

مقاله تحقیقی

جداسازی و شناسایی سویه‌های متعلق به جنس قارچی *Bipolaris* به عنوان مهارگرهای زیستی *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* عامل بیماری پاخوره گندم

معصومه غلامی^۱، جهانشیر امینی^۲، جعفر عبدالله زاده^۳، مزاحم آشکرف^۴

۱، ۲، ۳- دانشجوی سابق دکتری، استاد، دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

۴- استاد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.

مسئول مکاتبات: جهانشیر امینی، ایمیل: Jamini@uok.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۱/۲۰

۱۰-۸۱ (۲) ۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۱۰/۱۶

چکیده

بیماری پاخوره گندم ناشی از قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) یکی از بیماری‌های مهم روی گندم، جو و چاودار در دنیا است. کنترل بیولوژیک یکی از روش‌های مهم جهت حفاظت گیاهان در مقابل بیماری‌های گیاهان به خصوص عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد است. در این مطالعه، دو سویه قارچ اندوفیت *Ag2k1* و *O31R3* از گیاهان غلات سالم جداسازی و توانایی آنها به عنوان عوامل کنترل زیستی بر علیه قارچ *Ggt* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفت. دو جدایه *Ag2k1* و *O31R3* بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و مولکولی (توالی ناحیه ITS rDNA) بترتیب به عنوان *Bipolaris sorokiniana* و *Bipolaris victoriae* شناسایی شدند. بیماری‌زایی قارچ بیمارگر روی گیاه گندم رقم پیشتاز انجام شد. علائم بیماری ۲۰ روز پس از مایه‌زنی به صورت زردی، کوتولگی، سیاه شدگی ریشه و طوقه گیاه ظاهر شد. دو قارچ اندوفیت *Ag2K1* *B. sorokiniana* و *B. victoriae* *O31R3* در شرایط آزمایشگاه در روش کشت متقابل رشد پرگنه قارچ بیمارگر را بترتیب به میزان ۳۳/۸۵ و ۶۵/۴۱ درصد کاهش دادند. اما ترکیبات فرار و غیر فرار هر دو جدایه قارچ اندوفیت تاثیر کمی روی کاهش رشد پرگنه قارچ *Ggt* داشتند (۱۱/۴۸-۲/۶۷ درصد). در شرایط گلخانه دو قارچ اندوفیت *Ag2K1* *B. sorokiniana* و *O31R3* *B. victoriae* شدت بیماری پاخوره گندم را بترتیب به میزان ۵۱/۳۲ و ۵۳/۵۵ درصد کاهش دادند. هر دو جدایه قارچ اندوفیت تولید آنزیم پکتیناز کردند. جدایه *B. victoriae* *O31R3* تولید آنزیم کتیناز کرد. هیچ‌یک از دو جدایه قارچ اندوفیت قادر به تولید آنزیم پروتاز، سلولاز، سیدروفور، سیانید هیدروژن و حلالت فسفات نبودند. همچنین هر دو جدایه قارچ اندوفیت *Ag2K1* *B. sorokiniana* و *B. victoriae* *O31R3* هورمون اکسین و جیبرلین تولید کردند و پارامترهای رشدی گیاه گندم مثل ارتفاع ساقه، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک ساقه را در شرایط گلخانه به میزان قابل توجهی افزایش دادند. نتایج آزمایشگاه و گلخانه نشان داد که دو قارچ اندوفیت مورد مطالعه توانایی قابل توجهی در مهار زیستی قارچ *Ggt* عامل بیماری پاخوره گندم داشتند. همچنین این دو جدایه روی گیاهچه‌های آلوده گندم هیچ علائم بیماری ایجاد نکردند. این دو جدایه ممکن است به عنوان عوامل کنترل زیستی در مدیریت بیماری پاخوره گندم در شرایط مزرعه موثر باشند.

