولیتر مستر میکس (1x، شرکت سیناژن)، ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه، یک میکرولیتر از هر آغازگر و ۲ میکرولیتر DNA ژنومی (۵۰ نانو گرم) انجام گرفت. سپس، محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ بارگذاری شدند. برای تخمین اندازه قطعات DNA تکثیر شده از نشانگر اندازه‌ای GeneRulerTM 100bp DNA ladder استفاده شد. الکتروفورز به مدت ۷۰ دقیقه در جریان ثابت ۸۰ ولت انجام گرفت. پس از انجام الکتروفورز، ژل‌ها توسط دستگاه Ultraviolet/White Light Transilluminator مدل UVITEC مشاهده و تصویربرداری شدند. محصول نهایی PCR جهت تعیین توالی به شرکت پیشگام ارسال شد.

تجزیه و تحلیل‌های تبارشناختی

توالی‌های خام بعد از ویرایش با استفاده از نرم افزار MEGA ver. 7.0 با توالی‌های موجود در بانک داده‌های ژن NCBI با استفاده از ابزار جستجوی بلاست مقایسه شدند و توالی ژن متناظر در استرین های معتبر و مرجع جهت ترسیم تبارنما از بانک ژن اخذ گردید. بعد از هم‌ردیف‌سازی توالی‌ها و تعیین مدل تکاملی با استفاده از نرم افزار MEGA7 ترسیم تبارنما با استفاده از روش حداکثر احتمال (ML) انجام شد. آنالیز اعتبارسنجی (Bootstrap) با ۱۰۰۰ تکرار بوتستراپ انجام گردید. استرین قارچی *Fusarium solani* CBS 102429 به عنوان آرایه‌ی برون‌گروه مورد استفاده قرار گرفت.

تعیین فرم اختصاصی و نژاد بیمارگر

برای تعیین فرم اختصاصی و نژادهای بیمارگر از آغازگرهای اختصاصی (Hirano and Arie 2006) استفاده گردید. جفت آغازگرهای Unif و Unir جهت تعیین فرم اختصاصی و دو جفت آغازگر (Sp13f و Sp13r) و (Sp23f و Sp23r) جهت تعیین نژاد بیمارگر مورد استفاده قرار گرفتند. چگونگی تمایز فرم‌های اختصاصی و نژادهای بیمارگر در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱. تعیین فرم اختصاصی و نژاد بیمارگر *Fusarium oxysporum f. sp.* lycopersici با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (*Hirano and Arie 2006*).

Table 1. Determination of formae specials and races of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using specific primers (Hirano and Arie 2006).

Races	Primers		
	Uni	Sp13	Sp23
Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* race 1	+	+	–
Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* race 2	+	–	+
Fusarium oxysporum f.sp. *lycopersici* race 3	+	+	+

+ و – به ترتیب نشان دهنده تکثیر یا عدم تکثیر ناحیه ژنی مورد نظر توسط آغازگرهای اختصاصی می‌باشد.

آزمون بیماریزایی

جهت انجام این آزمون، ابتدا سوسپانسیونی از اسپورهای قارچ بیمارگر با اضافه کردن پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون و خراش دادن سطح کشت‌های ده روزه (PDA, potato dextrose agar) با استفاده از تیغ سترون تهیه گردید و پس از عبور دادن سوسپانسیون مورد نظر از صافی (پارچه توری) تراکم اسپورها توسط لام هموسیتومتر (Hemocytometer) شمارش شد و در تعداد ۱×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی‌لیتر تنظیم گردید (Karimi et al. 2017). ابتدا بذرهای ضدعفونی سطحی شده گوجه‌فرنگی رقم Beliy naliv (رقم حساس به بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی) در شرایط گلخانه کشت شدند و پس از گذشت ۲۰ روز، گیاهچه‌های در مرحله ۳ تا ۴ برگی مایه‌زنی شدند. گیاهچه‌های سه تا چهار برگی گوجه‌فرنگی همراه با ریشه از بستر کشت خارج و ریشه‌ها زیر جریان ملایم آب شیر شسته شدند. ریشه‌ها سپس به مدت پنج دقیقه در سوسپانسیون اسپور قارچ (تراکم ۱×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون) غوطه‌ور شدند و در گلدان‌های حاوی مخلوط خاک سترون رس، شن و کود حیوانی به نسبت ۱:۱:۱ کشت و در گلخانه در دمای ۲۸±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در گلدان شاهد

به جای سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر از آب مقطر سترون استفاده گردید. اقدامات زراعی روی گلدان‌ها طبق روش معمول انجام شد. تغییرات گیاهچه‌ها از لحاظ وقوع بیماری هر روز مورد بررسی قرار گرفت و بعد از گذشت سه هفته همزمان با ظهور نشانه‌های بیماری، تعداد گیاهان سالم و دارای نشانه‌های بیماری و توسعه پژمردگی در هر بوته ارزیابی گردید (Amini *et al*. 2009). شاخص شدت بیماری (Disease Severity Index, DSI) براساس سیستم نمره دهی صفر تا چهار انجام شد (Bora *et al*. 2004). ۰ =گیاه سالم و بدون علائم بیماری ۱= کمتر از ۲۵ درصد برگ‌های بوته دارای نشانه‌های پژمردگی، ۲ = ٪۵۰- ۲۶ برگ‌های بوته دارای نشانه‌های پژمردگی، ۳= ٪۷۵- ۵۱ برگ‌های بوته دارای نشانه‌های پژمردگی، ۴ = ۱۰۰٪-۷۶ برگ‌های بوته دارای نشانه‌های پژمردگی.

شاخص شدت بیماری در هر تکرار نیز بر اساس فرمول ۱ محاسبه شد.

فرمول ۱ – محاسبه شاخص شدت بیماری

$$DSI = \frac{\text{مجموع نمرات داده شده در هر تکرار}}{\text{بالاترین نمره در سیستم نمره دهی} \times \text{تعداد کل}}$$

برای اثبات اصول کخ، از گیاهان دارای نشانه‌های بیماری، پس از ضدعفونی سطحی عمل کشت در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA، انجام شد و شناسایی مجدد قارچ‌های جدا شده بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی انجام گرفت.

آزمون کشت متقابل

این آزمون در تشتک‌های پتری ده سانتی‌متری حاوی محیط PDA انجام شد. ابتدا در یک طرف تشتک پتری در فاصله یک سانتی‌متری از دیواره آن، یک حلقه پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه قارچ بیمارگر قرار داده شد و سپس در طرف دیگر تشتک پتری در مقابل آن، حلقه پنج میلی‌متری از قارچ اندوفیت کشت گردید. در تیمار شاهد به جای حلقه قارچ اندوفیت از حلقه محیط کشت PDA بدون قارچ استفاده گردید و تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Dennis and Webster 1971a). برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. تشتک‌ها به صورت روزانه مورد بررسی شده و شعاع پرگنه قارچ بیمارگر پس ازگذشت سه، پنج و هفت روز اندازه‌گیری و درصد بازدانگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر بصورت فرمول۲ محاسبه گردید.

