The University of Tehran Press

Iranian Journal of Plant Protection Science

Online ISNN: 2008-4781

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

Biocontrol of charcoal rot disease on tomato and melon using endophytic fungi in vitro and in vivo

Fatemeh Tadayon Rad[1] | Leila Ebrahimi[2]✉

1. Department of Entomology and Plant Pathology, College of Agricultural Technology, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: f.tadayon98@gmail.com
2. Corresponding Author, Department of Entomology and Plant Pathology, College of Agricultural Technology, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: Le_ebrahimi@ut.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 25 February 2023

Revised: 4 April 2023

Accepted: 24 April 2023

Published online: 18 September 2023

Keywords:

Antagonist,

Biological control,

Endophytic fungus,

Macrophomina phaseolina,

Volatile organic compounds.

ABSTRACT

Macrophomina phaseolina causal agent of charcoal rot, stem, and seedling rot, causes economic losses on over 500 plant species including tomato and melon around the world every year. One of the most important and effective alternative methods for chemicals and reducing their risks is biocontrol using different agents such as endophytic fungi. In the present study, the effect of some endophytic fungi on charcoal rot disease and the growth indices of tomato and melon plants were assessed. In the dual culture test, among the 12 endophyte species, five isolates including *Chaetomium globosum* 2S1, *Ch. globosum* 3L2, *Fusarium fujikuroi* 37F6, *F. acuminatum* GO2L1, and *F. incarnatum* 25S3 which had the highest inhibition of pathogen mycelia growth, were selected for further tests. In the volatile compounds test, all endophytic isolates showed more than 90% inhibition of pathogen mycelia growth. In biocontrol assay under greenhouse conditions, all endophytic isolates except *F. fujikori* 37F6, completely prevented disease on both tomato and melon plants. In the evaluation of the growth indices and by comparing the treated plants with the infected and healthy controls, no positive effect of the selected endophytic isolates was observed on the growth indices of both plants. However, they reduced the harmful effects of the pathogen and thus reduced the charcoal rot disease severity. Recovery of endophyte isolates from both inoculated melon and tomato plants showed that the surveyed isolates can become endophytes in plant tissue.

Cite this article: Tadayon Rad, F., & Ebrahimi, L. (2023). Biocontrol of charcoal rot disease on tomato and melon using endophytic fungi in vitro and in vivo. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 54 (1), 1-17. DOI: http//doi.org/10.22059/IJPPS.2023.355691.1007022

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.
DOI: http//doi.org/10.22059/IJPPS.2023.355691.1007022

Extended Abstract

Introduction

Macrophomina phaseolina causal agent of charcoal rot, stem, and seedling rot, causes economic losses on over 500 plant species including tomatoes and melon around the world. Chemical control of this disease is difficult and dangerous for the environment. Biological control has been explored as a new and safe means of managing charcoal rot. One of the most important and effective alternative methods for chemicals and reducing their risks is biocontrol using different agents such as endophytic fungi. Endophytic fungi grow inside the host tissue without any damage or symptoms and are considered as biocontrol agents. They play an important role in balancing ecosystems, as well as benefiting the host through increasing plant growth and protecting the host plants from abiotic and biotic stresses using various strategies.

Materials and Methods

In this research, the effect of several endophytic fungi on charcoal rot disease and the growth indices of tomato and melon plants were investigated. Dual culture and volatile organic compounds (VOCs) tests were conducted to select the best antagonists for further assays. Tomato and melon were used in the in vivo experiments to evaluate the antagonism of the endophytic fungi against charcoal rot disease as well as plant growth parameters. The experiments were conducted in a completely randomized design for in vitro and in vivo tests.

Results and Discussion

In the dual culture test of 12 endophytes, five isolates including *Chaetomium globosum* 2S1, *Ch. globosum* 3L2, *Fusarium fujikuroi* 37F6, *Fusarium acuminatum* GO2L1, and *Fusarium incarnatum* 25S3 which had the highest inhibitory rate on pathogen mycelia growth, were selected for further tests. In the volatile organic compounds (VOCs) test, all isolates showed more than a 90% inhibitory rate against pathogen growth. According to the results of in vitro, *F. fujikori* 37F6 had the lowest disease inhibition rate on both tomato and melon plants under greenhouse conditions. Based on the results obtained in the evaluation of the growth indices and by comparing the treated plants with the infected and healthy controls, it can be concluded that the selected endophytic isolates in this research did not affect the growth indices of both plants. However, they reduced the harmful effects of the pathogen and thus reduced the disease severity. Also, selected endophyte isolates were re-isolated from both melon and tomato plants after inoculation and showed that they can become endophyte in plant tissue and these fungi exhibit systemic growth within their hosts.

Conclusion

In this study, the isolates that controlled the disease under greenhouse conditions could therefore be considered the best candidates for the development of endophytic-based bio-fungicide and could be integrated as a component in a sustainable integrated crop management strategy for charcoal rot disease. However, further studies are warranted to clearly understand the underlying mechanisms by which the presence of endophytic fungi affect *M. phaseolina* as well as validate the findings under field conditions on different cultivars of tomato and melon.

نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۵۴، شماره ۱

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۸۶۸-۲۴۲۳

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

مهار زیستی بیماری پوسیدگی ذغالی گوجه‌فرنگی و طالبی با استفاده از قارچ‌های اندوفیت در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای

فاطمه تدین‌راد[۱] | لیلا ابراهیمی[۲]✉

۱. گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: f.tadayon98@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکده فناوری کشاورزی ابوریحان، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: Le_ebrahimi@ut.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:

مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۰۶

تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۱/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۴

تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷

کلیدواژه‌ها:

آنتاگونیست، ترکیبات فرار، قارچ اندوفیت، مهار زیستی، Macrophomina phaseolina

چکیده

قارچ *Macrophomina phaseolina* عامل بیماری پوسیدگی ذغالی، پوسیدگی ساقه و گیاهچه است که سالانه باعث خسارت اقتصادی در بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی از جمله گوجه‌فرنگی و طالبی در سرتاسر دنیا می‌شود. از مهم‌ترین و موثرترین روش‌های مبارزه جایگزین برای سموم شیمیایی و کاهش خطرات ناشی از آن، مهار زیستی با عوامل مختلف از جمله قارچ‌های اندوفیت می‌باشد. در مطالعه حاضر، تاثیر چند قارچ اندوفیت روی بیماری پوسیدگی ذغالی و شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی بررسی شد. در آزمون کشت متقابل، از بین دوازده گونه اندوفیت، پنج جدایه شامل *Chaetomium globosum* 2S1، *Ch. globosum* 3L2، *Fusarium fujikuroi* 37F6، *Fusarium acuminatum* GO2L1 و *Fusarium incarnatum* 25S3 که بیشترین میزان بازدارندگی از رشد رویشی قارچ بیمارگر را داشتند، برای آزمون‌ها انتخاب شدند. در آزمون ترکیبات فرار، همه جدایه‌های اندوفیت بیش از ۹۰ درصد بازدارندگی از رشد رویشی قارچ بیمارگر را نشان دادند. در آزمون مهار زیستی بیماری در شرایط گلخانه‌ای، همه جدایه‌های قارچی به غیر از *F. fujikori* 37F6 به طور کامل از وقوع بیماری روی هر دو گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی جلوگیری کردند. در ارزیابی شاخص‌های رشدی و با مقایسه گیاهان تیمار شده با شاهد آلوده و سالم، اثرات مثبتی از جدایه‌های اندوفیتی منتخب در ارتقاء شاخص‌های رشدی گیاهچه‌های هر دو گونه محصول زراعی مشاهده نشد. با این حال، آن‌ها اثرات سوء عامل بیماری‌زا را کاهش داده و در نتیجه باعث کاهش علائم بیماری پوسیدگی ذغالی شدند. جداسازی مجدد جدایه‌های اندوفیت از دو گیاه طالبی و گوجه‌فرنگی مایه‌زنی شده نشان داد که جدایه‌های مورد ارزیابی توانایی اندوفیت شدن در بافت گیاهی را دارند.

استناد: تدین راد، فاطمه؛ و ابراهیمی، لیلا (۱۴۰۲). مهار زیستی بیماری پوسیدگی ذغالی گوجه‌فرنگی و طالبی با استفاده از قارچ‌های اندوفیت در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای *نشریه دانش گیاهپزشکی ایران*، ۵۴ (۱)، ۱۷-۱. DOI: http//doi.org/10.22059/IJPPS.2023.355691.1007022

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: http//doi.org/10.22059/IJPPS.2023.355691.1007022

مقدمه

قارچ *Macrophomina phaseolina* عامل بیماری پوسیدگی ذغالی، پوسیدگی ساقه و گیاهچه باعث خسارت اقتصادی در بیش از پانصد گونه گیاهی زراعی و غیرزراعی از جمله سویا، توتون، گوجه‌فرنگی و طالبی در سرتاسر دنیا می‌شود (Shehzad *et al*., 1988; Farr & Rossman, 2014). این بیماری در ایران اولین بار در سال ۱۳۴۸ از مزارع خربزه اطراف اصفهان گزارش شد (Ghafarian, 2000). عامل بیماری‌زا، میزبان‌های خود را در مراحل اولیه رشد شامل بذر و گیاهچه آلوده کرده و با رشد و گسترش هیف‌های خود و انسداد سیستم آوندی گیاه مانع از حرکت آب و مواد غذایی می‌شود. از علائم معمول آن زردی و پیری برگ‌ها و ایجاد ظاهر خاکستری در بافت طوقه و ساقه به دلیل رشد میکرواسکلروت‌ها است که در نهایت منجر به مرگ بوته‌ها و کاهش عملکرد گیاه می‌شود (Short *et al*., 1978; Wyllie & Scott, 1988; Sinclair & Backman, 1989; Smith & Carvil, 1997).

