کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۹ (۱۱۴-۱۰۳) مقاله پژوهشی DOI: 10.22059/jbioc.2021.313455.294

ارزیابی برخی قارچ‌های اندوفیت گیاهی در کنترل بیولوژیک بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی گوجه‌فرنگی

محدثه زراعتکار[۱]، کیوان بهبودی[۲*] و خلیل بِردی فتوحی فر[۲]
۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه تهران
۲. دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه تهران
(تاریخ دریافت: ۹۹/۰۸/۲۱ - تاریخ پذیرش:۹۹/۱۱/۲۸)

چکیده

بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی با عامل ***Verticillium dahliae*** یکی از بیماری‌های مهم گوجه‌فرنگی می‌باشد، به همین دلیل کنترل این بیماری و از جمله کنترل بیولوژیک آن مورد توجه جدی می باشد. قارچ های اندوفیت یکی از عوامل کنترل بیولوژیک محسوب می شوند که علاوه بر کنترل بیماری‌های گیاهی باعث بهبود رشد در گیاه میزبان می‌شوند. در این پژوهش پتانسیل بیوکنترلی چند جدایه از قارچ‌های اندوفیت گیاهی علیه عامل پژمردگی ورتیسیلیومی گوجه‌فرنگی، به ترتیب به روشهای کشت متقابل در محیط غذایی **PDA**، آزمون های مختلف آزمایشگاهی و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. براساس نتایج بدست آمده، سه گونه قارچ اندوفیت ***Nigrospora oryzae***، ***Chaetomium globosum*** و ***Coniolariella limonispora*** انتخابی از آزمون کشت متقابل، علاوه بر کاهش میزان جوانه زنی میکرواسکلروت های ***V. dahliae*** قادر به تولید آنزیم‌های سلولاز و کیتیناز و همچنین تولید هورمون اکسین بودند، و قارچ ***N. oryzae*** با میزان ۱۷/۶۲۵ میلی گرم در لیتر بیشترین میزان هورمون اکسین را تولید کرد. در بررسی‌های گلخانه‌ای و تحت شرایط آلودگی مصنوعی در خاک گلدان، قارچ اندوفیت ***N. oryzae*** سبب بیشترین میزان کاهش شدت علائم پژمردگی ورتیسیلیومی (۶۷/۶۱ درصد) در نشاهای گوجه فرنگی رقم حساس فلات در مقایسه با شاهد شد. مقایسه میانگین‌های برخی شاخص های رشد نشان داد که این قارچ ***(N. oryzae)*** تاثیر معنی داری درافزایش طول ساقه، ریشه و وزن تر گیاه نسبت به سایر تیمارها داشت. قارچ اندوفیت ***Nigrospora oryzae*** به عنوان قارچ اندوفیت برتر در این بررسی با بیشترین تاثیر بر کاهش شدت بیماری ***V. dahliae*** و افزایش طول ساقه، ریشه و وزن تر گیاه انتخاب شد.

واژه های کلیدی: کشاورزی پایدار، قارچ، بیماری گیاهی، *Verticillium dahliae*.

Evaluation of Some Plant Endophytic Fungi in Biological Control of Tomato Verticillium Wilt Disease

Mohadasa Zeratkar[1], Keivan Behboudi[2*] and Khalil-Berdi Fotouhifar[2]
1. M.SC. Student, Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran. 2. Associate Professor, Department of Plant Protection, University of Tehran, Karaj, Iran. * Corresponding Author.
(ReceivedNovember 11, 2020- AcceptedFebruary 16, 2021)

Abstract

Verticillium wilt disease caused by *Verticillium dahliae* is one of the most important diseases of tomato, for this reason, the control of this disease, including biological control is of serious interest. Endophytic fungi are one of the biological control agents that in addition to controlling plant diseases, improve growth in the host plant. In this study, the biocontrol potential of several isolates from plant endophytic fungi against tomato verticillium wilt was evaluated by dual culture methods in PDA, various laboratory and greenhouse test, respectively. Base on the results, three species of *Nigrospora oryzae*, *Chaetomium globosum and Coniolariella limonispora* selected from dual culture test, in addition to reducing the germination rate of microscelerotia of *V. dahliae*, they were able to produce cellulase and chitinase enzymes as well as the production of auxin. *N. oryzae* produced the highest amount of auxin with a production of 17.625 mg/l. In greenhouse studies and under conditions of artificial contamination in potting soil, *N. oryzae* endophytic fungus caused the greatest reduction in the severity of symptoms of verticillium wilt (67.61%) in tomato seedlings of sensitive Falat cultivar compared to the control. Comparison of the means of some growth indices showed that this fungus (*N. oryzae*) had a significant effect on increasing stem and root length, and fresh weight of the plant compared to other treatments. *Nigrospora oryzae* endophytic fungus was selected as the superior endophytic fungus in this study with the greatest effect on reducing the severity of *V. dahliae* disease and increasing stem and root length and fresh weight of the plant.

Keywords: Sustainable Agriculture, Fungus, Plant Disease, *Verticillium dahliae*.

E-mail: behbodi@ut.ac.ir

مقدمه

بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی یکی از بیماری‌های مخرب و متداول گیاه گوجه‌فرنگی می‌باشد که باعث لکه برگی- های زرد- قرمز، کلروز آوندی، پژمردگی، کوتولگی، کاهش عملکرد، کاهش رشد و کیفیت میوه و بوته میری در گیاهان میزبان می‌گردد (Xiao & Subbarao, 2000). عامل آن گونه‌های قارچ خاکزاد *Verticillium* شامل *V. nigrescens*، *V. nubilum*، *V. tricorpus*، *V. dahliae* و *V. albo-atrum* می‌باشد. این قارچ های بیمارگر باعث پژمردگی آوندی در طیف وسیعی از گیاهان زراعی و ایجاد زیان گسترده اقتصادی می‌گردند که نه‌تنها محدودکننده رشد محصولات زراعی مهم اقتصادی به‌ویژه گوجه‌فرنگی می‌باشد، بلکه در سبزیجات، میوه‌جات و گیاهان زینتی نیز خسارت ایجاد می‌نماید. قارچ بیمارگر *V. dahliae* سبب بروز بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی در بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی می‌شود و سالانه میلیون‌ها دلار خسارت در سراسر جهان به وجود می‌آورد (Klosterman *et al*., 2009). کنترل این بیماری به‌دلیل قدرت بقای زیاد بیمارگر از طریق اندام استراحتی میکرواسکلروت، دامنه میزبانی وسیع، مقاومت به قارچکش‌ها و محل استقرار در گیاه (سیستم آوندی ریشه)، بسیار مشکل می‌باشد (Wang *et al*., 2014). بیماری‌های خاکزاد محصولات گلخانه ای به طور عمده از طریق ضد عفونی شیمیایی خاک مانند استفاده از متیل‌بروماید در سیستم‌های کشت معمولی و استفاده از بخار آب خاک در سیستم‌های تولید ارگانیک گلخانه‌ای کنترل می‌شوند. هر دو روش به میزان قابل توجه با مشکلات زیست محیطی و یا سلامتی انسان مرتبط‌اند. به‌عنوان مثال متیل‌بروماید در کمک به کاهش لایه اوزون، افزایش اشعه uv-B، خطر ابتلا به سرطان پوست و بروز بیماری آب مروارید در انسان شناخته شده است و امروزه مصرف آن در جهان منسوخ شده است و تیمار بخار آب باعث افزایش قابل توجه مصرف انرژی در گلخانه می‌شود. همچنین هر دو روش اثرات منفی بر میکروفلور و فون مفید خاک دارد و نیاز به شیوه های مدیریتی جایگزین روز به روز تشدید می‌شود (Uppal *et al*., 2008).