فرمول ۲ – $S\ (\%) = C\text{-}T/C*100$

S: درصد بازدارندگی، T: قطر پرگنه بیمارگر در هر تیمار، C: قطر پرگنه بیمارگر در تیمار شاهد

آزمون تاثیر ترکیبات فرار

در این آزمون ابتدا در مرکز یک تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA، حلقه پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه قارچ بیمارگر قرار داده شد و سپس یک حلقه پنج میلی‌متری از کشت پنج روزه قارچ اندوفیت نیز در مرکز تشتک پتری دیگری کشت گردید. سپس در شرایط سترون درب تشتک‌ها برداشته شد و دو تشتک به صورت وارونه روی یکدیگر قرار داده شدند و اطراف آنها با پارافیلم مسدود گردید تا از خروج احتمالی هرگونه ترکیب فرار جلوگیری شود. تیمار شاهد به جای حلقه قارچ اندوفیت از یک حلقه محیط کشت PDA بدون قارچ استفاده شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵±۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و میزان رشد شعاعی قارچ اندوفیت و بیمارگر به صورت روزانه اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر با استفاده از فرمول بالا محاسبه شد (Dennis and Webster 1971b).

بررسی بازدارندگی قارچ‌های اندوفیت در شرایط گلخانه

جهت مایه‌زنی خاک، ابتدا تعداد ۱۰-۷ حلقه از کشت پنج روزه قارچ بیمارگر و قارچ‌های اندوفیت به ارلن‌های مجزا حاوی ۱۰۰ گرم بذر گندم سترون شده اضافه شدند.

به منظور جلوگیری از متراکم شدن بذور گندم و پرگنه قارچ، شیشه‌ها هر روز تکان داده شدند تا پرگنه قارچ کل بذور را به صورت یکنواخت پوشش دهد. در ادامه مخلوط زادمایه قارچ فوزاریوم به نسبت ۳ درصد وزنی و قارچ‌های اندوفیت به نسبت ۵ درصد وزنی با خاک سترون حاوی رس، شن و کود حیوانی به نسبت ۱:۱:۱ مخلوط و به دو سوم بالایی گلدان اضافه شدند. در تیمار شاهد منفی به جای زادمایه از مخلوط خاک سترون، برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. در شاهد مثبت فقط از زادمایه قارچ بیمارگر و در تیمار قارچ‌های اندوفیت فقط زادمایه قارچ اندوفیت در هر گلدان استفاده شد. گلدان‌ها در گلخانه در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۲ ساعته به مدت ۲۵ روز نگهداری و هر دو روز یک بار آبیاری شدند. سپس شاخص بیماری، ارتفاع ریشه و اندام هوایی، وزن تر و خشک ریشه و اندام‌های هوایی اندازه‌گیری گردید.

بررسی القای مقاومت توسط جدایه منتخب اندوفیت *C. urticicola* M2

آزمون تقسیم ریشه (Root-split)

ابتدا مخلوط خاک سترون حاوی رس، شن و کود حیوانی به نسبت ۱:۱:۱ تهیه و بذرهای ضدعفونی شده گوجه‌فرنگی کشت گردید. بعد از ۲۵ روز نشاءهای چهار برگی گوجه‌فرنگی همراه ریشه از خاک خارج و زیر جریان ملایم آب شسته شدند. ریشه نشاءهای گوجه‌فرنگی به وسیله تیغ جراحی سترون تا زیر طوقه به دو قسمت مساوی تقسیم و نیمی از ریشه در یک گلدان حاوی زادمایه قارچ بیمارگر و نیمه دیگر ریشه در گلدان دیگر که حاوی زادمایه قارچ اندوفیت *C. urticicola* M2 بوده و به گلدان قبلی متصل بود قرار گرفت و توسط یک حائل محکم گردید. جهت انجام این آزمون چهار تیمار در نظر گرفته شد: ۱- شاهد بدون قارچ: که در هر دو گلدان از خاک سترون استفاده شد. ۲- شاهد حاوی بیمارگر یا مثبت: یک نیمه ریشه در گلدان حاوی زادمایه قارچ بیمارگر و نیمه دیگر آن در گلدان حاوی خاک سترون کشت داده شد. ۳- شاهد حاوی اندوفیت: نیمی از ریشه در خاک حاوی زادمایه اندوفیت و نیمه دیگر آن درگلدان حاوی خاک سترون کشت داده شد. ۴- تیمار قارچ بیمارگر-قارچ اندوفیت: نیمی از ریشه در خاک حاوی زادمایه قارچ بیمارگر و نیمی دیگر در گلدان حاوی مایه تلقیح قارچ اندوفیت کشت داده شد. ارزیابی گلدان‌ها (پنج تکرار) در گلخانه در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۲ ساعته بعد از ظهور علائم بیماری در تیمار شاهد حاوی بیمارگر (شاهد مثبت) انجام شد (Amini *et al*. 2009).

آزمون برش ریشه (Cutting system)

جهت انجام این آزمون، ابتدا به مخلوط خاک سینی نشاء، زادمایه قارچ اندوفیت *C. urticicola* M2 به نسبت ۵٪ درصد وزنی اضافه گردید و بذور گوجه‌فرنگی پس از ضدعفونی در داخل سینی‌ها کشت گردیدند. سینی‌ها در دمای ۲±۲۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از چهار برگی شدن گیاهچه‌ها، ریشه آن‌ها از محل زیر طوقه قطع و گیاهچه در ادامه در مخلوط خاک سترون با تیمارهای مختلف کشت داده شد و توسط یک حائل محکم گردید. برای این آزمایش نیز چهار تیمار به صورت زیر در نظر گرفته شد:۱- شاهد سالم: نشاءهای کشت شده در خاک بدون زادمایه قارچ اندوفیت و بیمارگر. ۲- شاهد حاوی بیمارگر: نشاءهای کشت شده در خاک حاوی زادمایه قارچ بیمارگر. ۳- شاهد حاوی اندوفیت: نشاءهای کشت شده در خاک حاوی زادمایه قارچ اندوفیت. ۴- تیمار قارچ بیمارگر- قارچ اندوفیت. نشاءهای کشت شده در خاک حاوی زادمایه قارچ بیمارگر و اندوفیت (Amini *et al*. 2009).

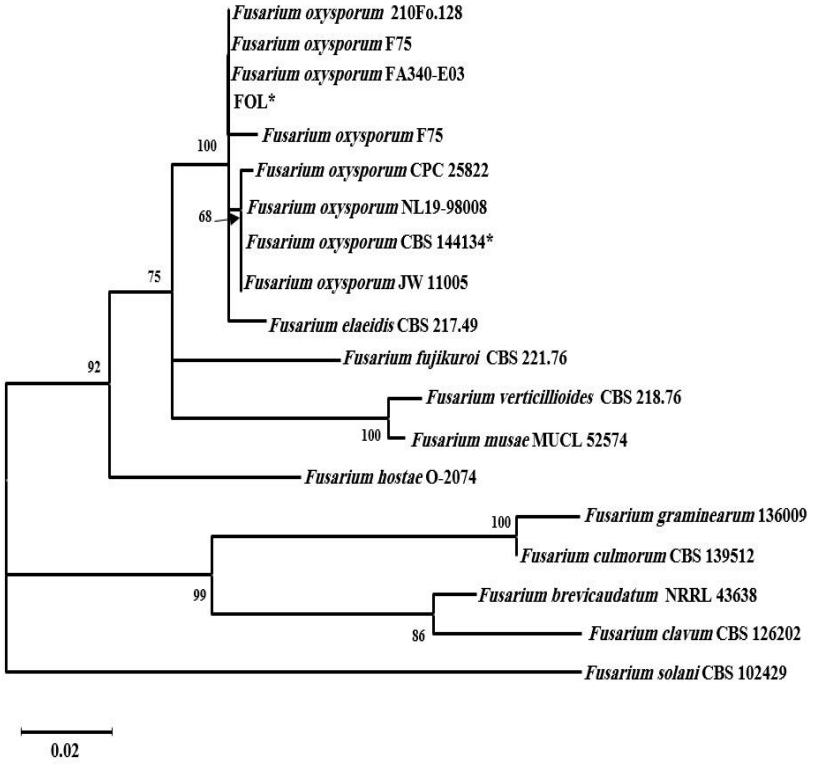
تجزیه و تحلیل داده‌ها

همه آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا و تجزیه و تحلیل و مقایسه میانگین‌ها با نرم‌افزار SAS (Statistical analysis system) (SAS institute, 8.2; Cary, NC, USA, 2013) و آزمون توکی (Tuky) در سطح ۰/۰۵ انجام گرفت.