واژه‌های کلیدی: اندوفیت‌های قارچی، ترکیبات ضدقارچی، کنترل زیستی، ژن ITS rDNA

مقدمه

گندم (*Triticum aestivum* L.) یکی از مهمترین گیاهان خانواده غلات در جهان است (Zhao et al., 2023). یکی از بیماری‌های مهم خاکزاد که به سیستم ریشه گندم خسارت وارد می‌کند و سبب کاهش کمی و کیفی محصول می‌شود، بیماری پاخوره گندم است که توسط قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) می‌گردد و در سطح کل جهان انتشار دارد (Zhao et al., 2023; Schalchli et al., 2012). در استان کردستان نیز بیماری پاخوره گندم به صورت جدی سبب کاهش عملکرد محصول گندم می‌شود. این بیماری یکی از بیماری‌های خاکزاد مخرب در دنیا است (Yang et al., 2015; Kwak et al., 2009; Yu et al., 2009). پاخوره گندم یک بیماری جدی روی گیاه گندم در استان کردستان است (Gholami et al., 2019) که سبب کاهش محصول گندم می‌شود (Zhang et al., 2020). قارچ عامل بیماری سبب پوسیدگی ریشه، طوقه و قسمت‌های پایین ساقه می‌شود و باعث تخریب آوندهای چوبی گیاه، اختلال در انتقال آب و مواد غذایی و سرانجام سبب زردی و پوکی خوشه‌های گندم می‌شود (Palma-Guerero et al., 2021; Asher & Shipton, 1981; Liu et al., 2009). بکارگیری روش‌های سنتی به دلیل نبود ارقام مقاوم، موثر نبودن تناوب و محدودیت کاربرد قارچکش‌ها در خاک جهت مدیریت بیماری پاخوره گندم موثر نبوده و کاربرد روش‌های جایگزین بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (Zhang et al., 2011; Ghahfarokhy et al., 2021). بنابراین، روش کنترل زیستی و استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک به عنوان یک راهبرد مناسب و روش جایگزین دوستدار محیط زیست به منظور مدیریت بیماری پاخوره گندم یک ضرورت است (Liu & Zhou, 2013). عوامل کنترل بیولوژیک به صورت مستقیم (پارازیتسم، آنتی‌بیوز، تولید متابولیت‌های سلولی، رقابت) و غیر مستقیم (تحریک مقاومت گیاه) از فعالیت عوامل بیماری‌زای گیاهی جلوگیری می‌کنند (Pal & Gardener, 2006). اندوفیت‌ها گروهی از میکروارگانیسم‌ها هستند که بافت‌های داخلی گیاهان را کله می‌کنند و با

میزبان خود ارتباط متقابل ایجاد می‌کنند و گیاهان را در مقابل آفات و بیماری‌ها محافظت می‌کنند و تحمل و مقاومت گیاهان میزبان را در مقابل عوامل بیماری‌زا افزایش می‌دهند (Sim et al., 2019; Yan et al., 2019; Collinge et al., 2019; Zhang et al., 2014; Xiang et al., 2016). قارچ‌های اندوفیت با تولید متابولیت‌های ثانویه (آنتی‌بیوز)، رقابت بر سر مواد غذایی و پارازیت کردن میسلیوم قارچ‌ها، از گیاهان در مقابل عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند (Waqas et al., 2012). کارایی اندوفیت‌ها به‌عنوان عوامل بیوکنترل، بستگی به شرایط مختلفی از جمله شرایط میزبان، جمعیت دینامیک اندوفیت، الگوی کلونیزاسیون و توانایی نفوذ اندوفیت به بافت‌های داخلی گیاه میزبان دارد (Backman et al., 1997).

اندوفیت‌ها می‌توانند از طریق بذر، ریشه، منافذ طبیعی و زخم‌های ایجاد شده روی اندام‌های گیاه به داخل گیاه وارد شده و از پیشرفت بیمارگرهای گیاهی جلوگیری کنند. همچنین این میکروارگانیسم‌ها با تولید هورمون اکسین، جبرلین و افزایش حلالیت فسفر سبب افزایش رشد گیاهان می‌شوند (Ryan et al., 2008; Gholami et al., 2019; Chebotar et al., 2015). تعداد زیادی از قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست مثل گونه‌های *Pseudomonas* spp. (Vera Palma et al., 2019; Weller & Cook, 2001)، گونه‌های *Bacillus* spp. (Delaney et al., 2001; Zhao et al., 2023; Liu et al., 2022)، گونه‌های *Streptomyces*، *Microbispora* و *Nocardioideis* (Coombs et al., 2004) و قارچ‌های اندوفیت *Rhizoctonia endophytica*، *Coprinopsis urticicola*، *Fomes fomentarius* و *zeae* (Gholami et al., 2019) به عنوان عوامل کنترل زیستی بیماری پاخوره گندم گزارش شده‌اند. در سال‌های اخیر استفاده از قارچ‌های اندوفیت به عنوان عوامل کنترل بیولوژیک بر علیه عوامل بیماری‌زای خاکزاد گیاهان در حال افزایش و توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است (Ajijah et al., 2024; Jolanta et al., 2008; Silva et al., 2023).