از میزبان‌های مهم این بیمارگر، گیاهان طالبی و گوجه‌فرنگی می‌باشند. طالبی (*Cucumis melo* L.) از خانواده کدوئیان (Cucurbitaceae) از جمله محصولات مهم جالیزی است. گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum* L.) نیز از محصولات مهم زراعی از خانواده Solanaceae و بعد از سیب‌زمینی دومین محصول مهم در بین سبزیجات می‌باشد. این دو محصول به دلیل تولید انواع مواد معدنی و ویتامین‌ها جایگاه ویژه‌ای در رژیم غذایی انسان دارند. از لحاظ اقتصادی نیز ایران یکی از تولیدکنندگان عمده این دو محصول در جهان می‌باشد (Eitenmiller *et al*., 1985; Laur & Tian, 2011; Bergougnoux, 2014).

برای مهار عامل بیماری‌زا و کاهش خسارت‌های اقتصادی ناشی از آن روش‌های مختلف شیمیایی، زیستی و زراعی مانند خاک‌ورزی، ضدعفونی خاک با مواد شیمیایی، آفتاب‌دهی خاک، ایجاد رطوبت بالا در خاک و بیوسولاریزاسیون که ترکیب دو روش آفتابدهی و ضدعفونی خاک است استفاده می‌شود (Gray, 1978; Chamorro *et al*., 2015; Lodha & mawar, 2019). بطور کلی، روش‌های مختلفی در مهار عامل بیماری‌زا بکار می‌روند اما همه این روش‌ها کاربردی و موثر نیستند، برای مثال تناوب زراعی به دلیل بقاء طولانی و دامنه میزبانی گسترده عامل بیماری‌زا موثر نیست (Pearson *et al*., 1984; Almeida *et al*., 2001). استفاده از قارچ‌کش‌ها نیز که رایج‌ترین روش‌ها برای مدیریت بیماری‌های قارچی است به دلیل نبود قارچکش‌های سیستمیک که به سمت ریشه حرکت کنند کاربردی نیست (Parmar *et al*., 2018). همچنین ظهور گونه‌های مقاوم بیمارگر و ورود باقیمانده سموم به زنجیره غذایی نیز از پیامدهای سوء مصرف این مواد است که موجب محدودیت استفاده از سموم و توجه بیشتر به کاربرد روش‌های جایگزین، از جمله عوامل مهار زیستی شده است (Romanazzi *et al*., 2012).

عوامل مهار زیستی بویژه قارچ‌های اندوفیت از مهمترین روش‌های جایگزین برای سموم شیمیایی هستند. این قارچ‌ها به دلیل حضور طولانی مدت در گیاهان و تکامل همزمان با میزبان و ایجاد رابطه همزیستی با آن، توانایی کلونیزه کردن بافت‌های گیاهی بدون ایجاد علائم بیماری را دارند. مکانیسم‌های اصلی این عوامل در مهار بیماری‌ها شامل القاء مقاومت در گیاهان برای مقابله با عوامل تنش‌زا، رقابت برای مواد غذایی و فضا، کاهش و یا جلوگیری از رشد عوامل بیماری‌زا از طریق آنتی‌بیوز و قارچ انگلی است. اصلی‌ترین مکانیسم عمل آن‌ها تولید ترکیبات آلی فرار و متابولیت‌های ضدقارچی مختلف می‌باشد (Aly *et al*., 2011; Porras-Alfaro & Bayman, 2011). این ترکیبات با القاء سیستم دفاعی گیاه و یا با تخریب دیواره سلولی عوامل بیمارگر مانع از رشد و گسترش آن‌ها شده و یا با فراهم کردن مواد غذایی مورد نیاز گیاه موجب بهبود رشد آن‌ها و مقاومت در برابر بیمارگر می‌شوند. از جمله این فعالیت‌ها قابلیت حل فسفات و تبدیل آن به فسفات قابل جذب برای گیاه است (Klemsdal *et al*., 2006; Gan *et al*., 2007; Amirita *et al*., 2012; Santoyo *et al*., 2016). ترکیبات فرار موادی با وزن مولکولی کم هستند که در فشار و دمای معمولی تبخیر شده و به دلیل خواص ضدمیکروبی برای تحقیقات مدیریت زیستی محصولات کشاورزی مفید و موثر هستند (Morath *et al*., 2012; Schalchli *et al*., 2016).

در پژوهش‌های پیشین، تاثیر قارچ‌های اندوفیت در کنترل عامل بیماری‌زا با تولید متابولیت‌های ثانویه و گازهای فرار ضدقارچی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است. González *et al*. (2020) در پژوهش‌های خود اثر بازدارندگی قارچ‌های اندوفیت

جدا شده از گیاه هندوانه را روی دو جدایه قارچ *M. phaseolina* نشان داده‌اند. در آزمون‌های آزمایشگاهی از بین هفت جدایه اندوفیت منتخب دو گونه تریکودرما شامل *Trichoderma lentifome* بیش از ۵۰ درصد و *T. harzianum* بیش از ۷۰ درصد بازدارندگی از رشد قارچ بیماری‌زا داشتند. قارچ اندوفیت *Epicoccum purpurascens* با ۴۱/۳ درصد نسبت به جدایه‌های تریکودرما میزان بازدارندگی کمتری نشان داد. تاثیر دو گونه تریکودرما در آزمون‌های گلخانه‌ای نیز روی دو گیاه طالبی و هندوانه بررسی شد که میزان بازدارندگی از شدت علائم بیماری در گیاه هندوانه نسبت به طالبی بیشتر بود. گونه *T. lentifome* بطور کامل از بروز علائم بیماری روی گیاه هندوانه جلوگیری کرد، در حالیکه گیاهان طالبی تیمار شده بطور کامل آلوده بودند. در پژوهشی دیگر، Sridharan *et al.* (2020) تاثیر ترکیبات فرار ضدقارچی جدایه اندوفیت *Trichoderma longibrachiatum* EF5 را روی قارچ *M. phaseolina* در شرایط آزمایشگاهی بررسی کردند. در آزمون کشت متقابل جدایه اندوفیت علیه قارچ بیمارگر بیش از ۵۸ درصد بازدارندگی مشاهده شد. ترکیبات فرار ضدقارچی این جدایه موجب شکل غیرمعمول در اسکلروت‌ها و نیز کاهش رشد عامل بیمارگر شد.

بر اساس پژوهش‌های پیشین، گونه *Chaetomium globusum* با تولید متابولیت‌های مختلف مانند آنزیم‌های کیتیناز، سلولاز و فعال کردن سیستم دفاعی گیاه، همچنین حمله به عامل بیماری‌زا از رشد آن جلوگیری کرده و یا با توانایی حل فسفات و تامین مواد مورد نیاز گیاه به رشد گیاه کمک می‌کند. بطور کلی قارچ اندوفیت با تولید این متابولیت‌ها گیاه را در برابر حمله آفات و عوامل بیماری‌زای مختلف محافظت می‌کند (Toghueo *et al*., 2008; Dolatabad *et al*., 2017; Zeratkar *et al*., 2019). در مطالعات Kumar (2020) تاثیر قارچ اندوفیت *Ch. globusum* در مهار قارچ *M. phaseolina* ارزیابی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که جدایه‌های اندوفیت بیش از ۶۰ درصد قابلیت بازدارندگی از رشد عامل بیماری‌زا را در شرایط آزمایشگاهی داشتند. گونه *Ch. globusum* با تولید متابولیت‌های مختلف از جمله کتومینین و کتوگلوبوزین که نقش بالقوه‌ای در فعالیت بازدارندگی قارچ اندوفیت دارند، از رشد رویشی قارچ *M. phaseolina* در آزمون کشت متقابل بازدارندگی نشان داد.

در تحقیق حاضر، با توجه به تاثیر گونه‌های قارچی اندوفیت در بازدارندگی از رشد عوامل بیماری‌زای مختلف از طریق تولید ترکیبات ضدقارچی در میزبان‌های گیاهی گوناگون، ضمن بررسی اثر آنتاگونیستی چند گونه اندوفیت در مهار رشد رویشی قارچ *M. phseolina* در شرایط آزمایشگاهی، قابلیت این عوامل در بازدارندگی از علائم قارچ بیماری‌زا و تاثیر آن‌ها روی شاخص‌های رشدی گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه قارچ بیمارگر و جدایه‌های آنتاگونیست

جدایه M14 قارچ *Macrophomina phaseolina* (جداسازی شده از ریشه و طوقه گیاهان آلوده طالبی و خربزه) و دوازده جدایه قارچ اندوفیت از کلکسیون آزمایشگاه قارچ‌شناسی گروه حشره‌شناسی و بیماری‌های گیاهی، دانشکدگان کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران تهیه شد. مشخصات جدایه‌های قارچی اندوفیت در جدول (۱) آورده شده است. این دوازده جدایه بر اساس نتایج پژوهش Ebrahimi *et al.* (2022) انتخاب شدند که نتایج قابل قبولی را علیه قارچ عامل بیماری لکه سیاه سیب در آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نشان داده بودند.