نتایج

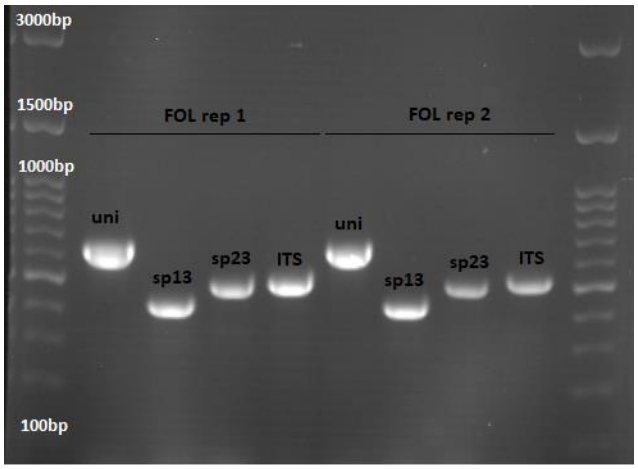
شناسایی مولکولی

استنباط تبارشناختی با استفاده از مدل تکاملی K2+G، جدایه قارچ بیمارگر بررسی شده در این مطالعه را با درصد اعتبارسنجی بالا (۱۰۰ درصد) در خوشه متعلق به گونه مرکب *Fusarium oxysporum* قرار داد (شکل ۱). همچنین فرم اختصاصی و نژاد بیمارگر نیز با استفاده از آغازگرهای اختصاصی بصورت *lycopersici* و نژاد ۳ تعیین گردید (شکل ۲). در این مطالعه جفت آغازگرهای اختصاصی تعیین فرم اختصاصی Unir/Unif و نژاد بیمارگر Sp13r/Sp13f و Sp23r /Sp23f به ترتیب قطعاتی به طول ۶۷۰، ۴۴۵ و ۵۱۸ جفت باز تولید کردند که مطابق با مطالعه هیرانو و اری (۲۰۰۶) بود.



شکل ۱. تبارنمای ترسیم شده با استفاده از ناحیه ژنی فاکتور بسط‌دهنده رونویسی ۱-آلفا (*tef 1-α*) ۱۹ آرایه بر اساس روش Likelihood Maximum در نرم افزار MEGA ver. 7.0. اعداد بالای هر شاخه مقدار اعتبارسنجی از ۱۰۰۰ تکرار بوتستراپ را نشان می دهد. گونه *Fusarium solani* (CBS 102429) به عنوان گروه خارجی استفاده شده است. جدایه مورد مطالعه در این تحقیق بصورت *FOL مشخص شده است.

Fig 1. A phylogenetic tree drawn using the gene region of transcription elongation factor1- alpha (tef1-α) 19 taxa based on the Maximum Likelihood method in MEGA ver. 7.0. Numbers above each branch refer to bootstrap values out of 1000 repetitions. *Fusarium solani* (CBS 102429) was used as an out-group. The isolate studied in this research is shown as FOL*.



شکل ۲. استفاده از آغازگرهای اختصاصی جهت تعیین فرم اختصاصی (Unif و Unir) و نژاد ((Sp13f و Sp13r) و (Sp23f و Sp23r)) قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*، تکثیر ناحیه ژنی فاصله انداز رونویسی شونده داخلی (ITS) به عنوان شاهد مثبت.

Fig 2. Using specific primers to determine the special form (Unif and Unir) and race ((Sp13f and Sp13r) and (Sp23f and Sp23r) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Amplification of the internal transcribed spacer (ITS) gene region as positive control.

آزمون بیماریزایی

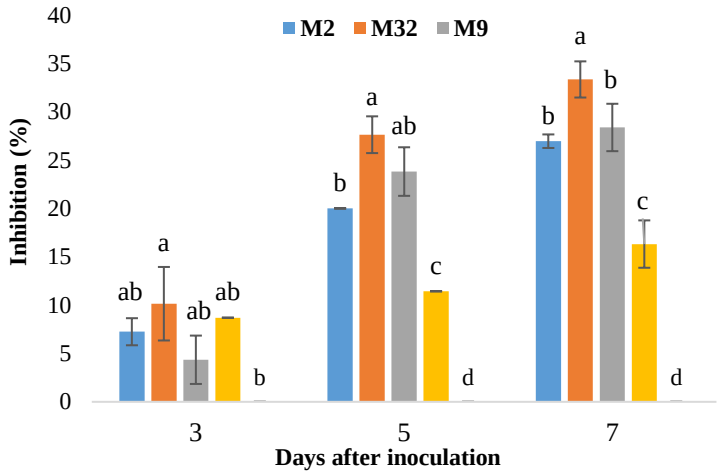
در آزمون بیماریزایی، جدایه قارچ بیمارگر سبب ایجاد علائم زردی، پژمردگی، کم رشدی اندام‌های هوایی و نکروزه شدن آوندهای چوبی روی بوته‌های گوجه‌فرنگی گردید، در صورتی که در تیمار شاهد هیچ علائمی مشاهده نشد و بوته‌ها کاملاً سالم بودند. میانگین شاخص شدت بیماری‌زایی قارچ بیمارگر ۶۶ درصد تعیین گردید. مطابق با اصول کخ، قارچ بیمارگر مجدد از بافت‌های آلوده جداسازی گردید و با استفاده از مشخصات ریخت شناختی شناسایی شد.

آزمون کشت متقابل

نتایج حاصل از این آزمایش در روزهای سوم، پنجم و هفتم پس از کشت نشان داد که جدایه‌های اندوفیت اثرات متفاوتی را در کاهش رشد میسلیوم قارچ بیمارگر بروز دادند (شکل ۳). در روز سوم تنها جدایه اندوفیت *R. endophytica* M32 در مقایسه با دیگر جدایه‌ها و شاهد رشد میسلیومی بیمارگر را بطور معنی‌دار کاهش داد. در حالیکه در روزهای پنجم و هفتم همه جدایه‌های اندوفیتی بطور معنی‌داری در مقایسه با شاهد رشد پرگنه بیمارگر را کاهش دادند (شکل ۳).