(Doxycycline, Iran Daru) در داخل ظروف پتری کشت شدند. ظروف پتری در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس در تاریکی به مدت هفت روز نگهداری شدند. سرانجام نمونه‌ها با روش تک اسپور و نوک هیف خالص‌سازی و در دمای چهار درجه سلسیوس روی محیط غذایی PDA در یخچال ذخیره شدند.

شناسایی قارچ‌های اندوفیت

جهت شناسایی قارچ‌های اندوفیت، آنها را روی محیط‌های غذایی PDA، Malt extract agar (MEA) و Potato carrot agar (PCA) کشت و در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس در تاریکی به مدت دو هفته نگهداری شدند. سپس جدایه‌های قارچ بر اساس صفات ریخت‌شناسی به وسیله میکروسکوپ نوری (Olympus BX51) با استفاده از منابع معتبر (Sivanesan, 1987; Mnamgoda et al., 2014) و روش‌های مولکولی به شرح زیر شناسایی شدند.

استخراج DNA قارچ‌های اندوفیت بر اساس روش Raeder & Broda (1985) انجام شد. برای این منظور جدایه‌های قارچ اندوفیت در داخل فلاسک‌های ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی محیط غذایی (Potato dextrose broth (PDB)، کشت و روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ده روز نگهداری شدند. سپس محتویات ارلن‌ها روی کاغذ صافی سترون روی قیف ریخته شد و میسلوم قارچ‌های اندوفیت جمع‌آوری و توده‌های میسلومی پس از آگیری کامل به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری سترون منتقل گردید. بافت میسلومی آگیری شده درون هاون چینی و با کمک نیتروژن مایع کوبیده و سپس به میکروتیوب‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شدند. مقدار ۵۰۰ میکرولیتر بافر استخراج (200mM Tris-HCL pH 8.5, 25mM EDTA pH 8, SDS10% داخل هر کدام از میکروتیوب‌ها ریخته شد و میکروتیوب‌ها ورتکس شدند. بعد از قرار دادن میکروتیوب‌ها در حمام بن ماری با دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه، مقدار ۵۰۰ میکرولیتر کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه گردید و به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ سلسیوس سانتریفیوژ شدند. بعد از سانترفوژ، فاز رویی به

هدف از انجام این تحقیق تاثیر دو قارچ اندوفیت *Bipolaris victorae* O31R3 و *sorokiniana* Ag2K1 روی رشد پرگنه قارچ بیمارگ در شرایط آزمایشگاه و تاثیر آنها روی شدت بیماری پاخوره گندم در شرایط گلخانه است. علاوه بر این، تاثیر این دو قارچ اندوفیت روی پارامترهای رشدی گیاه گندم در شرایط گلخانه بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

قارچ عامل بیماری‌زا

سویه قارچ بیمارگر *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* G6 (Ggt) به شماره دسترسی MH488732 از کلکسیون قارچ‌های آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان تهیه گردید. سویه قارچ بیمارگر از روی ریشه گندم در شهرستان کامیاران جداسازی و با روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی گردید (Gholami et al., 2019). بیماری‌زایی قارچ بیمارگر روی گیاه گندم رقم پیش‌تاز بر اساس روش Weller and Cook (1983) انجام شد.