جدول ۱. جدایه‌های قارچی اندوفیت مورد استفاده در این پژوهش

گونه	جدایه	میزبان	محل جمع‌آوری
Acremonium sclerotigenum	GO13S1	*Malus domestica*	گلستان، رامیان
Aureobasidium microstictum	7F2	*Malus orientalis*	گلستان، مینودشت
Chaetomium globosum	2S1	*Malus domestica*	گلستان، گنبدکاووس
Chaetomium globosum	3L2	*Malus domestica*	گلستان، مینودشت
Chaetomium globosum	39S6	*Malus domestica*	مازندران، سوادکوه
Coniochaeta endophytica	55S2	*Malus domestica*	گیلان، پره‌سر
Fusarium fujikuroi	37F6	*Malus domestica*	مازندران، پل‌سفید
Fusarium lateritium	61S2	*Malus domestica*	گیلان، سیاهکل
Fusarium acuminatum	GO2L1	*Malus domestica*	گلستان، مینودشت
Fusarium incarnatum	25S3	*Malus domestica*	مازندران، کیاسر
Hydeomyces desertipleosporoides	GO8S2	*Malus domestica*	گلستان، مینودشت
Nemania serpens	GO7L1	*Malus domestica*	گلستان، مینودشت

آزمون‌های آزمایشگاهی

آزمون کشت متقابل

این آزمون بر اساس روش Dennis & Webster (1971) و با در نظر گرفتن سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. ابتدا محیط‌کشت PDA در تشتک پتری ده سانتی‌متری سترون ریخته شد. بعد از جامد شدن محیط‌کشت، ابتدا قرصی با قطر پنج میلی‌متر از قارچ اندوفیت در فاصله یک سانتی‌متری از لبه پتری قرار داده شد و به طور همزمان یا بعد از دو روز بسته به سرعت رشد قارچ آنتاگونیست، در مقابل آن قارچ بیمارگر با فاصله یک سانتی‌متری از لبه تشتک پتری قرار گرفت. در تشتک پتری شاهد در یک سمت تنها قرص پنج میلی‌متری از قارچ بیمارگر قرار گرفت. تشتک‌ها با پارافیلم پوشانده شدند و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. هنگام رسیدن پرگنه قارچ بیمارگر به خط وسط در تشتک پتری شاهد، شعاع پرگنه قارچ بیمارگر در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری شد. در نهایت درصد کاهش رشد میسلیوم قارچ با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Etebarian *et al.*, 2005):

$$n = (a - b) / a \times 100$$

n = درصد بازدارندگی از رشد عامل بیماری
a = شعاع پرگنه عامل بیماری در تشتک پتری شاهد
b = شعاع پرگنه عامل بیماری در تشتک پتری تیمار

آزمون تولید ترکیبات فرار توسط جدایه‌های قارچ اندوفیت

این آزمون مطابق روش Lillbro (2005) انجام شد. برای ارزیابی تولید ترکیبات فرار جدایه‌های قارچی اندوفیت منتخب در مرحله اول، یک قرص از کشت جوان پنج روزه این جدایه‌ها در مرکز تشتک پتری حاوی محیط‌کشت PDA قرار داده شد. سپس در مرکز تشتک پتری دیگر حاوی محیط PDA قرصی از کشت جوان جدایه قارچ بیمارگر قرار داده شد. سپس در کنار شعله و در شرایط سترون تشتک‌های حاوی قارچ عامل بیماری و جدایه‌های قارچی آنتاگونیست روی هم قرار داده شدند و لبه‌های آن‌ها به کمک پارافیلم کاملاً پوشانده شد. در این آزمون برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. بعد از یک هفته،

1Potato Dextrose Agar

قطر پرگنه‌های قارچ بیمارگر اندازه‌گیری و سپس مساحت آن‌ها محاسبه گردید و در نهایت درصد کاهش رشد میسلیوم قارچ با استفاده از فرمول بالا محاسبه شد.

اثبات بیماری‌زایی قارچ *Macrophomina phaseolina* در شرایط گلخانه‌ای

تهیه زادمایه قارچ عامل بیماری

برای تهیه زادمایه قارچ بیمارگر، مقدار ۱۲۰ گرم ماسه، شش گرم آرد ذرت و ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون درون ظرف شیشه‌ای دربدار ریخته شد و سه روز متوالی هر بار ۳۰ دقیقه در اتوکلاو و با دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون شد. در روز سوم جار شیشه‌ای به زیر هود منتقل و قطعات یک سانتی‌متری از پرگنه هفت روزه قارچ بیمارگر که روی محیط PDA رشد کرده بودند به جار شیشه‌ای منتقل شدند و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت سه هفته نگهداری شد و هر روز با تکان دادن شیشه مخلوط درون جار برای همگن شدن بیشتر بهم زده شد (Etebarian *et al*., 2007).

کشت گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی و مایه‌زنی قارچ بیمارگر

ابتدا به منظور کشت گیاهان مورد نظر مخلوطی از خاک مزرعه، خاک‌برگ، کوکوپیت و پرلیت (با نسبت وزنی ۱:۱:۱:۱) تهیه شد و سه روز متوالی هر بار به مدت یک ساعت در اتوکلاو و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون شده و به گلدان‌های پلاستیکی با حجم یک لیتر منتقل و به نسبت ده درصد وزنی، خاک حاوی زادمایه قارچ بیماری‌زا به گلدان‌ها اضافه و مخلوط شدند (Jimenez-Diaz *et al*., 1983). سپس بذور گوجه‌فرنگی رقم ۴۱۲۹ و طالبی رقم سمسوری داخل خاک گلدان‌ها کشت شده و در گلخانه با دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در تیمار شاهد بذور هر دو گیاه در گلدان حاوی خاک سترون، کشت شدند. گیاهان آزمایشی به صورت روزانه جهت ظهور علائم بیماری مورد بررسی قرار گرفتند.

آزمون مهار زیستی در شرایط گلخانه‌ای

در این بخش، از روش ذکر شده در تهیه زادمایه قارچ بیمارگر استفاده و زادمایه قارچ‌های اندوفیت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت سه هفته نگهداری شدند.

بعد از تهیه زادمایه جدایه‌های قارچی اندوفیت و قارچ بیمارگر، ابتدا زادمایه قارچ اندوفیت به خاک سترون درون گلدان اضافه و بعد از ۲۴ ساعت زادمایه قارچ بیمارگر به خاک داخل گلدان‌ها اضافه و بذور دو گیاه به خاک منتقل شدند. بر اساس نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی، جدایه‌های قارچی اندوفیت که بیشترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر را نشان دادند شامل *Ch. globosum* 2S1، *Ch. globosum* 3L2، *Fusarium fujikuroi* 37F6، *Fusarium incarnatum* 25S3 و *Fusarium acuminatum* GO2L1 در آزمون‌های گلخانه‌ای مورد استفاده قرار گرفتند. در تیمار شاهد منفی (آلوده) تنها از قارچ بیمارگر و در شاهد مثبت تنها از جدایه‌های قارچی اندوفیت استفاده شد و در شاهد سالم از هیچ‌کدام استفاده نشد. برای هر تیمار سه گلدان در نظر گرفته شد و در داخل هر گلدان پنج بذر کشت شد. بعد از جوانه‌زنی بذرها، بسته به تراکم بوته‌ها در هر گلدان دو تا سه گیاه نگهداری شد. گلدان‌ها در گلخانه با دمای ۳۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. با توسعه علائم بیماری روی گیاه شاهد، گیاهان در کلیه تیمارها از نظر شدت علائم مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور، یک ماه پس از مایه‌زنی، اندازه لکه‌های بیماری در ناحیه ریشه و طوقه بوته‌های گوجه‌فرنگی و طالبی اندازه‌گیری شد. برای ارزیابی اثر جدایه‌های آنتاگونیست در ممانعت از علائم بیماری، طول و عرض لکه‌های سیاه ایجاد شده روی ساقه و طوقه اندازه‌گیری شد (Pahlavani *et al*., 2006) و درصد بازدارندگی از رشد بیماری در تیمارهای مختلف در مقایسه با شاهد آلوده محاسبه شد.

علاوه براین، ارتفاع قسمت هوایی گیاه، وزن تر و وزن خشک گیاه در تیمارهای مختلف بعد از یک ماه اندازه‌گیری شد. ابتدا به منظور زدودن گل و لای ریشه، بوته‌ها را با آب شسته و سپس وزن تر با ترازوی دیجیتال با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین و طول بوته‌ها در قسمت هوایی (از طوقه تا نوک برگ‌های انتهایی) اندازه‌گیری شد. بعد از آن به منظور خشک شدن کامل بوته‌ها، هر بوته بصورت جداگانه در فویل آلومینیومی قرار گرفته و در آون با دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت چهار ساعت قرار داده شدند. پس از خشک شدن کامل بوته‌ها، مجددا وزن آن‌ها به کمک ترازویی با دقت ۰/۰۰۱ گرم توزین و یادداشت شد.