به‌منظور کاهش میزان تخریب محیط زیست ناشی از مصرف بیش از حد سموم آلی و گازهای سمی، کنترل بیولوژیک به‌طور گسترده به‌عنوان یک روش کارآمد جدید برای از بین بردن حشرات و بیمارگرها و پالایش محیط زیست استفاده می‌گردد (Daguerre *et al*., 2014). کنترل بیولوژیک به‌عنوان روشی در استفاده از موجودات زنده مفید، ژن‌ها و تولیدات آن‌ها مانند متابولیت‌ها برای کاهش خسارت آفات و بیماری‌های گیاهی و ارتقا سلامت گیاهان تعریف می‌شود (Tranier *et al*., 2014). استفاده از اندوفیت‌ها یکی از روش‌های کنترل بیماری‌های گیاهی با حداقل تاثیر بر محیط زیست است. اندوفیت‌های گیاهی بخشی از جامعه میکروبی هر گیاه‌اند که درون بافت‌های سالم گیاهی زندگی می‌کنند و تمام یا بخشی از چرخه زندگی خود را با کلونیزاسیون فضای داخلی یا بین سلولی بافت‌های گیاهی می‌گذرانند و کلونیزاسیون آنها منجر به علائم بیماریزایی قابل رویت در گیاه نمی‌شود (Gautam & Avasthi, 2019). در اولین گزارش کنترل بیماری‌های گیاهی با استفاده از قارچ‌های اندوفیت گیاهی، با بررسی اثر سوسپانسیون مایع قارچ‌های اندوفیت علیه قارچ‌های بیماریزای گیاهی، مشخص شد که قارچ‌های اندوفیت به‌دلیل خواص آنتی بیوتیکی خود قادر به کنترل بیماری‌های گیاهی می‌باشند (Liu *et al*., 2001). همچنین قارچ های اندوفیت در طول تعامل با گیاه میزبان باعث بهبود رشد گیاه، افزایش جذب و ذخیره مواد غذایی، تولید متابولیت‌های ثانویه مفید، افزایش مقاومت گیاه در برابر بیمارگرها و گیاهخواران، افزایش تحمل گیاه به تنش‌های محیطی می‌شوند (Mishra *et al*., 2014). جابنون- خیرالدین و همکاران، تاثیر گونه های *Trichoderma* را روی رشد شعاعی *V. dahliae* و مهار تولید و جوانه زنی اسکلروت در مقایسه با شاهد بررسی کردند. جدایه های *Trichoderma* باعث تغییرات عمیق در میسلیوم *V. dahliae* در مناطق رویارویی شدند و میکرواسکلروت بالغ *V. dahliae* به تدریج رنگ تیره خود را از دست داد. در شرایط گلخانه گیاهان گوجه فرنگی که در مرحله نشا با سوسپانسیون اسپوری *Trichoderma* و *V. dahliae* تلقیح شده بودند، بعد از ۶۰ روز کاهش شدت بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی را در مقایسه با گیاهان شاهد تلقیح شده و تیمار نشده نشان دادند و گیاهان تیمار شده با جدایه های *Trichoderma* افزایش ارتفاع و وزن تر و خشک ریشه و ساقه را در مقایسه با گیاهان شاهد تلقیح شده و تیمار نشده نشان دادند (Jabnoun-Khiareddine *et al*. 2009). کنترل بیولوژیک پژمردگی

ورتیسیلیومی گوجه فرنگی با عامل *V. albo-atrum* را با استفاده از قارچ های آنتاگونیست جدا شده از ریزوسفر گوجه فرنگی بررسی شده است بطوریکه در منطقه رویارویی بیمارگر و آنتاگونیست در کشت متقابل با *Penicillium chrysogenum* Thom باعث محدود شدن رشد بیمارگر شده است و قارچهای *Fusarium culmorum* (S.G. Sm)، *Trichoderma viride*، *Gliocladium* spp. و *Penicillium vermiculatum* باعث توقف رشد بیمارگر از طریق نفوذ و رشد روی آن شده اند (Dutta 1981). نراقی و همکاران از قارچ آنتاگونیست *Talaromyces flavus* برای کنترل پژمردگی ورتیسیلیومی گوجه فرنگی استفاده کرد. این قارچ دارای توانایی تصرف و اشغال ریزوسفر میزبان، کاهش وقوع پژمردگی، کاهش جوانه زنی میکرواسکلروت بیمارگر و افزایش عملکرد گیاه بوده است (Naraghi *et al.* 2010). زنگ و همکاران ، با استفاده از جدایه های قارچی به دست آمده از اندو ریزوسفر، ریزوسفر و خاک مزرعه پنبه به مطالعه کنترل زیستی پژمردگی ورتیسیلیومی پنبه پرداختند. پتانسیل بیوکنترلی را براساس فعالیت آنتاگونیستی و فعالیت آنزیم های تخریب کننده دیواره سلولی قارچی شامل پروتئاز، سلولاز و کیتیناز و پتانسیل بهبود رشد گیاهی را بر اساس فعالیت انحلال فسفات و تثبیت ازت در آزمایشگاه بررسی کردند. در نهایت آنتاگونیست های برتر را برای بررسی پتانسیل بیوکنترل و بهبود رشد گیاه پنبه در شرایط گلخانه انتخاب نمودند (Zheng *et al*. 2011). در این بررسی قدرت آنتاگونیستی تعدادی از قارچ های اندوفیت گیاهی علیه *V. dahliae* با هدف یافتن بهترین و قوی ترین جدایه اندوفیت جهت کنترل بیولوژیک پژمردگی ورتیسیلیومی گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه با یکدیگر مقایسه شده است.

مواد و روش ها

تهیه قارچ عامل بیماری و قارچ‌های اندوفیت

جدایه قارچ بیمارگر غیر برگریز *Verticillium dahliae* بدست آمده از گیاه گوجه فرنگی از موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی تهران تهیه شد. ۱۶ قارچ اندوفیت گیاهی شامل *Nigrospora oryzae*، *Alternaria longipes*، *Fusarium tricinctum*، *Alternaria alternata*، *Acreomonium sclerotigenum*، *Absidia spinose*، *Paraconiothyrium fuckelii*، *Aureobasidium pullulans*، *Coniolariella limonispora*، *Chaetomium globosum*، *Aureobasidium namibia*، *Clonostachys rosea*، *Epicoccum nigrum*، *Fusarium solani*، *Alternaria atra* و *Trichothecium roseum* از آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران تهیه شدن (Abdollahi Aghdam & Fotouhifar 2017; Jam Ashkezari & Fotouhifar 2017).

آزمون‌های آزمایشگاهی

رقابت تغذیه ای از طریق کشت متقابل

به منظور انتخاب جدایه‌های مناسب قارچ های اندوفیت، از آزمون کشت متقابل استفاده گردید. ابتدا محیط کشت PDA در تشتک‌های نُه سانتی‌متری سترون آماده شد. یک قرص ۰/۵ سانتی‌متری از حاشیه پرگنه تازه قارچ بیمارگر در کناره تشتک با فاصله یک سانتی‌متری از لبه تشتک قرار داده شد. سپس، بعد از گذشت سه روز در نقطه مقابل قرص ۰/۵ سانتی‌متری مربوط به قارچ آنتاگونیست با فاصله یک سانتی‌متری از لبه تشتک کشت داده شد. در تشتک شاهد قرص ۰/۵ سانتی‌متری بیمارگر و در مقابل آن از قرص ۰/۵ سانتی‌متری آگار استفاده شد. تشتک‌های پتری درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس تا زمان رشد کامل قارچ بیمارگر در تشتک شاهد نگهداری شدند و قطر پرگنه بیمارگر در تیمار اندازه گیری شد. درصد بازدارندگی از رشد شعاعی پرگنه بیمارگر با استفاده از فرمول $PIRG\ (\%) = [\ (R_1 - R_2)/R_1] \times 100$ در مقایسه با شاهد محاسبه گردید. در این فرمول PIRG ، درصد بازدارندگی رشد شعاعی بیمارگر، R_1 رشد شعاعی بیمارگر در تیمار شاهد و R_2 رشد شعاعی بیمارگر در تیمار حاوی بیمارگر و آنتاگونیست هستند. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۱۶ تیمار و ۳ تکرار انجام گردید (Sonawane *et al*., 2015).