جداسازی قارچ‌های اندوفیت

به منظور جداسازی قارچ‌های اندوفیت، نمونه‌ها از گیاهان سالم خانواده گرامینه در مراحل مختلف رشدی جمع‌آوری گردید. جدایه Ag2k1 از خوشه گیاه *Aegilops triuncialis* در سنج و جدایه O31R3 از ریشه گیاه یولاف *Avena fatua* در روستای نسا در پره گیلان غرب جداسازی گردید. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه و شستشوی آنها با آب معمولی و حذف گل ولای، بخش‌های ریشه، طوقه و ساقه و برگ آنها را به قطعات ۳-۵ میلی‌متری تقسیم گردید. نمونه‌ها به ترتیب به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد، سه دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم پنج درصد، ۳۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی گردید و سرانجام سه بار با آب مقطر سترون شستشو و روی کاغذ صافی سترون خشک گردید (Larran et al., 2007). سپس نمونه‌ها روی محیط غذایی سیب زمینی دکسترز آگار (Potato dextrose agar (PDA) حاوی ۱۵۰ میلی‌گرم داکسی‌سایکلین

شد. دو جدایه متعلق به گونه‌های *Curvularia subpapendorfii* و *Curvularia buchloes* به عنوان outgroup و ۲۰ جدایه به عنوان ingroup در نظر گرفته شدند.

کنترل زیستی قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) در شرایط آزمایشگاه

تاثیر جدایه‌های اندوفیت روی رشد پرگنه قارچ بیمارگر با روش کشت متقابل

برای هر جدایه قارچ اندوفیت، یک دیسک پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ بیمارگر در یک طرف ظرف پتری حاوی محیط PDA و در نقطه مقابل نیز یک دیسک پنج میلیمتری از کشته هفت روزه سویه قارچ اندوفیت قرار داده شد. در ظرف پتری شاهد دیسک قارچ بیمارگر به تنهایی کشت گردید. هر تیمار شامل سه تکرار بود. ظروف پتری در انکوباتور در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری گردید و پس از هفت روز، شعاع پرگنه قارچ بیمارگر در تیمار و شاهد اندازه‌گیری شد. درصد بازدارندگی هر سویه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Dennis & Webster, 1971).

$$I (\%) = [(A-B/A)] \times 100$$

I: درصد بازدارندگی

A: میانگین شعاع کلونی قارچ در شاهد

B: میانگین شعاع کلونی قارچ در تیمار

تاثیر ترکیبات فرار تولید شده توسط جدایه‌های اندوفیت بر رشد پرگنه قارچ بیمارگر

یک قرص پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ بیمارگر و جدایه قارچ اندوفیت در مرکز ظروف پتری حاوی محیط PDA به صورت جداگانه کشت گردید. پتری حاوی قرص قارچ بیمارگر در شرایط سترون به صورت وارونه روی ظروف پتری حاوی قرص قارچ اندوفیت قرار داده شد و جهت جلوگیری از خروج گاز اطراف هر پتری با پارافیلیم مسدود گردید. در تیمار شاهد از محیط کشت بدون قارچ اندوفیت استفاده شد. کلیه ظروف پتری در انکوباتور در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری و پس از هفت روز، شعاع پرگنه قارچ در تیمار و شاهد اندازه‌گیری و درصد

میکروتیوب سترون جدید منتقل شد. برای رسوب DNA ژنومی، ایزوپروپانول سرد و استات سدیم ۳ مولار اضافه و به مدت یک شب در دمای -20 درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور ته‌نشین شدن DNA رسوب داده شده، میکروتیوب‌ها به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. بعد از آن DNA رسوب کرده را سه بار با ۱۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰ درصد سرد شستشو داده شد. عمل شستشو هر بار به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. برای خشک شدن کامل اتانول، نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق نگهداری شدند.

جهت انجام واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، تکثیر و توالی‌یابی ناحیه ژن ITS با استفاده از آغازگرهای ITS1 و ITS4 انجام گردید (White et al., 1990). واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر مدل BIO RAD T100™ با حجم ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر Master mix، یک میکرولیتر از هر آغازگر، سه میکرولیتر DNA و ۷/۵ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه سترون انجام شد. واسرشت سازی اولیه به مدت پنج دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس شروع و در ادامه ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال آغازگر در دمای ۵۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه و بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱/۵ دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ده دقیقه اجرا گردید. محصول واکنش PCR در روی ژل آگارز ۱٪ مشاهده شد. محصول واکنش PCR برای هر جدایه جهت تعیین توالی به شرکت بایونیرکره جنوبی (توسط شرکت تکاپو زیست) ارسال شدند. توالی‌های اولیه حاصل با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و DNA dragon بررسی و ویرایش شدند و توالی‌های برآیند به دست آمد. سپس توالی‌های برآیند بدست آمده با توالی‌های جدایه‌های معتبر موجود در بانک ژن توسط نرم‌افزار Clustal X مقایسه و همردیف شدند. سرانجام ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار Neighbor-joining انجام گرفت. آنالیزها با روش NJ انجام