ارزیابی توانایی اندوفیت شدن جدایه‌های قارچی اندوفیت در گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی

برای جداسازی مجدد قارچ‌های اندوفیت از دو گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی کشت شده در خاک مایه‌زنی شده با جدایه‌های مورد نظر، از روش Strobel & Daisy (2003) استفاده شد. گیاهان هر تیمار به منظور زدودن گرد و خاک روی سطح اندام‌های گیاهی به مدت ۲۰ دقیقه زیر جریان آب قرار گرفتند. بعد از آن گیاهان ضدعفونی سطحی شدند. بدین منظور ابتدا اندام‌های گیاهی شامل برگ و ساقه به ترتیب در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۴۵ ثانیه، هیپوکلریت سدیم دو درصد به مدت ۳۰ ثانیه، اتانول ۷۰ درصد به مدت ۱۵ ثانیه قرار گرفته و ضدعفونی سطحی شدند. سپس سه مرتبه به ترتیب به مدت پنج دقیقه، سه دقیقه، یک دقیقه با آب مقطر سترون شسته شدند و جهت خشک شدن روی کاغذ صافی سترون قرار داده شدند. در مرحله بعد اندام‌های گیاهی ضدعفونی شده به قطعات یک سانتیمتری تقسیم و روی محیط کشت WA[1] قرار داده شدند. بعد از یک هفته قارچ‌هایی که رشد کرده بودند به روش نوک هیف خالص‌سازی و به محیط PDA منتقل شدند. بعد از رشد جدایه‌های قارچی به دست آمده، شناسایی آن‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و با تهیه اسلایدهای میکروسکوپی مطابق روش Ebrahimi *et al.* (2022) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

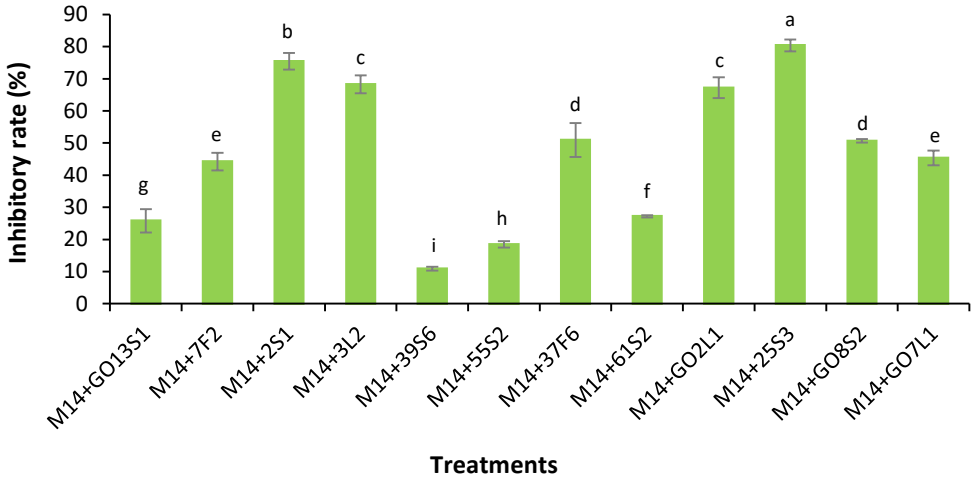
تمامی آزمون‌ها در شرایط آزمایشگاهی و آزمون‌های بیماری‌زایی و مهار زیستی در شرایط گلخانه در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد. برای تجزیه آماری از نرم افزار SAS ver 9.4 و مقایسه میانگین ها در سطح ($P \leq ۰/۰۱$) و ($P \leq ۰/۰۵$) با آزمون چنددامنه‌ای دانکن انجام شد. جهت رسم جدول و نمودارها از نرم‌افزار Microsoft excel, 2019 استفاده شد.

نتایج

بازدارندگی از رشد رویشی *Macrophomina phaseolina* در آزمون کشت متقابل

در آزمون کشت متقابل به ترتیب جدایه *F. incarnatum* 25S3 با بیش از ۸۰ درصد بیشترین میزان بازدارندگی و بعد از آن جدایه‌های *Ch. globosum* 2S1 و *Ch. globosum* 3L2 بیش از ۶۷ درصد بازدارندگی و جدایه *F. acuminatum* GO2L1 با ۵۰ درصد، کمترین میزان بازدارندگی را در بین پنج جدایه داشتند (شکل ۱). بر اساس این نتایج، پنج جدایه اندوفیت با بیشترین میزان بازدارندگی از رشد رویشی بیمارگر برای ادامه آزمون‌ها انتخاب شدند که این قارچ‌ها شامل *Ch. globosum* 2S1، *Ch. globosum* 3L2، *F. fujikuroi* 37F6، *F. incarnatum* 25S3 و *F. acuminatum* GO2L1 می‌باشند.

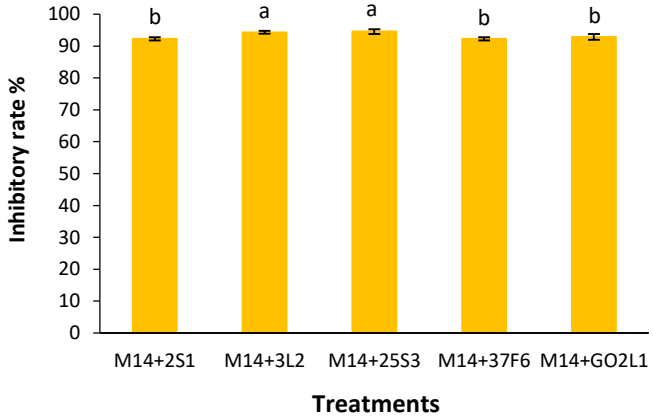
1Water Agar



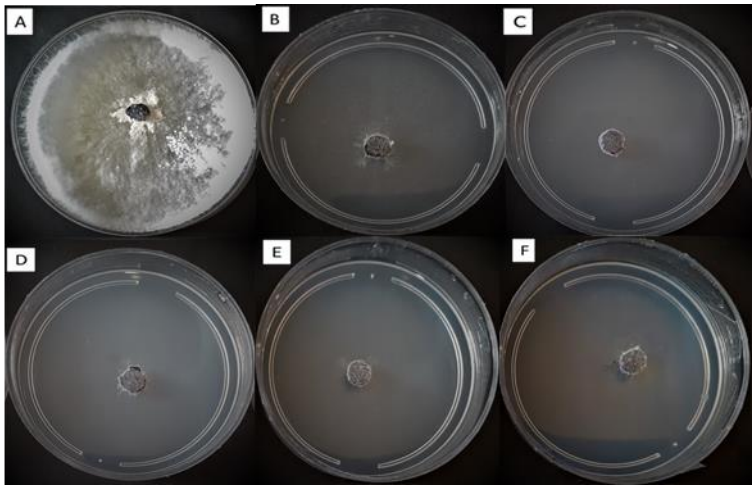
شکل ۱. مقایسه آماری درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ *Macrophomina phaseolina* توسط جدایه‌های قارچی اندوفیت در آزمون کشت متقابل. تیمارهای دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (دانکن، $P \leq ۰/۰۱$). خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می‌باشد. M14: *M. phaseolina*، 3L2 :*Ch. globosum* 2S1:2S1، *Au. microstictum* 7F2 :7F2، *Ac. sclerotigenum* GO13S1 :GO13S1، *Ch. globosum* 3L2 :3L2، *globosum* 39S6 :39S6، *Co. endophytica* 55S2 :55S2، *F. fujikuroi* 37F6 :37F6، *F. lateritium* 61S2 :61S2، *F. acuminatum* GO2L1 :GO2L1، *F. incarnatum* 25S3 :25S3، *H. desertipleosporoides* GO8S2 :GO8S2، GO7L1: *N. serpens*.

اثر ترکیبات فرار

بر اساس نتایج، همه جدایه‌های اندوفیت بیش از ۹۰ درصد بازدارنده رشد پرگنه قارچ بیمارگر بودند. جدایه *F. incarnatum* 25S3 با ۹۴/۴ بیشترین و جدایه *F. fujikuroi* 37F6 با ۹۲ درصد کمترین میزان فعالیت بازدارندگی را نشان داد (شکل‌های ۲ و ۳).



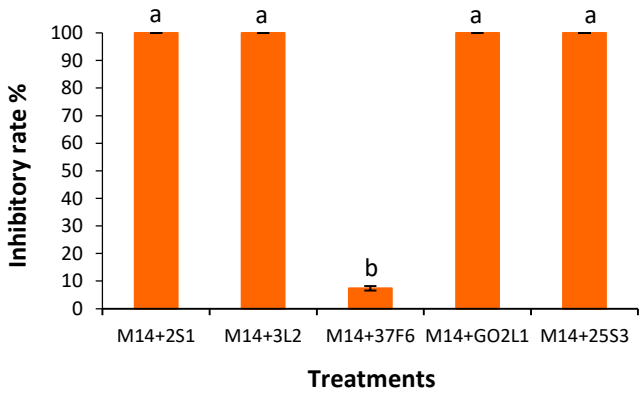
شکل ۲. مقایسه آماری درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ *Macrophomina phaseolina* در آزمون اثر متابولیت‌های فرار تولید شده توسط جدایه‌های قارچی اندوفیت. تیمارهای دارای حروف مشترک تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (دانکن، $P \leq ۰/۰۱$). خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می‌باشد. M14: *M. phaseolina*، 3L2 :*Ch. globosum* 2S1 :2S1، *F. incarnatum* 25S3 :25S3، *F. fujikuroi* 37F6 :37F6، *F. acuminatum* GO2L1 :GO2L1.