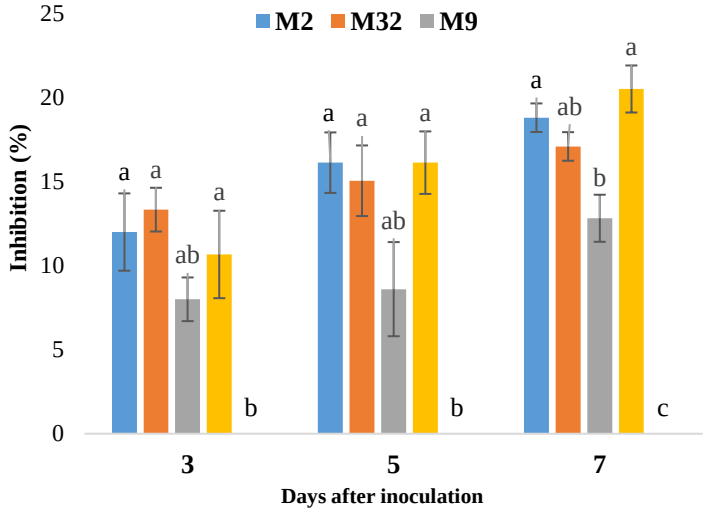
آزمون تولید ترکیبات فرار

نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که در روزهای سوم و پنجم پس از کشت، بجز جدایه اندوفیتی *R. zeae* M9 مابقی جدایه‌ها باعث مهار رشد میسلیومی قارچ بیمارگر نسبت به تیمار شاهد شدند که این اختلاف با شاهد معنی‌دار بود. در روز هفتم عملکرد همه جدایه‌ها در مهار رشد میسلیومی بیمارگر در مقایسه با شاهد معنی‌داری بود و جدایه *F. inzengae* M40 بیشترین بازدارندگی را در مقایسه با دیگر جدایه‌های اندوفیت قارچی از خود نشان داد (شکل ۴).



شکل ۳. بازدارندگی جدایه‌های اندوفیتی *Coprinopsis urticicola* M2، *Rhizoctonia endophytica* M32، *R. zeae* M9، *Fomes inzengae* M40 از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* در آزمون کشت متقابل سه، پنج و هفت روز بعد از کشت در مقایسه با شاهد.

Fig 3. Inhibition of endophytic isolates *Coprinopsis urticicola* M2, *Rhizoctonia endophytica* M32, *R. zeae* M9, *Fomes inzengae* M40 from the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the duel culture test, three, five and seven days after inoculation compared with the control.



شکل ۴. بازدارندگی جدایه‌های اندوفیتی *Coprinopsis urticicola* M2، *Rhizoctonia endophytica* M32، *R. zeae* M9، *Fomes inzengae* M40 از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* در آزمون تولید ترکیبات فرار سه، پنج و هفت روز بعد از کشت در مقایسه با شاهد.

Fig 4. Inhibition of endophytic isolates *Coprinopsis urticicola* M2, *Rhizoctonia endophytica* M32, *R. zeae* M9, *Fomes inzengae* M40 from the mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in the volatile compounds production test, three, five and seven days after inoculation compared with the control

بازدارندگی از بیماری در شرایط گلخانه

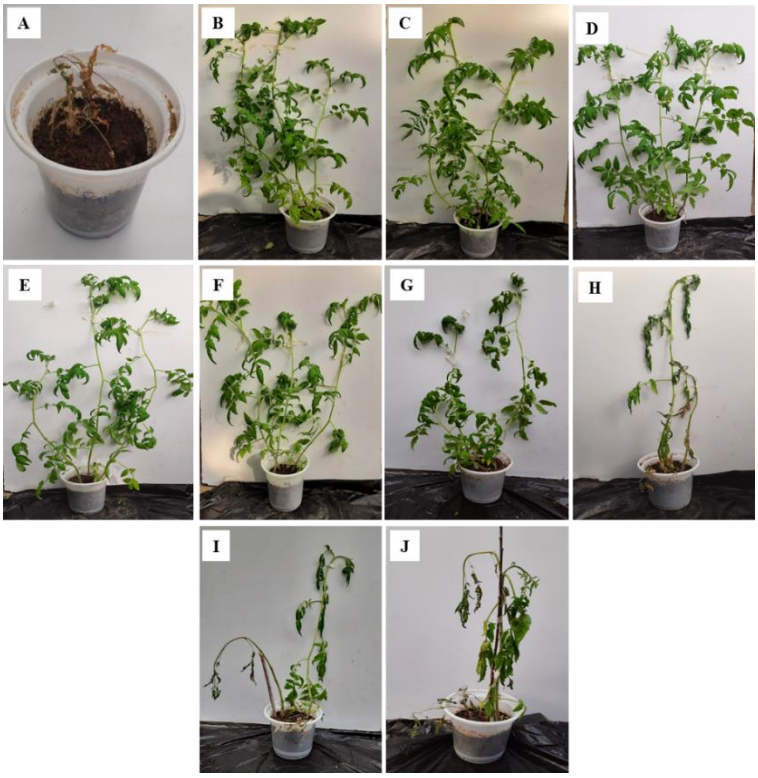
در ایـن آزمـایش در تمـامی تیمارهـا ۳۰ روز پـس از مایه‌زنی بیمـارگر وقـوع بیمـاری در همـه تیمارهـا مشـاهده گردید اما تیمارهایی که بـا جدایـه‌های قارچ‌هـای انـدوفیت مایـه‌زنـی شـده بودنـد درجـات کمتـری از شـدت بیمـاری را نشـان دادنـد و بطـور معنـی‌داری در مقایسـه بـا شـاهد آلـوده توانسـتند شـدت بیمـاری را کـاهش دهنـد. جدایـه *C. urticicola* M2 بـا ۸۸/۲۳ درصـد و سـپس جدایـه *F. inzengae* M40 با ۵۲ درصد بیشترین مقدار بازدارندگی از بیماری را موجب شدند (جدول ۲، شکل ۵).

جدول۲. تاثیر جدایه‌های قارچ‌های اندوفیت روی شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه پس از ۳۰ روز

Table 2. The effects of endophytic fungal isolates on disease severity of fusarium wilt of tomato under greenhouse conditions after 30 days.

Treatment	Disease severity (%)	Inhibition (%)
Rhizoctonia endophytica	6.32 ±72.5a	17.56
Rhizoctoniazeae	3.04 ±72.65a	17.39
Fomes inzengae	7.7 ±42.21b	52
Coprinopsis urticicola.	4.64 ±10.35c	88.23
Pathogen	0.47±87.95[a]	–

*تیمارهای با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال آماری پنج درصد ندارند.



شکل ۵. تأثیر جدایه‌های اندوفیتی در کاهش شدت بیماری در مقایسه با شاهد بیمارگر و شاهد سالم (آب): A) بیمارگر (شاهد مثبت)، B) شاهد سـالم، C) *Coprinopsis urticicola* M2، D) *Rhizoctonia endophytica* M32، E) *R. zeae* M9، F) *Fomes inzengae*، G) *C. urticicola* M2+P، H) *R.endophytica* +P M32، I) *R. zeae* M9 +P و J) *F. inzengae* +P.

Fig 5. The effect of endophytic isolates in reduction of disease severity in comparison with the healthy control and pathogen control: A) Pathogen (positive control), B) healthy control (water), C) *Coprinopsis urticicola* M2, D) *Rhizoctonia endophytica* M32, E) *R. zeae*، M9, F) *Fomes inzengae*, G) *C. urticicola* M2+P, H) *R.endophytica* +P, M32, I) *R. zeae* M9 +P and J) *F. inzengae* +P.