از میان ۱۶ گونه قارچی اندوفیت، جدایه هایی برای بررسی‌های بعدی آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انتخاب شدند که سرعت رشد پرگنه آنها از سرعت رشد پرگنه بیمارگر بیشتر بوده و سریع تر پرگنه بیمارگر را پوشاندند. سپس این قارچ‌ها جهت انتخاب بهترین و قوی‌ترین قارچ اندوفیت در کاهش شدت بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی

گوجه‌فرنگی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه با یکدیگر مقایسه شدند.

اثر متابولیت‌های فرار جدایه‌های اندوفیت در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر

بدین‌منظور از کشت‌های تازه‌ی سه قارچ آنتاگونیست *Nigrospora oryzae*، *Chaetomium globosum* و *Coniolariella limonispora* و قارچ بیمارگر استفاده گردید. قرص‌های ۰/۵ سانتی‌متری هر کدام از قارچ‌های آنتاگونیست و قارچ بیمارگر به صورت جداگانه روی محیط PDA در مرکز تشتک‌های پتری قرار داده شدند. سپس تشتک پتری حاوی قارچ بیمارگر به صورت معکوس روی تشتک پتری حاوی قارچ آنتاگونیست قرار داده شد و با استفاده از پارافیلم به یکدیگر متصل شدند. در تشتک شاهد از قرص آگار به جای قارچ آنتاگونیست استفاده شد. تشتک‌های پتری درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس تا زمان رشد کامل قارچ بیمارگر در تشتک پتری شاهد قرار گرفتند. سپس در صد بازدارندگی از رشد میسلیومی بیمارگر بر اساس فرمول محاسبه گردید. . این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۳ تیمار و ۳ تکرار انجام گردید (Naraghi *et al*., 2010).

اثر قارچ‌های اندوفیت روی جوانه‌زنی میکرواسکلروت *Verticillium dahliae*

ابتدا *V. dahliae* در محیط کشت PDB رشد داده شد و به‌مدت یک هفته در شیکر انکوباتور با دمای ۲۰ درجه سلسیوس و سرعت ۱۸۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. سپس به‌منظور تشکیل میکرواسکلروت، ۵۰ گرم پرلیت دو بار سترون شده در اتوکلاو (هر بار به مدت ۳۰ دقیقه در فاصله زمانی ۲۴ ساعت) با ۵۰ میلی‌لیتر کشت مایع *V. dahliae* تلقیح شد و به‌مدت سه ماه در دمای اتاق نگهداری شد. آزمون با کمی تغییرات انجام شد. پس از تشکیل میکرواسکلروت‌ها روی پرلیت، جداسازی دانه‌های پرلیت و میکرواسکلروت از هم در شرایط سترون زیر هود انجام شد. سپس سه گرم میکرواسکلروت با پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون مخلوط و هاون شد. پس از شش مرتبه رقیق سازی، به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از این مخلوط روی هر تشتک PDA پخش شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۰ درجه سلسیوس داخل انکوباتور گذاشته شدند. پس از گذشت دو روز از پخش سوسپانسیون میکرواسکلروت‌ها روی محیط کشت، شروع جوانه زنی میکرواسکلروت‌ها در تشتک‌های پتری دیده شد، که قرص ۰/۵ سانتی‌متری هر کدام از سه قارچ آنتاگونیست که به‌مدت یک هفته در محیط PDA کشت شده بودند، در مرکز تشتک‌ها قرار داده شد. تشتک شاهد نیز فقط با سوسپانسیون 10^7 میکرواسکلروت بیمارگر در میلی‌لیتر آلوده شده و پس از گذشت یک هفته درصد جوانه‌زنی و رشد میکرواسکلروت-ها با آن سنجیده شد (Jabnoun-Khiareddine *et al*., 2009).

توان تولید مواد ضدقارچی توسط جدایه‌های اندوفیت

در ابتدا سوسپانسیون اسپوری 10^7 اسپور در میلی‌لیتر از قارچ بیمارگر و هر یک از سه قارچ آنتاگونیست تهیه شد. بدین منظور هرکدام از این قارچها در محیط PDA کشت شده و به‌مدت یک هفته درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. سپس اسپورهای قارچی با پنج میلی‌لیتر آب مقطر سترون از تشتک‌ها شسته و جمع‌آوری شدند و با استفاده از لام هموسایتومتر تعداد اسپورهای قارچی شمارش شد و غلظت اسپوری 10^7 اسپور در میلی‌لیتر قارچ بیمارگر و هرکدام از قارچ‌های آنتاگونیست تهیه شد. برای انجام این آزمون ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپوری 10^7 قارچ بیمارگر در پنج میلی‌لیتر محیط کشت PDB کشت داده شد و به‌مدت سه روز درون شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور هرکدام از قارچ‌های آنتاگونیست به‌طور جداگانه به هر یک از نمونه‌ها اضافه شد و به مدت سه روز درون شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. درنهایت خصوصیات مورفولوژیکی ریسه‌های قارچی با بینوکولر در مقایسه با شاهد بررسی شدند. در این آزمون در فالکون شاهد از آب مقطر سترون به جای سوسپانسیون قارچ‌های آنتاگونیست استفاده شد (Masih & Paul, 2002).

فعالیت سلولازی، فعالیت کیتینازی و توانایی تولید توکسین جدایه‌های اندوفیت

برای بررسی فعالیت سلولازی قارچ‌های آنتاگونیست، محیط کشت زایموگرام حاوی سدیم نیترات دو گرم، دی پتاسیم هیدروژن فسفات یک گرم، سولفات منیزیم ۰/۵ گرم، کلرید پتاسیم ۰/۵ گرم، کربوکسی متیل سلولز دو گرم، پپتون مخصوص میکروبیولوژی ۰/۲ گرم و آگار ۱۷ گرم در لیتر تهیه شد سپس قرص‌های ۰/۵ سانتی‌متری قارچ‌های آنتاگونیست روی محیط کشت زایموگرام کشت داده شدند. بعد از هفت روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تشتک‌ها با استفاده از کنگورد رنگ آمیزی شدند تا قارچ‌های سلولیتیک از طریق ایجاد هاله شفاف شناسایی شوند (Ghose *et al.*, 1987).

به‌منظور بررسی فعالیت کیتینازی هرکدام از قارچ-های آنتاگونیست محیط کیتین کلوئیدال آگار CCA (کیتین کلوئیدال ۰/۵ درصد، Na_2HPO_4 ۰/۲ درصد، KH_2PO ۰/۱ درصد، NH_4Cl ۰/۱ گرم، NaCl ۰/۰۵ درصد، $MgSO_4\ 7H_2O$ ۰/۰۵ درصد، $CaCl_2\ 2H_2O$ ۰/۰۵ درصد، عصاره مخمر ۰/۰۵ درصد، آگار دو درصد) تهیه گردید. سپس قرص ۰/۵ سانتی‌متری هر کدام از قارچ‌های آنتاگونیست روی این محیط کشت شدند. سپس تشتک‌ها به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. وجود یا عدم وجود هاله شفاف مبنی بر هیدرولیز کیتین و فعالیت کیتینازی آنتاگونیست‌ها ارزیابی گردید (Hsu & Lockwood, 1975).