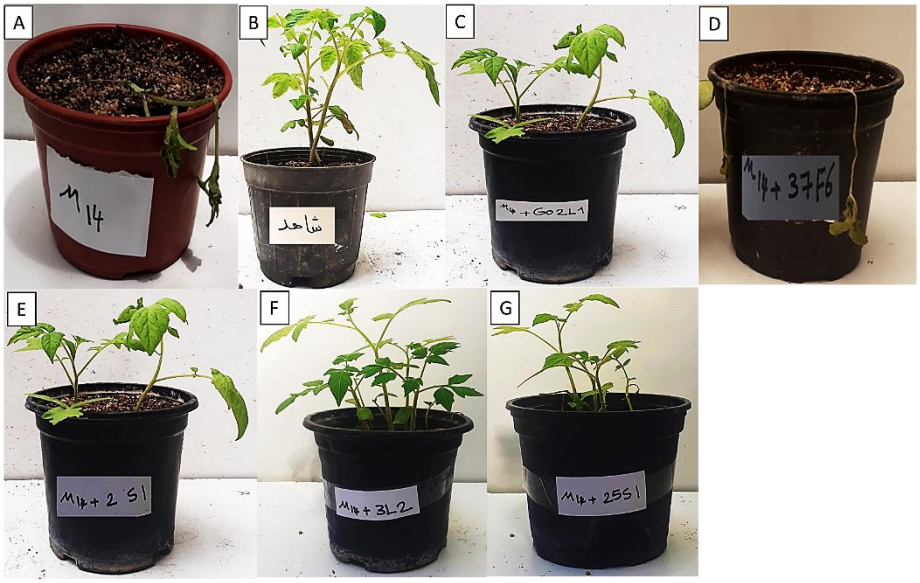
شکل ۳. اثر ترکیبات فرار جدایه‌های قارچی اندوفیت روی رشد میسلیومی قارچ *Macrophomina phaseolina*. A) تیمار شاهد قارچ بیمارگر، اثر ترکیبات فرار جدایه‌های: B) *F. acuminatum* GO2L1، C) *Ch. globosum* 2S1، D) *F. fujikuroi* 37F6، E) *F. acuminatum* 25S3، F) *Ch. globosum* 3L2 روی رشد میسلیومی جدایه *M. phaseolina* M14.

مهار بیماری در شرایط گلخانه‌ای

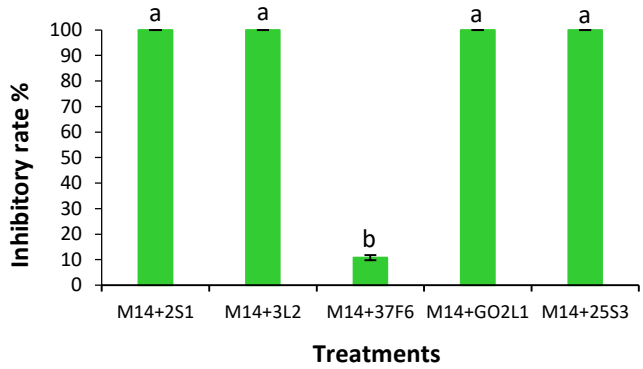
در این آزمون، اثر مهار زیستی پنج جدایه قارچ اندوفیت منتخب که در شرایط آزمایشگاهی بیشترین اثر بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر را نشان دادند، در شرایط گلخانه روی دو گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی مورد بررسی قرار گرفت. در استفاده از این قارچ‌ها، کاهش شیوع بیماری ناشی از قارچ *M. phaseolina* در مقایسه با تیمار شاهد آلوده (بیمارگر به تنهایی) مشاهده شد. در هر دو گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی تمامی جدایه‌ها به جز جدایه *F. fujikuroi* 37F6 مانع از ایجاد علائم بیماری روی گیاه شدند و همه گیاهان تیمار شده با این قارچ‌ها کاملا سالم بودند. اما گیاهانی که با جدایه *F. fujikuroi* 37F6 مایه‌زنی شده بودند بیش از ۹۰ درصد آلوده شده و علائم بیماری را نشان دادند (شکل‌های ۴، ۵، ۶ و ۷).



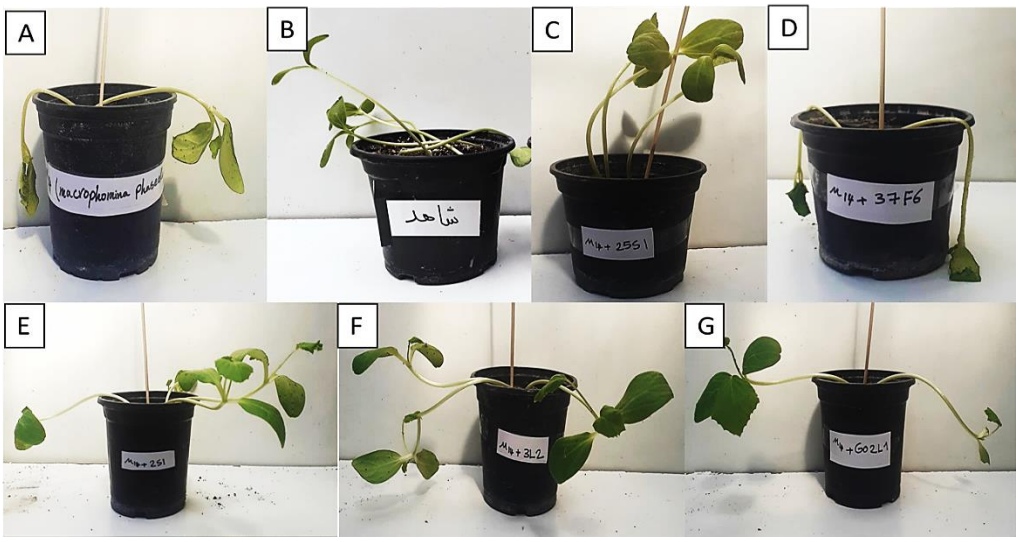
شکل ۴. مهار زیستی بیماری پوسیدگی ذغالی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه. تیمارهای با حرف مشترک از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (دانکن $P \leq ۰/۰۱$). خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می‌باشد. M14: *M. phaseolina*، 2S1: *Ch. globosum* 2S1، 3L2: *Ch. globosum* 3L2، 37F6: *F. fujikuroi* 37F6، GO2L1: *F. acuminatum* GO2L1، 25S3: *F. incarnatum* 25S3.



شکل ۵. مهار زیستی بیماری پوسیدگی ذغالی گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه با دمای ۳۰ درجه سلسیوس. A) گلدان شاهد آلوده مایه‌زنی شده با جدایه B *Macrophomina phaseolina* M14) گیاه شاهد سالم، اثر جدایه‌های: C) *F. acuminatum* GO2L1، D) *F. fujikuroi* 37F6، E) *Ch. globosum* 2S1، F) *Ch. globosum* 3L2، G) *F. acuminatum* 25S3 روی رشد بیماری.



شکل ۶. مهار زیستی بیماری پوسیدگی ذغالی طالبی در شرایط گلخانه. تیمارهای با حرف مشترک از نظر آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر ندارند (دانکن، $P \leq ۰/۰۱$). خطوط روی ستون‌ها خطای استاندارد (±SE) می‌باشد. M14: *Macrophomina phaseolina*، 2S1: *Ch. globosum* 2S1، 3L2: *Ch. globosum* 3L2، 37F6: *F. fujikuroi* 37F6، GO2L1: *F. acuminatum* GO2L1، 25S3: *F. incarnatum* 25S3.



شکل ۷. مهار زیستی بیماری پوسیدگی ذغالی طالبی در شرایط گلخانه با دمای ۳۰ درجه سلسیوس. A) گلدان شاهد آلوده مایه‌زنی شده با جدایه B) گیاه شاهد سالم، اثر جدایه‌های: C) *Macrophomina phaseolina* M14، D) *F. acuminatum* 25S3، E) *F. fujikuroi* 37F6، F) *Ch. globosum* 2S1، G) *Ch. globosum* 3L2 و *F. acuminatum* GO2L1 روی رشد بیماری.

ارزیابی شاخص‌های رشدی گیاه

با توجه به داده‌های جدول ۲ به ترتیب در گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی، بوته‌هایی که تنها با قارچ‌های اندوفیت مایه‌زنی شده بودند از نظر وزن تر و خشک تفاوت زیادی با گیاه شاهد سالم ندارند، بدین معنی که این قارچ‌ها تاثیری روی شاخص‌های رشدی گیاه نداشته‌اند. اما از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری در وزن تر و خشک گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های قارچی اندوفیت به همراه قارچ بیمارگر در مقایسه با گیاه شاهد آلوده وجود دارد و در این تیمارها نسبت به شاهد آلوده، وزن تر و خشک به میزان کمی کاهش پیدا کرده است (جدول ۲). بدین معنی که قارچ‌های اندوفیت با پیشگیری و کاهش بیماری از کاهش شاخص‌های رشدی ممانعت کرده‌اند.