تأثیر جدایه‌های اندوفیت روی شاخصه‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی

در این آزمایش تمام تیمارهای شامل جدایه‌های اندوفیت قارچی در مقایسه با شاهد تاثیر مثبتی در افزایش راندمان شاخصه‌های رشدی داشتند، اگرچه بجز جدایه اندوفیت *C. urticicola* M2 سایر جدایه‌های اندوفیت در بیشتر شاخص‌ها اختلاف معنی‌داری با شاهد آلوده نداشتند (جدول ۳). در تیمارهای مایه‌زنی شده فقط با جدایه‌های اندوفیت و در مقایسه با شاهد سالم (آب) جدایه اندوفیت *C. urticicola* M2 باعث افزایش میانگین شاخص‌های رشدی گیاه گردید اما تفاوت معنی‌دار فقط در صفات وزن تر ریشه و وزن خشک ساقه در مقایسه با شاهد سالم مشاهده گردید (جدول ۳).

جدول ۳. تأثیراندوفیت های قارچی به تنهایی و همراه با عامل بیماری بر فاکتورهای رشدی گیاه در شرایط گلخانه.

Table 3. The effect of fungal endophytes alone and together with the pathogen on plant growth factors in greenhouse condition.

Treatment	*Stem dry weight*	*Root dry weight*	*Stem wet weight*	*Root wet weight*	*Stem length*	*Root length*
Pathogen	**0.31e ± 0.3**	**0.07d± 0.07**	**4.56f± 2.18**	**0.49e± 0.66**	**23.74d± 14.26**	**4.99d± 2.93**
Rhizoctonia endophytica+P	0.38de ± 0.33	0.13bcd ± 0.07	6.27ef ± 2.25	0.86de±0.51	32.11cd± 7.26	8.15c±1.87
Coprinopsis urticicola+P	0.54d ± 0.07	0.18b ± 0.09	7.79e ± 2.36	1.39c ± 0.34	41.02c± 7.22	9.01c ± 1.81
R. zeae+P	0.43de ± 0.18	0.12bcd ± 0.04	5.99ef ± 2	0.82de ± 0.11	32.03cd± 6.47	8.33c ± 2.45
Fomes inzengae +P	0.45de ± 0.19	0.1cd ± 0.06	6.73ef ± 1.48	0.91cde ± 0.38	31.5cd± 7.81	7.85c ± 1.56
Control (water)	**1.34b ± 0.11**	**0.33a ± 0.08**	**23.85ab ± 2.93**	**3.07b±0.76**	**65.12ab± 6.29**	**19.65a ± 4.2**
R. endophytica	1.15bc ± 0.28	0.15bc ± 0.05	21.13bc ± 3.53	1.29cd ± 0.33	61.77b± 7.58	13.96b ± 3.34
C. urticicola	1.57a ± 0.23	0.34a ± 0.1	25.31a ± 3.47	3.77a ± 0.61	71.85a± 5.94	18.33a ± 2.89
R. zeae	1.09c ± 0.21	0.15bc ± 0.05	18.29cd ± 2.91	1.41c ± 0.31	63.99ab± 6.43	14.13b ± 2.26
F. inzengae	1c ± 0.21	0.11bcd ± 0.05	17.14d ± 3.11	1.03cd ± 0.34	60.62b± 7.36	12.78b ± 1.83

*تیمارهای با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال آماری پنج درصد ندارند.

آزمایش تقسیم ریشه

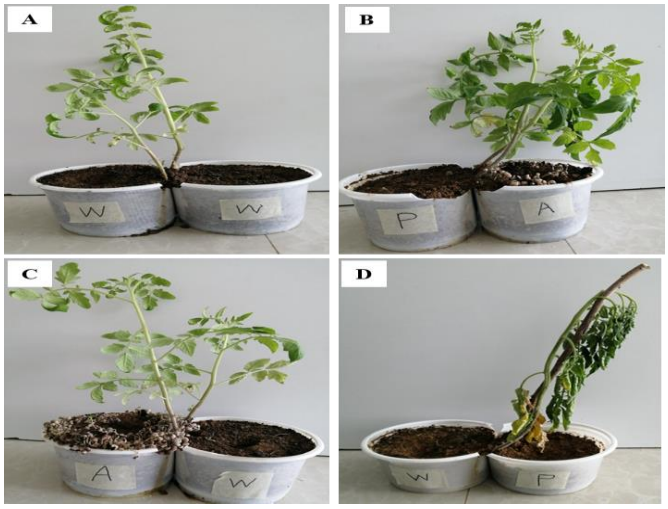
نتایج حاصل از این آزمایش نشان داد که بوته‌های گوجه‌فرنگی در خاک گلدان تیمار شده با قارچ عامل بیماری با میانگین شدت بیماری ۸۴/۵ درصد تقریبا از بین رفته بود ولی بوته‌های موجود در خاک گلدان‌هایی که یک سمت آن عامل بیمارگر و سمت دیگر آن جدایه قارچ اندوفیت مایه‌زنی شده بود با میانگین شدت بیماری ۲۹ درصد و در مقایسه با شاهد آلوده بطور معنی‌داری عملکرد بهتری را نشان داد. جدایه اندوفیت *C. urticicola* M2 با درصد بازدارندگی ۶۵/۶۸ درصد بطور موثری سبب مهار بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی گردید (جدول ۴، شکل ۶).

جدول ۴. ارزیابی تاثیر قارچ اندوفیت *M2* Coprinopsis urticicola **درکاهش شدت بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی با استفاده از دو روش تقسیم ریشه و سیستم برشی ریشه پس از ۳۰ روز در شرایط گلخانه.**

Table 4. Evaluation of the effect of the endophytic fungus *Coprinopsis urticicola* M2 on disease severity reduction of tomato fusarium wilt using two methods of split-root and root-cutting system after 30 days in greenhouse conditions.

Treatment	Disease severity (%)		Disease reduction (%)	
	Split-root	Root-cutting	Split-root	Root-cutting
Pathogen	84.5a ±3.1	81.5a ±2.17	0	0
Water	0±0c	0±0c	100	100
Coprinopsis urticicola	0±0c	0±0c	100	100
C. urticicola +Pathogen	29b ±3.02	28b ±2.15	65.68	65.64

* تیمارهای با حروف مشترک تفاوت معنی‌داری در سطح احتمال آماری پنج درصد ندارند.



شکل ۶. آزمون تقسیم ریشه. A) شاهد سالم، B) اندوفیت- بیمارگر، C) شاهد- اندوفیت و D) شاهد- بیمارگر.

Fig 6. Split-root Test. A) healthy control, B) endophyte-pathogen, C) control- endophyte and D) control-pathogen.

آزمایش برش ریشه

نتایج این بررسی نشان داد که بوته‌های گوجه‌فرنگی در خاک گلدان تیمار شده با قارچ عامل بیماری با میانگین ۸۱/۵ درصد کاملاً بیمار شده بودند ولی بوته‌های موجود در خاک گلدان‌هایی که قبل از مایه‌زنی با قارچ بیمارگر با جدایه اندوفیت *C. urticicola* M2 تیمار شده بودند با میانگین شدت بیماری ۲۸ درصد در مقایسه با شاهد آلوده بطور معنی‌داری شدت بیماری کمتری را نشان دادند. کارایی جدایه اندوفیتی *C. urticicola* M2 در کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی به میزان ۶۵/۶۴ محاسبه گردید (جدول ۴ و شکل ۷).