تولید توکسین

به منظور بررسی توان تولید توکسین های پروتئینی با وزن مولکولی پایین و توکسین های گلیکوپروتئینی توسط اندوفیت ها، قرص ۰/۵ سانتی متری از کشت تازه‌ی هر کدام از آنتاگونیست‌ها در مرکز تشتک‌های حاوی محیط کشت توکسین (گلوکز ۲۰ گرم، متیلن بلو ۰/۰۳ گرم، بافر فسفات یا سیترات ۱۰۰۰میلی لیتر، آگار ۲۰ گرم، ۴,۵ pH:) قرار داده شد. سپس به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. توان تولید توکسین با تشکیل هاله‌ی بی رنگ شفاف در حاشیه کلنی‌های قارچ‌های آنتاگونیست بررسی شد. در تشتک‌های شاهد به جای آنتاگونیست‌ها از قرص آگار استفاده شد (Portes *et al.*, 2013).

تولید هورمون اکسین توسط جدایه‌های اندوفیت

در ابتدا محیط کشت اختصاصی هر یک از قارچ‌های آنتاگونیست که شامل محیط Sabouraud Dextrose Broth برای قارچ *Chaetomium globosum* (Wang *et al.*, 2012)، محیط Czapek برای قارچ *Nigrospora oryzae* (Ding *et al.*, 2016) و محیط YESD برای *Coniolariella limonispora* (Sica *et al.*, 2016) تهیه شد. سپس ۵۰۰ میکروگرم تریپتوفان به هرکدام از محیط‌های کشت اضافه گردید و قارچ‌های آنتاگونیست در محیط کشت مایع اختصاصی خود کشت داده شدند و به مدت هفت شبانه روز در دستگاه شیکر انکوباتور با سرعت ۱۸۰ دور در دقیقه و دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از رشد قارچ‌ها، آن‌ها را از کاغذ صافی عبور داده شد و با سانتریفیوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه در 5000g رسوب داده شدند. یک میلی‌لیتر از مایع رویی با چهار میلی‌لیتر معرف سالکوسکی مخلوط شد. این محلول به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. تغییر رنگ محلول قارچی بیانگر تولید اکسین توسط جدایه قارچی می باشد. سپس به‌منظور اندازه گیری میزان تولید اکسین توسط قارچ‌های آنتاگونیست، میزان جذب در طول موج ۵۳۵ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. مقادیر تولید اکسین هر جدایه از فرمول $Y= 48.64\ X + 2.74$ با توجه به منحنی استانداردی که قبلا از غلظت‌های مختلف اکسین در آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران تهیه شده بود، محاسبه گردید (Patten & Glick, 2002).

بررسی‌های گلخانه‌ای

آزمایش‌های گلخانه‌ای در یکی از واحدهای گلخانه‌ی گروه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران با کاشت بذور گوجه‌فرنگی رقم فلات انجام شد. خاک مورد استفاده در این آزمایش به نسبت ۲:۲:۳ از خاک برگ، کود دامی و خاک مزرعه‌ای تهیه شد. خاک مورد نیاز، قبل از استفاده و ریختن داخل گلدان‌ها با استفاده از اتوکلاو به مدت یک ساعت و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون شد. گوجه‌فرنگی رقم فلات به‌عنوان یکی از ارقام حساس گوجه‌فرنگی به پژمردگی ورتیسیلیومی در این تحقیق استفاده شد (Morid & Hajmansoor, 2017). در ابتدا بذور ضدعفونی سطحی

شدند. جهت ضدعفونی سطحی، بذور درون بشر حاوی هیپوکلریت سدیم یک درصد ریخته شدند و به مدت ۱۰ دقیقه روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس بذور چهار مرتبه با آب مقطر سترون شستشو داده شدند و در سینی نشا کشت شدند. سینی‌های نشاء با مخلوط کوکوپیت و پرلیت سترون به نسبت مساوی پر شده بودند. از گیاهان در مرحله ۵-۴ برگی برای بررسی‌های گلخانه‌ای استفاده شد.

از بذور گندم آغشته به میسلیوم *V. dahliae* به‌عنوان مایه تلقیح بیمارگر استفاده شد. جهت تهیه مایه تلقیح *V. dahliae*، ابتدا بذور گندم به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده و دو مرتبه درون اتوکلاو سترون شدند. سپس بذور گندم با قرص‌هایی از قارچ بیمارگر تلقیح شدند و به مدت حدود سه هفته درون انکوباتور با دمای ۲۱ درجه سلسیوس قرار داده شدند. از مایه تلقیح به نسبت وزنی ۱ به ۱۰ خاک گلدان استفاده گردید (Akrami & Yousefi, 2015). همچنین از سوسپانسیون قارچی با جمعیت 10^7 اسپور در هر میلی‌لیتر به‌عنوان مایه تلقیح هر کدام از سه قارچ اندوفیت استفاده شد. ریشه گیاهچه‌های ۵-۴ برگی گوجه‌فرنگی درون سوسپانسیون اسپوری قارچ‌های اندوفیت به غلظت‌های 10^7 اسپور در میلی لیتر به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند و سپس گیاهچه‌ها در گلدان‌های تیمار کشت گردیدند. گیاهچه‌های کشت شده در گلخانه با دمای ۲۱ درجه سلسیوس قرار گرفتند و ارزیابی بعد از ۴۵ روز انجام شد (Naraghi *et al*., 2010). ارزیابی آزمایش قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های اندوفیت علیه بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی گوجه‌فرنگی ناشی از *Verticillium dahliae* در قالب طرح کامل تصادفی با چهار تیمار (۳ تیمار مجزا که در هر کدام خاک گلدان آغشته به زادمایه یکی از ۳ اندوفیت به همراه بیمارگر بود و یک تیمار شاهد که خاک گلدان با زادمایه بیمارگر تلقیح شد) و سه تکرار انجام گرفت (Akrami & Yousefi, 2015).

شاخص بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی براساس مقداردهی دلخواه ۰ (گیاه بدون علائم بصری)، ۰/۵ (آلودگی کوتیلدون‌ها)، ۱ (آلودگی یک برگ)، ۱/۵ (آلودگی دو برگ)، ۲ (آلودگی سه برگ) ارزیابی شد و شدت علائم بیماری طبق فرمول $DS = \frac{\sum(\text{Dieases index} \times \text{number of Dieasesed plant index})}{\text{total number of plants investigated} \times \text{the highest Dieases index}} \times 100$ محاسبه شد. آزمایش دوم، ارزیابی تاثیر قارچ‌های اندوفیت بر بهبود صفات رشدی شامل ارتفاع ساقه، ارتفاع ریشه و وزن تر بوته‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با ۸ تیمار و ۳ تکرار انجام گرفت. گلدان ها در دو گروه طبقه بندی شدند. گروه اول حاوی گیاهان سالم و عاری از آلودگی و ۳ قارچ اندوفیت برتر بود و گروه دوم حاوی گیاهان مایه زنی شده با قارچ بیمارگر و ۳ قارچ اندوفیت برتر بود. همچنین ۲ تیمار شاهد سالم و تیمار شاهد آلوده که با زادمایه بیمارگر تلقیح شد (Naraghi *et al*., 2010).