برای تعیین میزان غلظت ایندول استیک اسید، در ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر با محلول حاوی یک میلی لیتر از محیط کشتی که جدایه قارچی در آن کشت نشده بود به همراه ۴ میلی لیتر معرف سالکوسکی کالیبره شد. سپس میزان جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۳۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتری مدل (SPECORD® PC/210, Analytik jena, Germany) اندازه‌گیری و پس از مقایسه با منحنی استاندارد، غلظت هورمون در هر نمونه محاسبه گردید (Ben Abdallah *et al.*, 2016; Patten & Glick, 2002).

ارزیابی تولید جیبرلین

جهت بررسی تولید هورمون جیبرلین، جدایه‌های اندوفیت (چهار قرص پنج میلی متری) در محیط Czapek broth (۳ گرم NaNO_3 ، ۱ گرم K_2HPO_4 ، ۰/۵ گرم KCl ، ۰/۵ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۱ گرم $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۳۰ گرم ساکارز در یک لیتر آب) در داخل ارلن کشت گردید و ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر تریپتوفان فیلتر شده به آن اضافه گردید. کلیه ارلن‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۶ روز روی دستگاه شیکر با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه نگهداری شدند. ارلن شاهد با قارچ مایه‌زنی نشد (Waqas *et al.*, 2012). سپس ۳۰ میلی لیتر از کشت‌های مایع ۶ روزه از هر ارلن داخل لوله‌های فالتون ریخته شد و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا هیف‌های قارچ حذف شود. پس از حذف رسوب، ۲۵ میلی لیتر از مایع رویی داخل لوله‌های جدید ریخته شد و ۲ میلی لیتر استات روی یک مولار به آن‌ها اضافه گردید. بعد از ۲ دقیقه، ۲ میلی لیتر پتاسیم فروسیانید به هر لوله اضافه شد و لوله‌ها در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مقدار جیبرلیک اسید موجود در مایع رویی بر اساس روش استاندارد تعیین شد (Uthandi *et al.*, 2010). به ازاء ۵ میلی لیتر از این مایع رویی سانتریفیوژ شده، حجم مساوی از اسید کلردریک سی درصد (HCl) به آرامی اضافه شده و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۵ دقیقه نگهداری شدند. سپس میزان جذب نور در طول موج ۲۵۴ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتری (uv-3200 Labomed) مدل

بازداندگی طبق فرمول ذکر شده در بالا محاسبه گردید (Ting *et al.*, 2010).

تأثیر ترکیبات خارج سلولی تولید شده توسط

جدایه‌های اندوفیت بر رشد پرگنه قارچ بیمارگر

ابتدا در پتری‌های حاوی محیط غذایی PDA، یک لایه کاغذ سلفون سترون روی محیط غذایی قرار داده شد و در مرکز هر پتری یک قرص پنج میلی متری از کشت هفت روزه جدایه‌های قارچ اندوفیت قرار داده شد. تمام پتری‌ها به مدت سه روز در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس کاغذهای سلفون حاوی پرگنه قارچ اندوفیت قبل از اینکه میسلیم به لبه آنها برسد، برداشته شد و یک قرص پنج میلی متری از پرگنه قارچ بیمارگر در مرکز پتری‌ها قرار داده شد. همه پتری‌ها در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس به مدت هفت روز نگهداری گردید. سرانجام درصد بازداندگی طبق فرمول ذکر شده در بالا محاسبه گردید (Zakira *et al.*, 2009; Kraus & Loper, 1990).

ارزیابی توانایی تولید ترکیبات محرک رشد گیاه

توسط سویه‌های اندوفیت

ارزیابی تولید اسید ایندول استیک

به منظور بررسی امکان تولید هورمون اسید ایندول استیک، جدایه‌های قارچ اندوفیت در محیط غذایی سیب‌زمینی دکستروز سترون حاوی هزار میلی گرم تریپتوفان فیلتر شده در داخل فلاسک ارلن ۱۰۰ میلی لیتر کشت گردید و آنها را روی دستگاه شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت هفت روز نگهداری شدند. سپس در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. دو میلی لیتر از محلول رویی برداشته و چهار میلی لیتر معرف سالکوسکی (۱۵۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی لیتر $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ نیم مولار) به آن اضافه و ترکیب به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق نگهداری گردید. تغییر رنگ نمونه‌ها به قرمز، به عنوان شاخصی برای تولید ایندول استیک اسید در نظر گرفته شد.