جدول ۲. میانگین شاخص‌های وزن خشک و وزن تر (گرم) و ارتفاع (سانتی‌متر) بوته‌های گوجه‌فرنگی و طالبی مایه‌زنی شده با قارچ *Macrophomina phaseolina* و جدایه‌های قارچی اندوفیت در شرایط گلخانه‌ای.

تیمارها	ارتفاع بوته (cm)		وزن تر بوته (g)		وزن خشک بوته (g)	
	گوجه‌فرنگی	طالبی	گوجه‌فرنگی	طالبی	گوجه‌فرنگی	طالبی
Control	۱۵/۱۹ ± ۰/۰۱ a	۲۰/۵۰ ± ۰/۸۴ a	۳/۱۸ ± ۰/۰۳ a	۴/۱۲ ± ۰/۰۲ a	۰/۲۲ ± ۰/۰۱ a	۰/۲۱ ± ۰/۰۱ a
2S1	۱۵/۱۵ ± ۰/۰۱ a	۲۰/۲۵ ± ۰/۳۹ a	۳/۱۶ ± ۰/۰۴ a	۴/۰۴ ± ۰/۰۶ ab	۰/۲۱ ± ۰/۰۲ ab	۰/۱۹ ± ۰/۰۲ b
3L2	۱۵/۱۲ ± ۰/۰۱ a	۲۰/۳۲ ± ۰/۴۱ a	۳/۱۷ ± ۰/۰۴ a	۴/۰۰ ± ۰/۰۶ b	۰/۲۱ ± ۰/۰۱ ab	۰/۱۹ ± ۰/۰۱ b
37F6	۱۵/۱۱ ± ۰/۰۱ a	۲۰/۲۰ ± ۰/۶۸ a	۳/۱۴ ± ۰/۰۷ a	۴/۰۳ ± ۰/۰۵ ab	۰/۲۲ ± ۰/۰۱ a	۰/۱۹ ± ۰/۰۱ b
GO2L1	۱۵/۱۵ ± ۰/۰۱ a	۲۰/۲۲ ± ۰/۳۹ a	۳/۱۸ ± ۰/۰۵ a	۴/۰۵ ± ۰/۰۵ ab	۰/۲۱ ± ۰/۰۱ ab	۰/۱۹ ± ۰/۰۲ b
25S3	۱۵/۱۵ ± ۰/۰۱ a	۲۰/۲۰ ± ۰/۲۳ a	۳/۱۴ ± ۰/۰۱ a	۴/۰۵ ± ۰/۱۱ ab	۰/۲۱ ± ۰/۰۲ ab	۰/۱۸ ± ۰/۰۱ b
Pathogen+2S1	۱۴/۶۱ ± ۰/۰۶ b	۱۹/۳۳ ± ۰/۵۲ b	۲/۹۸ ± ۰/۰۴ b	۳/۷۷ ± ۰/۰۵ c	۰/۲۰ ± ۰/۰۱ b	۰/۰۸ ± ۰/۰۱ c
Pathogen+3L2	۱۴/۶۲ ± ۰/۰۲ b	۱۹/۲۳ ± ۰/۲۶ b	۲/۹۴ ± ۰/۱۲ b	۳/۷۳ ± ۰/۰۵ c	۰/۲۰ ± ۰/۰۱ b	۰/۰۸ ± ۰/۰۱ c
Pathogen+37F6	۱۳/۹۳ ± ۰/۰۸ c	۱۸/۰۰ ± ۰/۶۳ c	۲/۰۹ ± ۰/۱۵ c	۱/۰۸ ± ۰/۱۳ d	۰/۱۱ ± ۰/۰۲ c	۰/۰۶ ± ۰/۰۱ d
Pathogen+GO2L1	۱۴/۶۴ ± ۰/۰۲ b	۱۹/۳۸ ± ۰/۴۹ b	۳/۰۱ ± ۰/۰۸ b	۳/۷۸ ± ۰/۰۶ c	۰/۲۰ ± ۰/۰۱ b	۰/۰۸ ± ۰/۰۱ c
Pathogen+25S3	۱۴/۶۶ ± ۰/۲۹ b	۱۹/۲۸ ± ۰/۳۷ b	۲/۹۷ ± ۰/۱۳ b	۳/۷۷ ± ۰/۱۲ c	۰/۲۰ ± ۰/۰۱ b	۰/۰۸ ± ۰/۰۱ c
Pathogen	۱۳/۰۰ ± ۰/۰۶ d	۱۷/۱۷ ± ۰/۹۸ d	۱/۳۶ ± ۰/۰۷ d	۰/۹۰ ± ۰/۰۶ e	۰/۰۹ ± ۰/۰۱ d	۰/۰۶ ± ۰/۰۱ d

داده‌ها میانگین ± خطای استاندارد می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی‌داری با یکدیگر ندارند (دانکن، P ≤ ۰/۰۱). *Ch. globosum* 2S1 :2S1، *Ch. globosum* 3L2 :3L2، *Ch. globosum* 37F6 :37F6، *F. fujikuroi* GO2L1 :GO2L1، *F. acuminatum* 25S3 :25S3، *F. incarnatum*.

توانایی اندوفیت شدن قارچ‌های آنتاگونیست در گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی

با کشت قارچ‌های جداسازی شده از قسمت‌های مختلف گیاهان مایه‌زنی شده با جدایه‌های قارچی اندوفیت روی محیط‌کشت WA و بعد از آن روی PDA و بررسی ریخت‌شناختی قارچ‌های رشد کرده زیر میکروسکوپ مشخص شد که قارچ‌های خالص‌سازی شده از گیاهان همان قارچ‌های اندوفیت مایه‌زنی شده بودند و در نتیجه عوامل اندوفیت استفاده شده در این آزمون، توانایی اندوفیت شدن در هر دو گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی را دارند.

بحث

قارچ *M. phaseolina* عامل بیماری پوسیدگی ذغالی، یکی از بیمارگرهای مهم خاکزاد می‌باشد. دامنه میزبانی وسیع و توان تولید اسکلروت مقاوم در این قارچ باعث شده تا مبارزه شیمیایی و زراعی (تناوب و آیش) به تنهایی جهت کنترل آن مفید نباشد (Eraghi & Rahnama, 2010; Pas *et al*., 2020). از طرفی با توجه به نقش موثر عوامل زیستی بویژه قارچ‌های اندوفیت در حمایت از گیاهان در مقابل عوامل تنش‌زای محیطی مانند شوری و خشکی، القاء سیستم دفاعی گیاه، بهبود رشد گیاه از طریق کمک به جذب مواد غذایی مورد نیاز، و کاهش خسارت آفات و عوامل بیمارگر گیاهی، به دلیل خواص ضدمیکروبی برای تحقیقات مدیریت زیستی محصولات کشاورزی و جایگزین کردن این عوامل به جای مواد و سموم شیمیایی مفید و موثر هستند (Aly *et al*., 2011; Porras-Alfaro & Bayman, 2011). در پژوهش حاضر، در راستای انجام این هدف و به‌منظور انتخاب جدایه‌های قارچی اندوفیت با قدرت بازدارندگی بیشتر، آزمون‌های آزمایشگاهی مختلفی انجام و توانایی مهار زیستی جدایه‌های منتخب در کنترل قارچ *M. phaseolina* و بهبود رشد گیاه در گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت.

بر اساس آزمون‌های آزمایشگاهی، از بین دوازده جدایه قارچی اندوفیت، پنج جدایه شامل دو جدایه از گونه *Ch. globosum* و سه گونه از جنس *Fusarium* بیشترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ بیماری‌زا را داشتند. بر اساس نتایج در آزمون کشت متقابل و تولید ترکیبات فرار جدایه *F. acuminatum* 25S3 بیشترین میزان و بعد از آن دو جدایه 3L2 و *Ch. globosum* 2S1 توانایی بازدارندگی از رشد قارچ بیماری‌زا را داشتند. پژوهش‌های پیشین نیز حاکی از قابلیت قارچ‌های اندوفیت از جمله گونه *Ch. globosum* در بازدارندگی از رشد قارچ *M. phaseolina* است. نتایج یک پژوهش نشان داد یک جدایه از گونه *Ch. globosum* بیش از ۶۸ درصد قابلیت بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ *M. phaseolina* در آزمون کشت متقابل در شرایط آزمایشگاهی را داشته است (Ranvijay *et al*., 2020). Asran-Amal *et al*. (2010)، گزارش کرده‌اند که جدایه‌های گونه *Ch. globosum* دامنه بازدارندگی بین ۵۵ تا ۷۹ درصد علیه قارچ بیماری‌زا را داشتند. جدایه‌های این قارچ بطور کلی موجب افزایش درصد جوانه‌زنی، زیست توده گیاهی و بازده گیاه نیز شده، همچنین بیماری پوسیدگی ذغالی ناشی از قارچ *M. phaseolina* را کاهش داده‌اند.