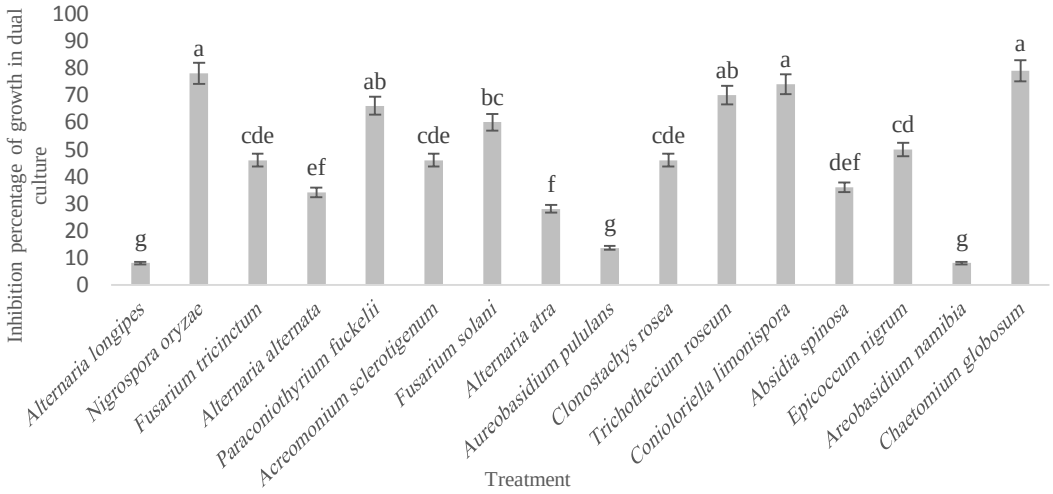
تجزیه و تحلیل نتایج

تجزیه تحلیل نتایج آزمایشها با استفاده از نرم افزار SAS انجام و میانگین ها با استفاده از آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند ($P\leq0.05$)

یافته‌ها

بازدارندگی از رشد پرگنه *Verticillium dahliae* در آزمون کشت متقابل

سرعت رشد پرگنه سه قارچ *Nigrospora oryzae*، *Chaetomium globosum* و *Coniolariella limonispora* بسیار بیشتر از پرگنه قارچ بیمارگر می باشد، بطوریکه پس از ۳ تا ۴ روز بعد از کشت، پرگنه قارچ بیمارگر را پوشانده و ضمن اشغال محل رشد و مصرف غذای مورد نیاز بیمارگر، روی هیف های آن رشد می کنند. در بررسی میزان بازدارندگی رشد پرگنه بیمارگر با روش آزمون کشت متقابل مشاهده شد که سرعت رشد پرگنه قارچ آنتاگونیست با میزان بازدارندگی از رشد رابطه مستقیم دارد. از بین ۱۶ قارچ اندوفیت، سه قارچ *Nigrospora oryzae*، *Chaetomium globosum* و *Coniolariella limonispora* بیشترین میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی *V. dahliae* را موجب شدند. به طوری که پس از سه تا پنج روز پرگنه قارچ بیمارگر را به‌طور کامل احاطه کردند (شکل ۱).



شکل ۱- درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر *Verticillium dahliae* توسط قارچ‌های اندوفیت در آزمون کشت متقابل. میانگین ها با حرف مشترک اختلاف معنی داری با هم ندارند (دانکن ۵٪)

Figure 1- Inhibition percentage of *Verticillium dahliae* growth by endophytic fungi in dual culture experiment. The means with the same letter are not significantly different (Dun. 5%).

اثر متابولیت‌های فرار قارچ‌های اندوفیت در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ *V. dahliae*

نتایج نشان می دهد که جدایه قارچ *Nigrospora oryzae* بیشترین فعالیت بازدارندگی و جدایه قارچی *Coniolariella limonispora* کم ترین فعالیت بازدارندگی را دارا هستند (جدول۱).

میزان جوانه‌زنی میکرواسکلروت *Verticillium dahliae* در تعامل با قارچ‌های اندوفیت

پس از گذشت یک هفته از تقابل اندوفیت‌ها با میکرواسکلروت *V. dahliae* و پر شدن تشتک شاهد از میکرواسکلروت‌های جوانه‌زنی کرده، تعداد میکرواسکلروت‌های جوانه زده در تیمارها شمارش شد (جدول ۲).

جدول ۱- اثر متابولیت‌های فرار قارچ‌های اندوفیت در بازدارندگی از رشد شعاعی پرگنه قارچ بیمارگر *Verticillium dahliae*.

Table 1- The effect of volatile metabolites of endophytic fungi in inhibition of colony radial growth of the pathogenic fungus *Verticillium dahliae*.

Inhibition (%)	Antagonistic fungi
76a	*Nigrospora oryzae*
55b	*Chaetomium globosum*
46c	*Coniolariella limonispora*

میانگین های با حرف مشترک اختلاف معنی داری با هم ندارند (دانکن ۵٪)

The means with the same letter are not significantly different (Dun. 5%).

جدول۲- اثر قارچ‌های اندوفیت منتخب بر جوانه زنی میکرو اسکلروت قارچ *Verticillium dahliae*،

Table 2- The effect of selected fungal endophytes on germination of *V. dahliae* fungus microsclerotium.

Inhibition (%)	Antagonist
70	*Nigrospora oryzae*
65	*Chaetomium globosum*
50	*Coniolariella limonispora*

توان تولید مواد ضد قارچی توسط قارچ‌های اندوفیت

با بررسی قارچ‌های اندوفیت و قارچ بیمارگر در محیط کشت PDB توسط بینوکلر مشاهده شد که میسلیوم‌های قارچ *Verticillium dahliae* در تماس با قارچ‌های اندوفیت در مقایسه با تیمارهای شاهد بد شکل و تخریب شده‌اند. رشد میسلیوم‌های *V. dahliae* در تعامل با سلول-های هر کدام از سه قارچ اندوفیت به صورت ضعیف بوده است. این مشاهدات احتمال تولید مواد ضد قارچی توسط سه جدایه اندوفیت را به وجود می‌آورد.

فعالیت سلولازی، فعالیت کیتینازی و توانایی تولید توکسین جدایه‌های اندوفیت

براساس نتایج به دست آمده هر سه جدایه اندوفیت قادر به تولید آنزیم های سلولاز و کیتیناز به‌صورت کیفی بودند و هیچ یک از آن‌ها توانایی تولید توکسین را نداشتند.

تولید هورمون اکسین توسط جدایه‌های اندوفیت

محلول قارچ‌های اندوفیت با معرف سالکوسکی ترکیب شد و تغییر رنگ محلول هر سه قارچ اندوفیت مشاهده شد که بیانگر تولید اکسین توسط این جدایه قارچی می باشد. سپس میزان تولید اکسین توسط جدایه‌های آنتاگونیست محاسبه گردید (جدول ۳).