محلول ۲٪ Na_2CO_3 و ۵٪ Picric acid قرار داده شد و محکم با پارافيلم مسدود گردید. ظروف پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت یک هفته نگهداری شد. پس از گذشت هفت روز تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ زرد به رنگ‌های کرم، قهوه‌ای روشن، قهوه‌ای تیره و آجری نشانه تولید سیانید هیدروژن توسط قارچ‌های اندوفیت می‌باشد (Alstrom & Burns, 1989).

تولید آنزیم پروتئاز

به منظور بررسی فعالیت پروتئازی قارچ‌های اندوفیت از روش (Chantawannakul *et al.*, 2002) با کمی تغییرات استفاده شد. ابتدا جدایه‌های اندوفیتی روی محیط کشت Skim Milk Agar (SMA) شامل (۴ گرم پودر Skim Milk، ۵ گرم NaCl ، ۱ گرم پپتون و ۱۶ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) کشت و به مدت ۷۲ ساعت در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. تشکیل هاله بی‌رنگ یا شفاف در اطراف پرگنه‌های قارچی نشان دهنده فعالیت پروتئازی جدایه‌ها بود (Chantawannakul *et al.*, 2002; Tiru *et al.*, 2013).

تولید آنزیم پکتیناز

جهت بررسی فعالیت پکتینازی، قارچ‌های اندوفیت روی محیط پکتیناز آگار (۵ گرم پکتین، یک گرم عصاره مخمر، ۱۵ گرم آگار در هر لیتر در $\text{PH}=5$) کشت و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز نگهداری گردید. پس از ۵ روز محلول لوگول به ظروف پتری اضافه شد و ظهور هاله شفاف اطراف پرگنه قارچ اندوفیت نشان‌دهنده فعالیت آنزیم پکتیناز است (Sunitha *et al.*, 2013).

تولید آنزیم سلولاز

به منظور بررسی فعالیت سلولازی، قرص ۵ میلی‌متری قارچ‌های اندوفیت روی محیط Czapek-mineral salt agar (۲ گرم NaNO_3 ، یک گرم K_2HPO_4 ، ۰/۵ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۵ گرم KCl ، ۲ گرم پپتون، ۲۰ گرم آگار در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر که ۵ گرم Na-

ساخت آمریکا) اندازه‌گیری و پس از مقایسه با منحنی استاندارد میزان غلظت هورمون جیبرلین محاسبه گردید (Holbrook *et al.*, 1961).

ارزیابی تولید آنزیم حل‌کننده فسفات

توانایی تولید آنزیم حل‌کننده فسفات، توسط محیط کشت Pikovskya's agar (۱۰ گرم گلوکز، ۵ گرم $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ، ۰/۵ گرم $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ، ۰/۲ گرم NaCl ، ۰/۱ گرم $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۰۰۲ گرم MnSO_4 ، ۰/۲ گرم $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و ۱۵ گرم آگار در ۱ لیتر آب مقطر) ارزیابی شد. یک قرص ۵ میلی‌متری از پرگنه جدایه‌های قارچ اندوفیت در مرکز ظروف پتری حاوی محیط کشت مذکور قرار داده شد و پتری‌ها در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. بعد از گذشت ۷۲ ساعت، جدایه‌هایی که هاله روشن در اطراف پرگنه قارچی ظاهر گردید به عنوان فعالیت مثبت برای حل‌الیت فسفات در نظر گرفته شدند (Dias *et al.*, 2009; Gour, 1990).

بررسی توانایی تولید متابولیت‌های ثانویه و

آنزیم‌ها توسط جدایه‌های قارچ اندوفیت

تولید سیدروفور

بررسی تولید سیدروفور توسط جدایه‌های قارچ اندوفیت با استفاده از روش Schwyn and Neilands, 1987 با اندکی تغییرات و با استفاده از محیط Chrome Azorul S – blue agar (CAS) که محتوی کمپلکس iron CAS-HDTMA (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide) به رنگ آبی است، انجام شد. تغییر رنگ محیط آبی به رنگ‌های زرد تا نارنجی، قرمز و بنفش به عنوان معیاری برای تولید سیدروفور در نظر گرفته شد (Schwyn & Neilands, 1987; Louden *et al.*, 2011; Arora & Verma, 2017).