گونه‌های متعددی از جنس *Fusarium* نیز به عنوان عوامل اندوفیت با توانایی مقابله و سرکوب بیمارگرها و آفات معرفی شده‌اند از جمله گونه *F. oxysporum* که عامل بسیاری از بیماری‌های برگی در محصولات مهمی از جمله گوجه‌فرنگی می‌باشد اما جدایه‌های *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* Fol 4287, 007 که از گیاه گوجه‌فرنگی جداسازی شده‌اند قابلیت مهار زیستی بسیاری از بیماری‌های گیاه و حتی آفات را دارند (Alabouvette *et al*., 2009) که با نتایج پژوهش حاضر و عملکرد بالای گونه‌های *Fusarium* بویژه گونه *F. acuminatum* 25S3 که در آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای قابلیت زیادی در بازدارندگی از رشد قارچ *M. phaseolina* داشت، مطابقت دارد. قارچ‌های آنتاگونیست با تولید متابولیت‌های ثانویه مختلف از جمله آنزیم‌هایی مانند سلولاز با عوامل بیمارگر مقابله می‌کنند. آنزیم کیتیناز با تجزیه کیتین موجود در دیواره سلولی عوامل بیماری‌زا باعث مرگ آن‌ها می‌شوند (Klemsdal *et al*., 2006; Gan *et al*., 2007). آنزیم سلولاز نیز به نفوذ عامل اندوفیت به داخل گیاه کمک می‌کند و با تخریب دیواره و نفوذ به گیاه موجب فعال شدن سیستم دفاعی گیاه می‌شود (Amirita *et al*., 2012). عوامل اندوفیتی با کمک به جذب مواد غذایی، به رشد گیاه کمک می‌کنند. از جمله قابلیت حل فسفات معدنی

که فسفات قابل جذب برای گیاهان می‌باشد و از این طریق منجر به تسریع رشد گیاه و مقابله بهتر آن در برابر عوامل بیماری‌زا می‌شوند (Santoyo *et al*., 2016). در بررسی‌های گلخانه‌ای تحقیق حاضر، تنها جدایه *F. fujikori* 37F6 نسبت به سایر جدایه‌ها قدرت بازدارندگی کمی نشان داد که این نتیجه با نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی مطابقت دارد.

Jamal *et al*. (2021) اثر مخمرهای اندوفیت در بازدارندگی از علائم قارچ *M. phaseolina* روی گیاه گوجه‌فرنگی را بررسی کردند. در بین جدایه‌های مورد بررسی بیشترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر در تیمار گونه *Meyerozyma guiliermondi* مشاهده شد. گیاهان تیمار شده با این مخمر صددرصد سالم بوده و این مخمر نسبت به گیاه شاهد آلوده موجب افزایش معنی‌داری در شاخص‌های رشدی گیاه از جمله وزن تر، خشک و ارتفاع قسمت‌های هوایی گیاه شد. در پژوهش حاضر، در مقایسه گیاهان تیمار شده با قارچ‌های اندوفیت و شاهد آلوده و سالم می‌توان استنباط کرد که جدایه‌های اندوفیت منتخب تاثیری روی شاخص‌های رشدی دو گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی نداشتند اما تاثیرات سوء عامل بیماری‌زا را کاهش داده و در نتیجه باعث کاهش علائم بیماری پوسیدگی ذغالی شدند. در مطالعه‌ای دیگر، Moin *et al*. (2021) تاثیر گونه‌های مختلف تریکودرما را روی قارچ *M. phaseolina* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بررسی کردند. در آزمون کشت متقابل از بین ۲۰ جدایه تریکودرما بیشترین بازدارندگی به ترتیب مربوط به جدایه‌های *Trichoderma psuedokoningii*، *T. viride* ET-3 و *T. viride* ET-8 بود. در آزمون‌های گلخانه‌ای و با تیمار گیاهان گوجه‌فرنگی با جدایه‌های اندوفیتی مختلف، بیشترین میزان بازدارندگی از علائم قارچ بیماری‌زا مربوط به جدایه *T. viride* ET-4 بوده و گیاهان تیمار شده با این قارچ در مقایسه با تیمار شاهد علائمی از خود نشان نداده و بازدارندگی حدود صددرصد بوده است.

در مطالعه حاضر، جدایه‌های منتخب قادر به اندوفیت شدن در بافت هر دو گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی بوده و بعد از رشد گیاه مجددا از گیاهان مایه‌زنی شده جداسازی شدند. Ebrahimi *et al*. (2022) گزارش کردند که این جدایه‌های قارچی اندوفیت جداسازی شده از سیب بومی اثر آنتاگونیستی جالب توجهی علیه بیماری لکه سیاه سیب نشان داده‌اند. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که قارچ‌های آزمایش شده اندوفیت اختصاصی میزبانی نبوده و در گیاهانی از خانواده‌ها و گروه‌های مختلف قابلیت اندوفیت شدن را دارند و این قارچ‌ها در کنار طیف میزبانی جالب توجه، اثر آنتاگونیستی قابل قبولی را نیز علیه بیماری پوسیدگی ذغالی در این میزبان‌های گیاهی نشان دادند که این توانایی، قابلیت استفاده از آن‌ها را در مهار زیستی بیماری‌های مختلف افزایش می‌دهد.

نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج تحقیق حاضر و دستاوردهایی تحقیقات صورت گرفته در جهان و ایران می‌توان آینده روشنی را برای مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی و تولید غذای سالم متصور شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جدایه‌های اندوفیت مورد استفاده، پتانسیل زیادی در مهار قارچ *M. phaseolina* در آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای روی گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی دارند. همچنین این نتایج نشان داد که کاهش یا مهار بیماری پوسیدگی ذغالی ناشی از مکانیسم‌های متنوع از جمله تولید متابولیت‌های مختلف و ترکیبات فرار توسط قارچ‌های اندوفیت است. قارچ‌های اندوفیت از طریق تولید متابولیت‌های مختلف و تخریب دیواره سلولی عوامل بیمارگر و کمک به جذب مواد غذایی و بهبود رشد گیاه موجب مقابله بهتر گیاه با عوامل بیمارگر می‌شوند. در نهایت باید گفت مدیریت قارچ *M. phaseolina* به علت توانایی بقا به صورت اسکلروت در شرایط نامساعد و نیز مقاومت به قارچ‌کش‌های شیمیایی بسیار مشکل است و هنوز مقاومت طبیعی علیه این بیماری در گیاه گوجه‌فرنگی و طالبی مشاهده نشده است ضمن اینکه مبارزه شیمیایی به عنوان مهم‌ترین راه برای کاهش خسارات آن محسوب می‌شود. بنابراین استفاده از عوامل مهار زیستی از جمله قارچ‌های اندوفیت به عنوان روش‌های جایگزین یا در کنار سایر روش‌ها می‌تواند در کاهش بیماری مؤثر واقع شود. هرچند قارچ‌های اندوفیت مورد استفاده در این پژوهش، اثر مهار زیستی قابل قبولی را نشان دادند، با این حال، اثر مهار کنندگی این عوامل بایستی روی جدایه‌های مختلف قارچ عامل بیماری، روی ارقام مختلف دو

محصول مورد بررسی، و نیز در شرایط مزرعه مورد ارزیابی قرار گیرد. در صورت حصول نتایج قابل قبول، می‌توان این عوامل را در راستای مدیریت سازگار با محیط‌زیست و تولید محصول سالم مورد استفاده قرار داد.

منابع

پاس، مژگان ،. شهبازی، حدیث،. و ابراهیمی، لیلا (۱۳۹۹). بررسی اثر مهار زیستی قارچ Macrophomina phaseolina توسط باکتری سودوموناس فلورسنت بر روی لوبیا و ارزیابی میزان فنل کل ریشه. یافته‌های نوین در علوم زیستی، ۷ (۱)، ۶۴-۷۵.

زراعتکار، محدثه،. بهبودی، کیوان،. و بردی‌فتوحی‌فر، خلیل. (۱۳۹۹). ارزیابی برخی قارچ‌های اندوفیت گیاهی در کنترل بیولوژیک بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی گوجه فرنگی. کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی، ۹ (۲)، ۱۰۳-۱۱۴.

خیری، عباس ،. اعتباریان، حسن‌رضا،. روستایی، علی،. خداکرمیان، غلام،. و امینیان، حشمت‌اله (۱۳۸۸). بررسی امکان کنترل بیولوژیک بیماری ساق سیاه خربزه (Macrophomina phaseolina) با استفاده از جدایه‌های Pseudomonas fluorescens. مجله کشاورزی (منتشر نمی شود)، ۱۱ (۱)، ۳۵-۴۶.

کاری دولت‌آبادی، حسین،. اسدی رحمانی، هادی،. و رجالی، فرهاد (۱۳۹۸). شناسایی و بررسی خصوصیات محرک رشدی و بیوکنترلی قارچ‌های اندوفیت جدا شده از برگ و میوه پسته. زیست شناسی خاک، ۷ (۱)، ۵۳-۷۱.

عراقی، میرمعصوم،. و رهنما، کامران (۱۳۹۰). ارزیابی جدایه‌های Bacillus subtilis در کنترل بیولوژیکی پوسیدگی ریشه آفتابگردان ناشی از Macrophomina phaseolina (Tassi) Goid. گیاه پزشکی (مجله علمی کشاورزی)، ۳۴ (۱)، ۱-۱۱.