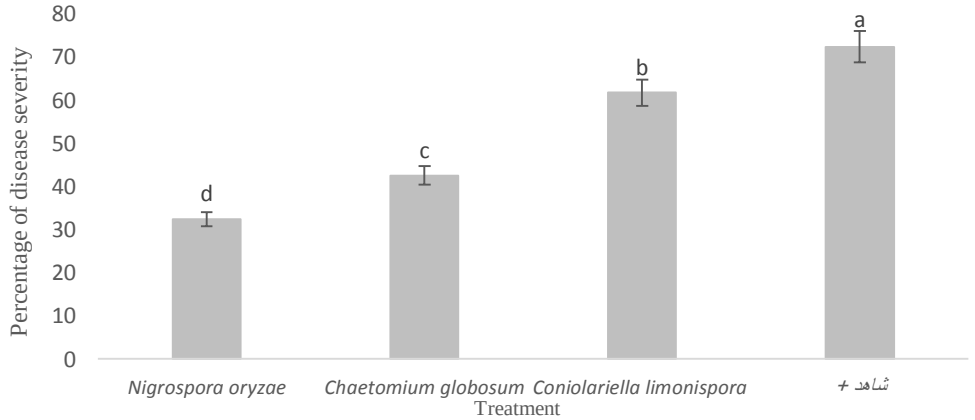
توانایی کنترل بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی توسط قارچ‌های اندوفیت در شرایط گلخانه

در این بررسی هر سه قارچ اندوفیت باعث کاهش شدت بیماری ناشی از بیمارگر *V. dahliae* در مقایسه با شاهد (بیمارگر) شدند. تکرارهای شاهد آلوده به بیمارگر در حدود ۷۲٪ علائم بیماری را از خود نشان دادند و قارچ *N. oryzae* بیشترین میزان کاهش شدت علائم بیماری (۶۷/۶۱ درصد) را در مقایسه با شاهد از خود نشان داد (شکل ۲).

جدول ۳- میزان تولید هورمون اکسین توسط قارچ‌های اندوفیت.

Table 3- The rate of production of the hormone auxin by endophytic fungi

Antagonist	Absorption in 535nm	Oxin (mg/l)
Nigrospora oryzae	0.34	17.625
Coniolariella limonispora	0.006	1.379
Chaetomium globosum	0.002	1.185



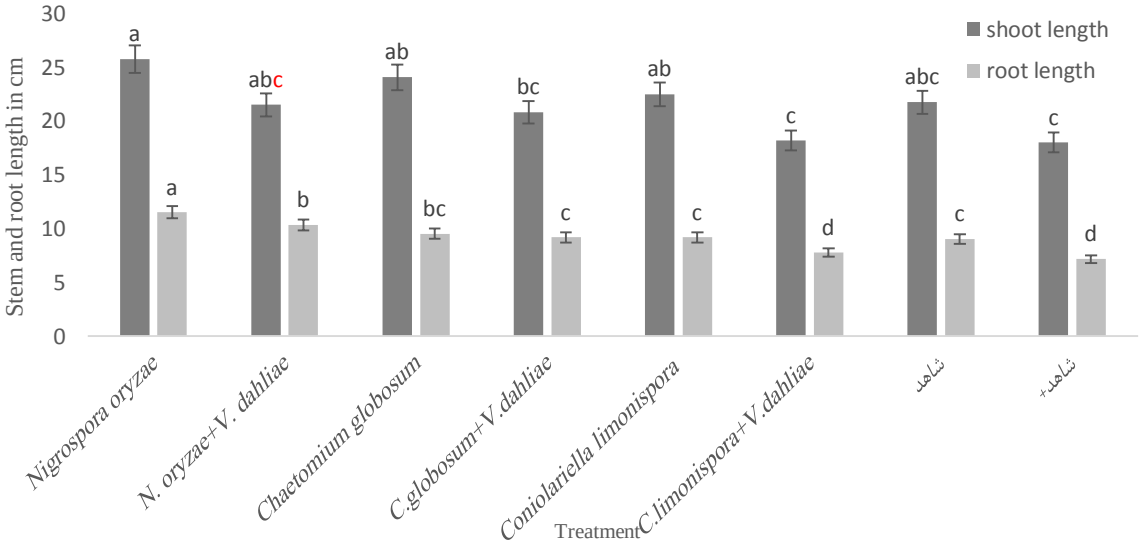
شکل ۲- تاثیر قارچ‌های اندوفیت منتخب بر شدت بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی گیاه گوجه‌فرنگی در گلخانه. میانگین ها با حرف مشترک اختلاف معنی داری با هم ندارند (دانکن ۵٪)

Figure 2- Effect of selected endophytic fungi on the severity of Verticillium wilt disease of Tomato plant in greenhouse. The means with the same letter are not significantly different (Dun. 5%)

ارزیابی شاخص‌های رشدی گیاه در گلخانه

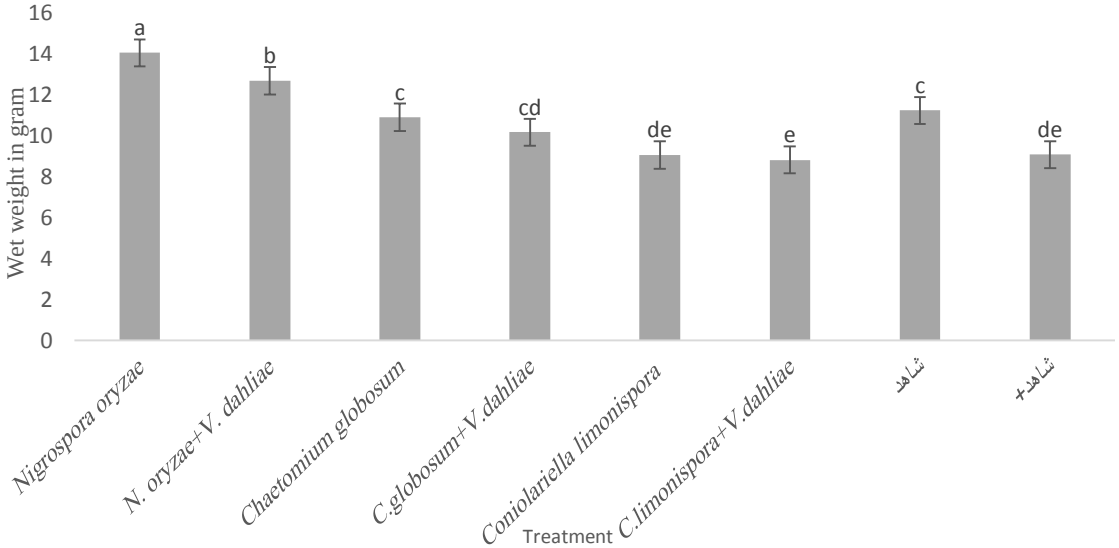
مقایسه میانگین اثر سه آنتاگونیست روی صفاتی چون ارتفاع ساقه، ارتفاع ریشه، وزن تر بوته براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که تیمارها در سطح احتمال پنج درصد دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند. براساس مقایسه میانگین‌ها، جدایه‌ی قارچ *Nigrospora oryzae* باعث

بیشترین افزایش ارتفاع ساقه (۱۹ درصد) و بیشترین افزایش ارتفاع ریشه (۲۷ درصد) نسبت به گیاهان شاهد شد (شکل-۳). .هم‌چنین تیمار *N. oryzae* بیشترین تاثیر (۲۵ درصد) را در افزایش وزن تر گیاه گوجه‌فرنگی نسبت به گیاهان شاهد داشت (شکل-۴).



شکل ۳- تاثیر قارچهای اندوفیت منتخب بر طول اندام هوایی و ریشه‌ی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه. میانگین ها با حرف مشترک اختلاف معنی داری با هم ندارند (دانکن ۵٪)

Figure 3- The effect of selected endophytic fungi on tomato foliage and root length in the greenhouse condition. The means with the same letter are not significantly different (Dun. 5%).



شکل ۴- تاثیر قارچهای اندوفیت منتخب بر وزن تر گیاه گوجه‌فرنگی. میانگین ها با حرف مشترک اختلاف معنی داری با هم ندارند (دانکن ٪۵)

Figure 4- The effect of selected endophytic fungi on tomato fresh weight. The means with the same letter are not significantly different (Dun. 5%).