تولید سیانید هیدروژن

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن، ابتدا جدایه‌های اندوفیت روی محیط غذایی PDA کشت گردید. بعد از ۴۸ ساعت، درب ظروف پتری کاغذ صافی سترون آغشته با

سپس نمونه‌ها دوبار به فاصله ۲۴ ساعت در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه در داخل اتوکلاو سترون گردید. بعد از آن در شرایط سترون در زیر هود بیولوژیک از حاشیه کشت خالص هر کدام از جدایه قارچ اندوفیت و بیمارگر به صورت جداگانه، پنج قرص پنج میلیمتری از پرگنه هفت روزه قارچهای مذکور برداشته و داخل هر ارلن حاوی بذر گندم سترون اضافه شد. سرانجام نمونه‌ها پس از هم زدن در داخل انکوباتور در تاریکی و در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس به مدت سه هفته نگهداری شدند. جهت رشد یکنواخت پرگنه قارچهای مذکور در کل فلاسک ارلن، هر سه روز یکبار نمونه‌ها را تکان داده تا مایه قارچ با بذور گندم داخل ارلن مخلوط گردد.

اثبات بیماریزایی قارچ بیمارگر

جهت اثبات بیماریزایی جدایه قارچ بیمارگر، مایه تلقیح قارچ بیمارگر به نسبت ۲ درصد وزنی به خاک سترون در هر گلدان اضافه و مخلوط گردید. بذور گندم رقم پیشتاز، ابتدا با محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت یک دقیقه ضدعفونی و سه بار با آب مقطر سترون شستشو و در گلدانهای حاوی مخلوط خاک سترون (خاک معمولی- ماسه- کود: ۱:۱:۲ وزنی) کشت شدند. در هر گلدان پنج بذر رقم پیشتاز کشت گردید. تیمار شاهد فقط حاوی بذر سترون (بدون تلقیح مایه قارچ) بود. کلیه گلدانها به اتاقک رشد در دمای ۲۲ درجه سلسیوس، رطوبت نسبی ۶۰-۷۰ درصد و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی برای مدت ۳۵ روز نگهداری شدند. بعد از آن، گیاهچه‌ها به آرامی از درون گلدانها خارج و ریشه آنها در معرض آب معمولی ملایم شستشو داده شد. علائم بیماری روی ریشه‌ها و طوقه بررسی و شدت آلودگی بر اساس سیستم رتبه بندی از صفر تا پنج اندازه گیری شد. برای این کار، درجه صفر نماینده ریشه سالم و بدون علائم بیماری؛ درجه یک، نماینده سیاه شدن ۲۵ درصد ریشه‌ها؛ درجه دو، نماینده سیاه شدن ۱۰۰-۲۵ درصد ریشه‌ها؛ درجه سه، نماینده لکه‌هایی در محل پنجه؛ درجه چهار، مساوی لکه‌هایی در حال پیشرفت بالاتر از پنجه و درجه پنج، نماینده

(CMC) carboxymethyl cellulose ۵٪ به آن اضافه شد) کشت شدند. نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز نگهداری گردید. سپس ۱۰ میلی لیتر از محلول ۱ درصد Congo Red به هر ظرف پتری اضافه شد و بعد از آن هر ظرف پتری با محلول یک مولار NaCl به مدت ۱۵ دقیقه لکه‌زدایی شد. هاله روشن اطراف پرگنه قارچ نشان دهنده فعالیت سلولازی است (Kasana et al., 2008).