غفاریان، احمدرضا (۱۳۷۹). مبارزه بیولوژیک با M. phaseolina عامل بیماری ساق سیاه خربزه توسط قارچهای آنتاگونیست تریکودرما و گلیوکلادیوم. پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه اهواز. ۱۰۱ صفحه.

REFRENCES

Alabouvette, C., Olivain, C., Migheli, Q., & Steinberg, C. (2009). Microbiological control of soil-borne phytopathogenic fungi with special emphasis on wilt-inducing *Fusarium oxysporum*. *New Phytologist*, 184 (3), 529-544.

Aly, A.H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 90, 1829-1845.

Amirita, A., Sindhu, P., Swetha, J., Vasanthi, N.S., & Kannan, K.P. (2012). Enumeration of endophytic fungi from medicinal plants and screening of extracellular enzymes. *World Jornal of Science and Technology*, 2 (2), 13-19.

Asran-Amal, A., Moustafa-Mahmoud, S.M., Sabet, K.K., & El Banna, O.H. (2010). In vitro antagonism of cotton seedlings fungi and characterization of chitinase isozyme activities in *Trichoderma harzianum*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 17(2), 153-157.

Bergougnoux, V. (2014). The history of tomato: from domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*, 32 (1), 170-189.

Chamorro, M., Miranda, L., Domínguez, P., Medina, J. J., Soria, C., Romero, F., ... & De los Santos, B. (2015). Evaluation of biosolarization for the control of charcoal rot disease (*Macrophomina phaseolina*) in strawberry. *Crop Protection*, 67, 279-286.

Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57 (1), 25-IN3.

Dolatabadi, H.K., Javan-Nikkhah, M., & Shier, W.T. (2017). Evaluation of antifungal, phosphate solubilisation, and siderophore and chitinase release activities of endophytic fungi from *Pistacia vera*. *Mycological Progress*, 16, 777-790 (In Persian).

Ebrahimi L., Hatami Rad S., & Etebarian H.R. (2022). Apple endophytic fungi and their antagonism against apple scab disease. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1024001. 10.3389/fmicb.2022.1024001.

Eitenmiller, R.R., Johnson, C.D., Bryan, W.D., Warren, D.B., & Gebhardt, S.E. (1985). Nutrient composition of cantaloupe and honeydew melons. *Journal of Food Science*, 50 (1), 136-138.

Eraghi, M.M., & Rahnama, K. (2010). Evaluation of *Bacillus subtilis* isolates in biological control of sunflower root rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *JPP*, 34 (1), 1-11 (In Persian).

Etebarian, H.R., Sholberg, P.L., Eastwell, K.C., & Sayler, R.J. (2005). Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 51 (7), 591-598.

Etebarian, H.R., Kheiri, A., Roustaei, A., Khodakaramian, G.H., & Aminian, H. (2007). Evaluation of *Pseudomonas* isolates for biological control of charcoal stem rot of melon caused by *Macrophomina phaseolina*. *Acta Horticulture*, 761: 157-162 (In Persian).

Farr, D.F., & Rossman, A.Y. (2014). *Fungal Databases, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory*, ARS, USDA. Retrieved November. 10, 2014.

Ghafarian, A.R. (2000). Biological control of *Macrophomina phaseolina* causual agant of charchoal rot disease by antagonistic fungi *Trichoderma* spp. & *Ghliocladium* virens. Master thesis, Ahwaz University. 101p (In Persian).

Gan, Z., Yang, J., Tao, N., Liang, L., Mi, Q., Li, J., & Zhang, K.Q. (2007). Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpchi1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 1309-1317.

Gray, L.E. (1978). Effect of soil fumigation on soybean diseases and plant yield. *Plant Disease Reporter*, 62, 613–615.

González, V., Armijos, E., & Garcés-Claver, A. (2020). Fungal endophytes as biocontrol agents against the main soil-borne diseases of melon and watermelon in Spain. *Agronomy*, 10 (6), 820.

Jamal, A., Farhat, H., Urooj, F., Rahman, A., Irfan, M., & Ehteshamul-Haque, S. (2021). Characterization of endophytic yeast and its suppressive effect on root rotting fungi of tomato under neem cake soil amendment. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 31, 1-12.

Jimenez-Diaz, R.M., Blanco-López, M.A., & Sackston, W.E. (1983). Incidence and distribution of charcoal rot of sunflower caused by *Macrophomina phaseolina* in Spain. *Plant Disease*, 67 (9), 1033-1036.

Klemsdal, S.S., Clarke, J.L., Hoell, I.A., Eijsink, V.G., & Brurberg, M.B. (2006). Molecular cloning, characterization, and expression studies of a novel chitinase gene (ech30) from the mycoparasite *Trichoderma atroviride* strain P1. *FEMS. Microbiology letters*, 256 (2), 282-289.

Kumar, B.M. (2020). Efficacy of different fungicides and weedicides against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid causing groundnut root rot. *IJCS*, 8 (2), 2464-2472.

Laur, L. M., & Tian, L. (2011). Provitamin A and vitamin C contents in selected California-grown cantaloupe and honeydew melons and imported melons. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(2), 194-201.

Lillbro, M. (2005). *Biocontrol of Penicillium roqueforti on grain: A comparison of mode of action of several yeast species* (Doctoral dissertation, Sveriges lantbruksuniversitet).

Lodha, S., & Mawar, R. (2020). Population dynamics of *Macrophomina phaseolina* in relation to disease management: A review. *Journal of Phytopathology*, 168 (1), 1-17.

Morath, S.U., Hung, R., & Bennett, J.W. (2012). Fungal volatile organic compounds: a review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews*, 26 (2-3), 73-83.

Moin, S., Rahman, A., Parveen, G., Korejo, F., Shafique, H.A., Zehra, R., ... & Ehteshamul-Haque, S. (2021). Amelioration of systemic resistance in tomato against root rotting fungi by the endophytic *Trichoderma* species. *Pakistan Journal of Botany*, 53 (1), 321-327.

Pahlavani, M.H., Razavi, S.E., Mirizadeh, I., & Vakili, S. (2006). Field screening of safflower genotypes for resistance to charcoal rot disease. *International Journal of Plant Production*, 1: 45-52.

Parmar, H., Kapadiya, H.J., & Bhaliya, C.M. (2018). Integrated management of root rot of castor (Ricinus communis L.) caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *International Journal of Chemical Studies*, 6 (1), 849-851.

Pas, M., Shahbazi, H., & Ebrahimi, L. (2020). The biocontrol potential of *Pseudomonas fluorescens* against *Macrophomina phaseolina* and estimating the total phenol compounds of bean roots. *Nova Biologica Reperta*, 7 (1), 64-75. (In Persian).

Pearson, C.A.S., Schwenk, F.W., Crowe, F.J., & Kelley, K. (1984). Colonization of soybean roots by *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, 68 (12), 1086-1088.

Porras-Alfaro, A., & Bayman, P. (2011). Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 291-315.

Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, F.M., & Smilanick, J.L. (2012). Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 63 (1), 141-147.

Ranvijay, P.M., Kumar, A., & Mishra, S. (2020). In vitro efficacy of bioagents and fungicides on the management of dry root rot of cluster bean (*Macrophomina phaseolina*). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 9 (9), 2022-2033.

Santoyo, G., Moreno-Hagelsieb, G., del Carmen Orozco-Mosqueda, M., & Glick, B.R. (2016). Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiological Research*, 183, 92-99.

Schalchli, H., Tortella, G.R., Rubilar, O., Parra, L., Hormazabal, E., & Quiroz, A. (2016). Fungal volatiles: an environmentally friendly tool to control pathogenic microorganisms in plants. *Critical Reviews in Biotechnology*, 36 (1), 144-152.

Shehzad, S.A., Sattar, A., & Ghaffar, A. (1988). Addition to the hosts of *Macrophomina phaseolina. Pakistan Journal of Botany*, 20, 151-152.

Short, G.E., Wyllie, T.D., & Ammon, V.D. (1978). Quantitative enumeration of *Macrophomina phaseolina* in soybean tissues. *Phytopathology*. 68 (5), 736-741.

Sinclair, J.B., & Backman, P.A. (1989). *Compendium of soybean diseases* (No. BOOK). American Phytopathological Society.

Smith, G.S., and Carvil, O.N. (1997). Field screening of commercial and experimental soybean cultivars for their reaction to *Macrophomina phaseolina*. *Plant Disease*, 81, 363–368.

Sridharan, A.P., Thankappan, S., Karthikeyan, G., & Uthandi, S. (2020). Comprehensive profiling of the VOCs of *Trichoderma longibrachiatum* EF5 while interacting with *Sclerotium rolfsii* and *Macrophomina phaseolina*. *Microbiological Research*, 236, 126436.

Strobel, G., & Daisy, B. (2003). Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4), 491-502.

Toghueo, R.M.K., Ejiya, I.E., Sahal, D., Yazdani, S.S., & Boyom, F.F. (2017). Production of cellulolytic enzymes by endophytic fungi isolated from Cameroonian medicinal plants. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 (2), 1264-1271.

Wyllie, T.D., & Scott, D.H. (1988). *Soybean diseases of the north central region*. APS Press.

Zeratkar, M., Behboudi, K., & Fotouhifar, K.B. (2021). Evaluation of some plant endophytic fungi in biological control of tomato Verticillium wilt disease. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 9 (2), 103-114 (In Persian).