شکل ۷. آزمون سیستم برشی ریشه: **A) شاهد سالم، B) اندوفیت، C) اندوفیت- بیمارگر و D) بیماگر.**

Fig 7. Root cutting system test: A) healty control, B) endophyte, C) endophyte-pathogen and D) pathogen.

بحث

بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی یکی از بیماری‌های مخرب این محصول در سرتاسر دنیا به شمار می‌رود. شناسایی صحیح بیمارگر و تعیین نژاد آن نقش بسزایی در مدیریت آن بخصوص استفاده از ارقام مقاوم خواهد داشت (Srinivas *et al*. 2019). آزمون بیماری‌زایی برای تعیین فرم اختصاصی و نژاد بیمارگر، علیرغم وقت‌گیر بودن و تأثیر شرایط ناپایدار محیطی روی واکنش ارقام افتراقی، مطمئن‌ترین روش برای طبقه‌بندی بیمارگر براساس اختصاصی بودن میزبانی در داخل کمپلکس گونه‌ای *Fusarium oxysporum* است (Ploetz 2015). با این وجود، در این مطالعه با استفاده از شواهد مولکولی و آغازگرهای اختصاصی، هویت و نژاد قارچ بیمارگر بصورت بیمارگر Fol نژاد ۳ تعیین گردید (شکل ۱ و ۲). در میان سه نژاد تعیین شده برای این بیمارگر، نژاد ۳ دارای پراکنش جغرافیایی محدود می‌باشد (Srinivas *et al*. 2019). این نژاد برای اولین بار در سال ۲۰۱۸ از جنوب غرب ایران گزارش گردید (Pirayesh *et al*. 2018) و این مطالعه دومین گزارش از این بیمارگر از استان کردستان می‌باشد.

در این تحقیق چهار جدایه از قارچ‌های اندوفیت بازیدیومیکوتا شامل *R. endophytica* M32، *R. zeae* M9، *F. inzengae* M40 و *C. urticicola* M2 جدا شده از خانواده گندمیان (Gholami *et al*. 2019) علیه بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از آزمون کشت متقابل در شرایط آزمایشگاه نشان داد که بیشترین میزان بازدارندگی از رشد پرگنه به ترتیب مربوط به جدایه‌های *R. endophytica* M32 و کمترین میزان بازدارندگی مربوط به جدایه *F. inzengae* M40 می‌باشد (شکل ۳). این نتایج احتمالا به دلیل توانایی قارچ *R. endophytica* M32 در رقابت بر سر مواد غذایی و محیط با قارچ عامل بیماری یا تولید متابولیت‌های خارج سلولی بوده است. در مقابل در آزمون متابولیت‌های فرّار بیشترین میزان بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر مربوط به استرین *F. inzengae* M40 و کمترین مربوط به استرین *R. zeae* M9 بود. این نتایج مشابه با نتایج غلامی و همکاران (Gholami *et al*. 2019) بود. قارچ *R. zeae* M9 در روزهای پنجم و هفتم آزمون کشت متقابل بعد از *R. endophytica* M32 بیشترین درصد بازدارندگی را داشت ولی در آزمون متابولیت فرّار کمترین درصد بازدارندگی را نسبت به سایر جدایه‌های اندوفیت نشان داد (شکل ۳ و ۴). این تاثیرات ممکن است به دلیل ترشح آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی، تولید سیدروفور و ترکیبات خارج سلولی ضد قارچی باشد (Gholami *et al*. 2019). در مطالعه‌ای که دو جدایه Hall و R47 از قارچ *R. zeae* در آزمون‌های آزمایشگاهی سبب بازدارندگی از رشد عوامل بیمارگر ریشه چغندر قند شامل *F. oxysporum* f. sp. *betae*، *R. solani* و *Phoma betae*، *P. aphanidermatum* شدند، این دو جدایه در مزرعه سطوح متفاوتی از کنترل در برابر بیماری‌های خاکزاد نشان دادند (Webb *et al*. 2015). همچنین در مطالعه دیگری یک جدایه مزرعه‌ای از گونه *R. zeae* LRNE17E شدت بیماری شوره سیاه سیب‌زمینی را در آزمایش‌های گلخانه‌ای به میزان ۶۰ درصد کاهش داده است (Brewer *et al*. 2005).

در آزمون کشت متقابل متابولیت‌های خارج سلولی نقش بسزایی در کاهش رشد میسلیومی قارچ بیمارگر ایفا می‌کنند. در مطالعه انجام شده توسط غلامی و همکاران (Gholami *et al*. 2019) تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی مانند پروتئاز، کیتیناز و پکتیناز برای جدایه‌های مطالعه شده در این پژوهش اثبات شده است. آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی نقش مهمی را در ممانعت از ایجاد آلودگی توسط بیمارگرهای گیاهی را

دارند (Karimi *et al*. 2017). ترشح آنزیم پکتیناز توسط میکروارگانیسم‌های اندوفیت، سبب تسهیل کلونیزاسیون بافت‌های گیاهی می‌شود و همچنین تجزیه الیگوساکاریدها و قطعات پکتیکی فعال دیواره سلولی گیاه، به عنوان الیسیتورهای درون‌زا عمل کرده و سیستم دفاعی در گیاه را فعال می‌کند (Davis *et al*. 1984). مطالعات حاکی از آن است که پکتیناز تولید شده توسط قارچ *Penicillium oxalicum* سویه BZH-2002 سبب ایجاد مقاومت در برابر *Cladosporium cucumerinum* در خیار می‌گردد (Peng *et al*. 2004).

ترکیبات فرّار هم یکی از سازوکارهای مهم در عوامل کنترل زیستی است. مطالعات مختلف نشان داده است که تولید ترکیبات فرّار ضد قارچی توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها در کاهش بیماری‌های گیاهی نقش مهمی را ایفا می‌کنند (Huang *et al*. 2011؛ Ruangwong *et al*. 2021). همچنین این ترکیبات می‌توانند مقاومت را در گیاه تحریک کرده و همچنین از رشد هیف و جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر جلوگیری کنند (Monte 2001). جدایه‌های اندوفیت در این تحقیق در آزمون تولید ترکیبات فرار قادر به کاهش رشد پرگنه قارچ بیمارگر بودند که نشان‌دهنده تولید این ترکیبات توسط جدایه‌های اندوفیت است.