بحث

در سال‌های اخیر مطالعات نسبتا زیادی روی قارچهای اندوفیت به‌منظور کنترل بیماری‌های گیاهی و به‌عنوان کود بیولوژیک برای بهبود رشد گیاهان صورت گرفته است. محققان به‌دلیل مزایای بیشتر استفاده از اندوفیت‌ها نسبت به آفت‌کش‌های مصنوعی، بیشتر مطالعات خود را معطوف به شناسایی پتانسیل‌های قارچهای اندوفیت در حفاظت از گیاهان و سرکوب بیماری‌های گیاهی کرده‌اند.

اندوفیت‌های قارچی ازطریق سازگاری با گیاه میزبان، ایجاد رابطه‌ی همزیستی و تجمع متابولیت‌های ثانویه باعث مقاومت گیاه میزبان به بیماری‌ها و تنش‌های مختلف می‌گردند و به وسیله سازگاری گیاه میزبان با تنش‌های زیستی باعث افزایش رشد گیاهان میزبان می‌گردند. برخی از موفقیت‌های به دست آمده از قارچ‌های و متابولیت‌های آنها در دسترس هستند (Gautam & Avasthi, 2019). طبق نتایج مطالعه Wang *et al*. (2014)، قارچ *N. oryzae* از میان قارچ‌های اندوفیت بیشترین میزان ممانعت از رشد میسلیومی *V. dahliae* را در مقایسه با تیمار شاهد داشت. Jabnoun-Khiareddine (*et al*., 2009)، تاثیر گونه های *Trichoderma* روی رشد شعاعی میسلیوم و مهار جوانه زنی میکرواسکلروت *V. dahliae* را در مقایسه با شاهد بررسی کردند. جدایه های *Trichoderma* sp. باعث مهار رشد میسلیوم *V. dahliae* در کشت متقابل، کاهش در صد جوانه زنی میکرواسکلروت و از بین رفتن تدریجی رنگ تیره میکرواسکلروت بالغ *V. dahliae* در تقابل میکرواسکلروت *V. dahliae* و جدایه های *Trichoderma* sp. شدند. در این پژوهش سه گونه *Nigrospora oryzae*، *Chaetomium globosum* و *Coniolariella limonispora* سبب ممانعت از جوانه زنی *V. dahliae* شدند. مکانیسم عمل فوق بنظر می رسد بدلیل تولید آنزیمهای برون سلولی از جمله سلولاز و کیتیناز و همچنین مایکوپارازیتیسم باشد که برای روشن تر شدن نیاز به آزمونهای تکمیلی از جمله بررسی تولید آنزیم گلوکوز اکسیداز می باشد. ممانعت از اسکلروت‌زایی یک مکانیسم مهم در بیوکنترل *V. dahliae* می باشد، زیرا که فعالیت آنتاگونیست‌ها باعث کاهش اینوکلوم اولیه *V. dahliae* در خاک می‌شود. در بیماری‌های یک چرخه‌ای مانند پژمردگی‌های ورتیسیلیومی شدت بیماری در ارتباط با اینوکلوم اولیه در خاک می‌باشد، بنابراین کاهش توانایی زیستن میکرواسکلروت در خاک می‌تواند منجر به کاهش قابل توجه وقوع بیماری شود (Fahima & Henis, 1995). در مطالعات Fravel & Roberts (1991)، کاهش توانایی زنده ماندن میکرواسکلروت *V. dahliae* در تقابل آن با آنتاگونیست *T. flavus* به دلیل تولید آنزیم گلوکزاکسیداز خارج سلولی بوده است. به طور مشابه استوز و همکاران Stosz *et al*. (1996) ، یافتند که ممانعت از جوانه‌زنی میکرواسکلروت *V. dahliae* به دلیل تولید گلوکز اکسیداز بوده است. به‌منظور بررسی توانایی سه قارچ آنتاگونیست در تولید آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی، آزمون‌های تولید آنزیم‌های کیتیناز و سلولاز انجام شد. مشاهده هاله شفاف اطراف کلنی‌های هر سه قارچ آنتاگونیست بیانگر توانایی تولید آنزیم‌های کیتیناز و سلولاز توسط این قارچها بود. سنجش توان تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی برای ارزیابی پتانسیل بیوکنترل بیمارگرها و اثرات بهبود رشد گیاه میزبان ضروری می‌باشد. کیتیناز در سرکوب فعالیت بیمارگرهای گیاهی به طور مستقیم نقش دارند و دارای توانایی تخریب دیواره سلولی قارچ ها و اامیست‌ها هستند. کیتین که ترکیب عمده دیواره سلولی قارچ‌هاست، سوبسترای آنزیم کیتیناز می‌باشد و توانایی مهار بیمارگر توسط آنتاگونیست‌ها ممکن است مربوط به تولید کیتیناز باشد (Gao *et al*., 2010). همچنین آنزیم سلولاز می‌تواند به‌طور غیرمستقیم از طریق فعالیت مایکوپازایتیسمی و اتصال قارچ به دیواره و سنتز آنزیم تجزیه‌کننده دیواره سلولی، در بهبود رشد گیاه موثر باشد (Murashima *et al*., 2003).

در این تحقیق میزان تولید اکسین توسط سه قارچ اندوفیت بررسی شد که قارچ *N. oryzae* با ۱۷/۶۲۵ میلی‌گرم بر لیتر بیشترین میزان اکسین را تولید کرده و قارچ *C. limonispora* میزان ۱/۳۷۹ و قارچ *C. globosum* میزان ۱/۱۸۵ میلی‌گرم بر لیتر، این هورمون را تولید کردند. تولید اکسین به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل افزایش عملکرد در گیاهان تلقیح شده با میکروارگانیسم‌های محرک رشد شناخته شده است. جدایه‌هایی که اکسین بیشتری تولید می‌کنند، به مراتب تاثیر بیشتری در مورفولوژی ریشه و بالتبع در میزان رشد گیاه نسبت به جدایه‌هایی که اکسین تولید نمی‌کنند یا اکسین کمتری تولید می‌کنند، دارند (Achouak *et al*., 2004). هر سه قارچ اندوفیت باعث کاهش شدت بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه‌ای شدند. طبق نتایج آزمایشگاهی *N. oryzae* در ممانعت از جوانه‌زنی میکرواسکلروت، تولید متابولیت‌های فرار و میزان تولید هورمون اکسین نسبت به دو اندوفیت دیگر عملکرد بالاتری داشت و بیشترین میزان کنترل بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی و بیشترین اثر در بهبود

صفات رشدی گوجه‌فرنگی را سبب شد. قارچ *Nigrospora* sp. منبعی قوی از متابولیت‌های ثانویه بیواکتیو مانند فومالکتون، نیتروتروفین‌های ضدباکتریایی و لاکتون‌های فیتوتوکسیک می‌باشد. عصاره اتیل استات این قارچ دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی می‌باشد. فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی این قارچ ممکن است به‌علت وجود ترکیبات فنولی یا آنتراکینون‌ها باشد (Pawle & singh, 2014).کارایی کنترل بیولوژیک بیمارگرهای خاکزاد مخصوصا گونه های *Verticillium* به عوامل مختلفی مانند قدرت رابطه آنتاگونیستی ایجاد شده، میزان توسعه قارچ بیمارگر در ریزوسفر گیاه میزبان و توانایی عامل کنترل کننده بیماری در کلونیزه کردن بافت‌های زیر زمینی گیاه برای جلوگیری از آلودگی بیمارگر بستگی دارد (Tjamos *et al*., 2000). بدین ترتیب برای آگاهی از میزان توسعه و شدت بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی در منطقه ریزوسفر، نیاز به مطالعه‌ی تعاملات میکروبی بین *V. dahliae* و آنتاگونیست‌ها در این منطقه می‌باشد. همچنین مطالعه مکانیسم‌های دخیل در فرایندهای بیوکنترلی پژمردگی ورتیسیلیومی توسط این آنتاگونیست‌ها حائز اهمیت می باشد.