در این تحقیق تأثیر جدایه‌های اندوفیت بر بیماری پژمردگی فوزاریومی در شرایط گلخانه نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حضور قارچ‌های اندوفیت در محیط اطراف ریشه، گیاه را در برابر هجوم و ایجاد آلودگی توسط قارچ بیمارگر محافظت می‌کند. این نتایج ممکن است به دلیل کلونیزاسیون گیاه و اشغال آشیان اکولوژیک، ایجاد رقابت بر سر مواد غذایی، ترشح ترکیبات فعال زیستی مانند آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی قارچ بیمارگر، تولید سیدروفور و همچنین تحریک مقاومت سیستمیک در میزبان گیاهی باشد (Mates *et al*. 2019). تاثیر قارچ *C. urticicola* M2 بر شاخصه‌های رشدی در شرایط گلخانه نشان داد که قارچ اندوفیت به تنهایی و در غیاب قارچ عامل بیماری سبب افزایش شاخصه‌های رشدی گیاه حتی بیشتر از تیمار سالم شد که می‌تواند به دلیل توانایی این قارچ در تولید مواد تنظیم‌کننده رشد گیاه باشد. همچنین احتمالاً این قارچ اندوفیت با تولید متابولیت‌های فرّار که از خلل و فرج خاک عبور می‌کند، باعث مهار رشد قارچ بیمارگر و تحریک رشد گیاه می‌گردد. براساس مطالعاتی ثابت شده است که ترکیبات فرّار که به وسیله قارچ‌های اندوفیت ترشح می‌شود علاوه بر این که در برهمکنش‌های بین گیاه و قارچ نقش دارد می‌توانند با گیاه میزبان نیز برهمکنش داشته و رشد گیاه میزبان را افزایش دهند (Hung *et al*. 2013). بسیاری از استرین‌های قارچ تریکودرما که معمولاً در خاک‌های اطراف ریشه یافت شده‌اند ترکیبات فرّار متنوعی را تولید کردند که به طور قابل توجهی زیست توده(Biomass)، اندازه گیاه، محتوای کلروفیل و اندازه ریشه را در گیاه گوجه‌فرنگی و آرابیدوبسیس با توجه به مدت زمان در معرض قرار گرفتن ریشه با این ترکیبات افزایش دادند (Lee *et al*. 2015). همچنین افزایش رشد گیاه در اثر فعالیت قارچ‌های اندوفیتی می‌تواند باعث فرار و جبران خسارت ناشی از بیماری شود (Gholami *et al*., 2019).

قارچ اندوفیت *C. urticicola* M2 در کنترل قارچ بیمارگر نسبت به سایر جدایه‌ها در آزمایشات گلخانه‌ای عملکرد بهتری داشت. دلیل این موفقیت ممکن است ناشی از سرعت بالای کلونیزاسیون خاک و ریشه و توانایی بالای این قارچ در رقابت بر سر فضا و مواد غذایی باشد که با توجه به ظهور بازیدیوکارپ قارچ اندوفیت در سطح خاک گلدان و همچنین مشاهده هیف‌های آن در خاک گلدان و سطح ریشه مورد انتظار است (Gholami *et al*. 2019). در آزمون برش ریشه، بوته‌های رشد یافته در حضور اندوفیت و بدون حضور بیمارگر کاهش رشدی را نسبت به شاهد سالم نشان دادند که احتمالا به علت تاخیر در ریشه زایی

بوته بریده شده در اثر کلونیزاسیون بالای خاک گلدان توسط اندوفیت در نتیجه محدودیت فضا و مکان باشد. نتایج دو آزمایش تقسیم و برش ریشه نشان داد که قارچ اندوفیت *C. urticicola* M2 علاوه بر کلنیزاسیون ریشه سبب تحریک مقاومت گیاه گوجه‌فرنگی علیه قارچ بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* نیز می‌شود. در مطالعه‌ای سازوکار اندفیت قارچی بازیدیومایکوتا *Serendipita indica* در کاهش بیماری ناشی از بیمارگر *F. oxysporum* f.sp. *cubensis* در گیاه موز به القای مقاومت از طریق افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی اکسیدانتی در گیاه میزبان نسبت داده شد (Cheng *et al*. 2020).

نتیجه گیری کلی

بدلیل لزوم کاهش مصرف سموم شیمیایی ناشی از ماندگاری بالای آن‌ها در طبیعت، ایجاد آلودگی زیست‌محیطی، باقی‌مانده‌ها در محصولات کشاورزی، تهدید سلامت غذایی، ظهور نژادهای مقاوم بیمارگرهای گیاهی در برابر سموم، عدم آگاهی کشاورزان از نوع سموم و نحوه به کارگیری موثر آن‌ها امروزه یافتن و توسعه عوامل مهار زیستی لازم و ضروری به نظر می‌رسد. نتایج این مطالعه نشان داد که اندوفیت‌های قارچی بررسی شده در این مطالعه پتانسیل قابل‌توجهی در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه فرنگی دارند. با این وجود جهت استفاده مؤثر و موفق از این عوامل، مطالعات اکولوژیکی و سازگاری این عوامل باید در اولویت بررسی قرار بگیرد. بدون شک ایمنی و ارزش کاربرد این عوامل در جهت مدیریت بیماری‌های گیاهی به صورت موثر، در شرایط مزرعه تعیین می‌گردد.

سپاسگزاری

این پژوهش مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده دوم می‌باشد که با حمایت مالی دانشگاه کردستان انجام شده است.

منابع

Refrences

Agrios G. N. 2005. Plant Pathology, 5th ed. Academic Press, 635 pp.

Amini J. 2009. Induced resistance in tomato plants against Fusarium wilt invoked by nonpathogenic *Fusarium*, chitosan and Bion. The Plant Pathology Journal 25(3): 256-262.

Anke T., Oberwinkler F., Steglich W. and Schramm G. 1977. The strobilurins-new antifungal antibiotics from the basidiomycete *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. The Journal of Antibiotics 30(10): 806-810.

Asad S. A. 2022. Mechanisms of action and biocontrol potential of *Trichoderma* against fungal plant diseases-A review. Ecological Complexity 49: 100978.

Behdad E. 1982. Pests of field crops in Iran. Neshat, Esfahan, Iran. 589 pp.

Bora T., Ozaktan H., Gore E. and Aslan E. 2004. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* by wettable powder formulation of the two strain of *Pseudomonas putida*. Journal of Phytopathology 152: 471-475.

Brewer M. T. and Larkin R. P. 2005. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. Crop Protection 24: 939-950.

Cha J. Y., Han S., Hong H. J., Cho H., Kim D., Kwon Y., Kwon S. K., Crüsemann M., Bok Lee Y., Kim J. F. and Giaever G. 2016. Microbial and biochemical basis of a Fusarium wilt-suppressive soil. The ISME journal 10(1): 119-129.

Chaudhary P., Agri U., Chaudhary A., Kumar A. and Kumar G. 2022. Endophytes and their potential in biotic stress management and crop production. Frontiers in Microbiology 13: 933017.

Cheng C., Li, D., Qi, Q., Sun, X., Anue, M.R., David, B.M., Zhang, Y., Hao, X., Zhang, Z. and Lai, Z. 2020.

The root endophytic fungus *Serendipita Indica* improves resistance of banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4. European Journal of Plant Pathology 156: 87-100.

Davis K. R., Lyon G. D., Darvill A. G. and Albersheim P. 1984. Host-pathogen interactions: XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. Plant Physiology 74(1): 52-60.

Dennis C. and Webster J. 1971a. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I, production of non-volatile antibiotics. Transactions of British Mycology Society 57: 25-39.

Dennis C. and Webster J. 1971b. Antagonistic Properties of Species Groups of *Trichoderma*. III. Hyphal Interactions. Transactions of British Mycology Society 57: 363-369.

Dorais M., Ehret D. L. and Papadopoulos A. P. 2008. Tomato (*Solanum lycopersicum*) health components: from the seed to the consumer. Phytochemistry Reviews 7: 231-250.

Fadiji A. E. and Babalola O. O. 2020. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology 8: 467.

Fontana D. C., de Paula S., Torres A. G., de Souza V. H. M., Pascholati S. F., Schmidt D. and Dourado Neto D. 2021. Endophytic fungi: biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. Pathogens 10(5): 570.

Food and Agriculture Organization. 2021. Production data. http://faostat3.fao.org/download/Q/*/E.

Gasoni A. B. and Gurfinkel B. S. 2009. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* by the endophytic fungus *Cladorrhinum foecundissimum* in cotton plants. Australasian Plant Pathology 38: 389-391.