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

1. Abdollahi-Aghdam Sh, Fotouhifar KhB (2017) Introduction of some endophytic fungi of sour cherry trees *(Prunus cerasus)* in Iran. Rostaniha 18(1): 77–94.
2. Achouak W, Conrod S, Cohen V, Heulin, T (2004) Phenotypic variation of *Pseudomonas brassicacearum* as a plant root-colonization strategy. Molecular plant-microbe interactions 17 (8): 872-879.
3. Akrami M, Yousefi, Z (2015) Biological control of Fusarium wilt of tomato (*Solanum lycopersicum*) by *Trichoderma* spp. as antagonist fungi. Biological Forum 7 (1): 887-892.
4. Daguerre Y, Siegel K, Edel-Hermann V, Steinberg C (2014) Fungal proteins and genes associated with biocontrol mechanisms of soil-borne pathogens: a review. Fungal biology reviews 28 (4): 97-125.
5. Ding L, Yuan W, Peng Q, Sun H, Xu S (2016) Secondary metabolites isolated from the sponge-associated fungus *Nigrospora oryzae*. Chemistry of Natural Compounds 52 (5): 969-970.
6. Dutta BK, (1981) Studies on some fungi isolated from the rhizosphere of tomato plants and the consequent prospect for the control of Verticillium wilt. Plant and Soil 63 209–216.
7. Fravel DR, Roberts DP (1991) In situ evidence for the role of glucose oxidase in the biocontrol of Verticillium wilt by *Talaromyces flavus*. Biocontrol Science and Technology 1 (2): 91-99.
8. Gao F, Dai CC, Liu XZ (2010) Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. African Journal of Microbiology Research 4 (13): 1346-1351.
9. Gautam AK, Avasthi S (2019) Fungal endophytes: potential biocontrol agents in agriculture, *In*: Kumar A, et al. (Eds.), Role of plant growth promoting microorganisms in sustainable agriculture and nanotechnology. Elsevier Inc. pp. 240-298.
10. Ghose TK (1987) Measurement of cellulase activities. Pure and applied Chemistry 59 (2): 257-268.
11. Hsu SC, Lockwood JL (1975) Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. Applied Environmental Microbiology 29 (3): 422-426.
12. Jabnoun-Khiareddine H, Daami-Remadi M, Aved FE, Mahjoub M (2009) Biological control of tomato Verticillium wilt by using indigenous *Trichoderma* spp. The African Journal of Plant Science and Biotechnology 3 (1): 26-36.
13. Jam Ashkezari S, Fotouhifar Kh-B (2017) Diversity of endophytic fungi of common yew (*Taxus baccata* L.) in Iran. Mycological Progress 16: 247–256.
14. Klosterman SJ, Atallah ZK, Vallad GE, Subbarao KV (2009) Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species. Annual review of phytopathology 47: 39-62.
15. Liu CH, Zou WX, Lu, H, Tan RX (2001) Antifungal activity of *Artemisia annua* endophyte cultures against phytopathogenic fungi. Journal of biotechnology 88 (3): 277-282.
16. Mishra Y, Singh A, Batra A, Sharma MM (2014) Understanding the biodiversity and biological applications of endophytic fungi: a review. Journal of microbial biochemical technology science: 6 (8) 1-11.
17. Masih EI, Paul B (2002) Secretion of β-1, 3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. Current microbiology 44 (6): 391-395.
18. Morid B, Haimansoor S (2017) Assessment of tomato genotypes resistance to Verticillium and Fusarium wilt disease using molecular marker. Journal of the World of Microbes 10 (1): 80-93. (in Farsi).
19. Murashima K, Kosugi A, Doi RH (2003) Synergistic effects of cellulosomal xylanase and cellulases from *Clostridium cellulovorans* on plant cell wall degradation. Journal of Bacteriology 185 (5): 1518-1524.
20. Naraghi L, Heydari A, Rezaee S, Razavi M, Jahanifar H, Khaledi E (2010) Biological control of tomato Verticillium wilt disease by *Talaromyces flavus*. Journal of Plant Protection Research 50 (3): 360-365.
21. Patten CL, Glick BR (2002) Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. Applied Environmental Microbiology 68 (8): 3795-3801.
22. Pawle G, Singh SK (2014) Antimicrobial, antioxidant activity and phytochemical analysis of an endophytic species of Nigrospora isolated from living fossil *Ginkgo biloba*. *Current* Research in Environmental and

Applied Mycology 4 (1): 1-9.
23. Portes CDS, Oliveira AVD, Simer P, Lunkes A M, Coelho AR (2013) Role of killer factors in the inhibitory activity of bio-control yeasts against *Penicillium expansum* and *Aspergillus ochraceus*. Brazilian Archives of Biology and Technology 56(4): 619-627.
24. Sica VP, Figueroa M, Raja HA, El-Elimat T, Darveaux BA, Pearce CJ, Oberlies NH (2016) Optimizing production and evaluating biosynthesis in situ of a herbicidal compound, mevalocidin, from *Coniolariella* sp. Journal of industrial microbiology & biotechnology 43 (8): 1149-1157.
25. Sonawane A, Mahajan M, Renake S (2015) Antifungal activity of a fungal isolates against Pomegranate wilt pathogen Fusarium. International Journal of Current Microbiology and Applied Science 2: 48-57.
26. Stosz SK, Fravel DR, Roberts DP (1996) *In vitro* analysis of the role of glucose oxidase from *Talaromyces flavus* in biocontrol of the plant pathogen *Verticillium dahliae*. Applied and Environmental Microbiology 62 (9): 3183-3186.
27. Tjamos EC, Antoniou PP, Tjamos SE (2000) Implementation of soil solarization in Greece: conclusions and suggestions. Crop Protection 19 (8-10): 843-846.
28. Tranier MS, Pognant-Gros J, Quiroz RDLC, González CNA, Mateille T, Roussos S (2014) Commercial biological control agents targeted against plant-parasitic root-knot nematodes. Brazilian Archives of Biology and Technology 57 (6): 831-841.
29. Uppal AK, Hadrami A, Adam LR, Tenuta, M, Daayf F (2008) Biological control of potato Verticillium wilt under controlled and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts. Biological control 44 (1): 90-100.
30. Wang X, Wang C, Xie C, Yang X (2014) Advances in molecular mechanisms of Verticillium pathogenicity and plant resistance to Verticillium wilt. Journal of Henan Agricultural Sciences 43 (1): 1-6.
31. Wang Y, Xu L, Ren W, Zhao D, Zhu Y, Wu X (2012) Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* L18, an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. Phytomedicine 19 (3-4): 364-368.
32. Xiao CL, Subbarao KV (2000) Effects of irrigation and *Verticillium dahliae* on cauliflower root and shoot growth dynamics. Phytopathology 90 (9): 995-1004.
33. Zheng Y, Xue QY, Xu, LL, Xu Q, Lu S, Gu C, Guo, JH (2011) A screening strategy of fungal biocontrol agents towards *Verticillium* wilt of cotton. Biological Control 56 (3): 209-216.

کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۱۳۹۹ (۱۱۴-۱۰۳) مقاله پژوهشی DOI: 10.22059/jbioc.2021.313455.294

E-mail: behbodi@ut.ac.ir