Gholami M., Amini J., Abdollahzadeh J. and Ashengroph M. 2019. Basidiomycetes fungi as biocontrol agents against take-all disease of wheat. Biological Control 130: 34-43.

Hirano Y. and Arie T. 2006. PCR-based differentiation of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radicis-lycopersici* and races of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Journal of General Plant Pathology 72: 273-283.

Huang R., Li G. Q., Zhang J., Yang L., Che H. J., Jiang D. H. and Huang H. C. 2011. Control of postharvest *Botrytis* fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. Phytopathology 101(7): 859-869.

Hung R., Lee S. and Bennett J. W. 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effects of *Trichoderma* volatile organic compounds. Fungal Ecolology 6: 19-26.

Hwang B. K., Lim S. W., Kim B. S., Lee J. Y. and Moon S. S. 2001. Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. Applied and Environmental Microbiology 67: 3739-3745.

Jo C. H., Lee Y. G., Shin W. H., Kim H., Chai J. W., Jeong E. C. and Yoon K. S. 2014. Intra articular injection of mesenchymal stem cells for the treatment of osteoarthritis of the knee: a proof concept clinical trial. Stem Cells 32(5): 1254-1266.

Jones J. B., Jones J. P., Stall R. E. and Zitter T. A. 1991. Compendium of tomato diseases. first edition, Minnesota: APS Press, 100 pp.

Karimi K., Babai Ahari A., Arzanlou M., Amini J. and Pertot I. 2017. Comparison of indigenous *Trichoderma* spp. strains to a foreign commercial strain in terms of biocontrol efficacy against *Colletotrichum nymphaeae* and related biological features. Journal of Plant Disease and Protection 124: 453-466.

Kavroulakis N., Ntougias S., Zervakis G. I., Ehaliotis C., Haralampidis K. and Papadopoulou K. K. 2007. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* strain. Journal of Experimental Botany 58: 3853-3864.

Lee S., Hung R., Yap M. and Bennett J. W. 2015. Age matters: the effects of volatile organic compounds emitted by *Trichoderma atroviride* on plant growth. Archives of Microbiology 197: 723-727.

Lu Z. X., Laroche A. and Huang H. C. 2005. Isolation and characterization of chitinases from *Verticillium lecanii*. Canadian Journal of Microbiology 51(12): 1045-1055.

Martini M., Musetti R., Grisan S., Polizzotto R., Borselli S., Pavan F. and Osler R. 2009. DNA-dependent detection of the grapevine fungal endophytes *Aureobasidium pullulans* and *Epicoccum nigrum*. Plant Disease 93(10): 993-998.

Martinez-Medina A., Pascual J. A., Pérez-Alfocea F., Albacete A. and Roldán A. 2010. *Trichoderma harzianum*

and *Glomus intraradices* modify the hormone disruption induced by *Fusarium oxysporum* infection in melon plants. Phytopathology 100(7): 682-688.

Mates A. D. P. K., de Carvalho Pontes N. and de Almeida Halfeld-Vieira B. 2019. *Bacillus velezensis* GF267 as a multi-site antagonist for the control of tomato bacterial spot. Biological Control 137: 104013.

Möller E. M., Bahnweg G., Sandermann, H. and Geiger H. H. 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. Nucleic Acids Research 20(22): 6115-6116.

Monte E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. International Microbiology 4(1): 1-4.

Mwangi M. W., Muiru W. M., Narla R. D., Kimenju J. W. and Kariuki G. M. 2019. Management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and root-knot nematode disease complex in tomato by use of antagonistic fungi, plant resistance and neem. Biocontrol Science and Technology 29(3): 229-238.

O'Donnell K., Kistler H. C., Cigelnik E. and Ploetz R. C. 1998. Multiple evolutionary origins of the fungus causing panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. Proceedings of the National Academy of Sciences 95(5): 2044-2049.

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

Peng X., Zhang H., Bai Z. and Li B. 2004. Induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber by pectinases extracted from *Penicillium oxalicum*. Phytoparasitica 32(4): 377-387.

Pirayesh S., Zamanizade H. and Morid B. 2018. Molecular identification of physiological races of *Fusarium oxysporum* ff. sp. *lycopersici* and *radices-lycopersici* causal agent of Fusarium wilt of tomato in Iran. Journal of Agricultural Science and Technology 20(1): 193-202.

Ploetz R. C. 2015. Fusarium wilt of banana. Phytopathology 105: 1512-1521.

Ramawat K. G. and Merillon J. M. 2013. Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpens. Berlin, Germany: Springer, 1541-2662 pp.

Rajulu M. B. G., Thirunavukkarasu N., Suryanarayanan T. S., Ravishankar J. P., El Gueddari N. E. and Moerschbacher B. M. 2011. Chitinolytic enzymes from endophytic fungi. Fungal Diversity 47(1): 43-53.

Redman R. S., Anderson J. A., Biaggi T. M., Malmberg K. E., Rienstra M. N., Weaver J. L. and Rodriguez R. J. 2022. Symbiotic modulation as a driver of niche expansion of coastal plants in the San Juan Archipelago of Washington State. Frontiers in Microbiology 13: 868081.

Rungjindamai N., Pinruan U., Choeyklin R., Hattori T. and Jones E. B. G. 2008. Molecular characterization of basidiomycetous endophytes isolated from leaves, rachis and petioles of the oil palm, *Elaeis guineensis*, in Thailand. Fungal Diversity 33: 139-161.

Ruangwong O. U., Wonglom P., Suwannarach N., Kumla J., Thaochan N., Chomnunti P. and Sunpapao A. 2021. Volatile organic compound from *Trichoderma asperelloides* TSU1: impact on plant pathogenic fungi. Journal of Fungi 7(3): 187.

Russell J. R., Huang J., Anand P., Kucera K., Sandoval A. G., Dantzler K. W., Hickman D., Jee J., Kimovec F. M., Koppstein D. and Marks D. H. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. Applied and Environmental Microbiology 77(17): 6076-6084.

Srinivas C., Devi D. N., Murthy K. N., Mohan C. D., Lakshmeesha T. R., Singh B., Kalagatur N. K., Niranjana S. R., Hashem A., Alqarawi A. A. and Tabassum B. 2019. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity–A review. Saudi Journal of Biological Sciences 26(7): 1315-1324.

Sivanandhan S., Khusro A., Paulraj M. G., Lgnacimuthu S. and mAl-Dhabi N. A. 2017. Biocontrol properties of basidiomycetes: An overview. Journal of Fungi 3(1): 2.

Wang L. W., Xu B. G., Wang J. Y., Su Z. Z., Lin F. C., Zhang C. L. and Kubicek, C. P. 2012. Bioactive metabolites from *Phoma* species, an endophytic fungus from the Chinese medicinal plant *Arisaema erubescens*. Applied Microbiology and Biotechnology 93: 1231-1239.

Webb K. M., Harveson R. M. and West M. S. 2015. Evaluation of *Rhizoctonia zeae* as a potential biological

control option for fungal root diseases of sugar beet. Annals of Applied Biology 167(1): 75-89.
Wemheuer B., Thomas T. and Wemheuer F. 2019. Fungal endophyte communities of three agricultural important grass species differ in their response towards management regimes. Microorganisms 7: 37.
Zhao J., Shan T., Mou Y. and Zhou L. 2011. Plant-derived bioactive compounds produced by endophytic fungi. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 11: 159-168.