تولید آنزیم کیتیناز

به منظور بررسی فعالیت کیتینازی، ابتدا کیتین کلوئیدی تهیه شد. برای تهیه کیتین کلوئیدی، چهار گرم پودر کیتین در ۱۰ میلی لیتر اسید هیپوکلریدریک ۱۰ نرمال ریخته شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس قرار داده شد. سپس ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ روی آن اضافه و به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد. محلول حاصل در ۵۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و رسوب حاصل دوبار با اتانول ۷۰ درصد شسته شد. سپس محیط کشت ضعیفی شامل ۴/۵ گرم کیتین کلوئیدی، ۳ گرم $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۳ گرم $(NH_4)_2SO_4$ ، ۲ گرم KH_2PO_4 ، ۱ گرم اسید سیتریک مونوهیدرات، ۱۵ گرم آگار، ۰/۱۵ گرم پودر رنگی بروموکرزول پارپل و ۲۰۰ میکرولیتر توین ۸۰ در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر تهیه و اسیدیته محیط روی ۴/۷ تنظیم شد. محلول تهیه شده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس سترون گردید. سپس مرکز پتری‌ها توسط یک قرص ۵ میلی متری از حاشیه کشت ۵ روزه قارچهای اندوفیت تلقیح و به مدت ۳ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در شرایط تاریکی نگهداری شدند. تشکیل هاله بنفش رنگ اطراف پرگنه قارچ اندوفیت به معنای تولید آنزیم کیتیناز در نظر گرفته شد (Agrawal & Kotasthane, 2012).

ارزیابی توانایی کنترل زیستی در شرایط گلخانه

تهیه مایه تلقیح قارچ بیمارگر و اندوفیت

جهت تهیه زادمایه دو قارچ اندوفیت و قارچ بیمارگر، مقدار ۲۰۰ گرم بذر گندم در داخل فلاسک ارلن ۵۰۰ میلی لیتری ریخته و به مدت ۱۲ ساعت در آب مقطر خیسانده شد.

گرفته شد. تیمارها شامل (۱) گلدان‌هایی که با هیچ یک از قارچ‌های اندوفیت و بیمارگر مایه‌زنی نشدند (شاهد)، (۲) گلدان‌هایی که فقط با جدایه قارچ بیمارگر تلقیح شدند (تیمار پاتوژن)، (۳ و ۴) تیمارهای که فقط با یکی از جدایه‌های قارچ اندوفیت تلقیح شدند، (۵ و ۶) گلدانهایی که با قارچ بیمارگر به‌علاوه هر یک از جدایه‌های قارچ‌های اندوفیت مایه‌زنی شدند (۷ و ۸) و گلدانهایی که با قارچ پاتوژن و قارچ‌کش‌های تبوکونازول و دیفنوکونازول مایه‌زنی شدند. سرانجام ۳۵ روز پس از مایه‌زنی، شدت بیماری پاخوره گندم بر اساس آلودگی ریشه‌ها با سیستم رتبه‌بندی از صفر تا پنج با روش (Weller & Cook 1983) مشابه آزمون اثبات بیماریزایی قارچ بیمارگر انجام شد. درصد کاهش بیماری (کارایی) برای هر جدایه قارچ اندوفیت از فرمول زیر بدست آمد:

$$\text{Biocontrol efficacy (\%)} = \frac{\text{Disease index of control} - \text{Disease index of treated}}{\text{Disease index of control}} \times 100$$

نتایج

بیماریزایی قارچ بیمارگر

یک ماه پس از تلقیح و کاشت بذر در گلدانهای آلوده به قارچ بیمارگر، علایم بیماری روی ریشه و طوقه گیاهان آلوده بررسی شد و شدت آلودگی بر اساس سیستم رتبه‌بندی از صفر تا پنج، ۴/۳ ثبت گردید. علایم بیماری به صورت کوتولگی بوته‌ها، زردی و رنگ پریدگی قسمت‌های هوایی گیاه، سیاه‌شدگی ریشه، طوقه و قسمت‌های پایین ساقه نمایان شد.

قارچ اندوفیت

دو جدایه Ag2k1 و O3IR3 بترتیب بر اساس خواص ریخت‌شناسی و مولکولی و توالی ناحیه ITS-rDNA به عنوان *Bipolaris sorokiniana* و *Bipolaris victorae* شناسایی شدند. توالی‌های مربوط به ناحیه ITS تعداد ۱۸ جدایه نماینده جنس *Bipolaris* به توالی‌های جدایه‌های

گیاهان شدیداً کوتاه یا مرده بود (Weller and Cook, 1983). سرانجام پس از پایان آزمایش، دوباره قارچ عامل بیماری از ریشه‌های آلوده جداسازی شد. این آزمون با سه تکرار (گلدان) برای هر تیمار انجام شد.

بررسی تاثیر قارچ‌های اندوفیت روی شدت بیماری پاخوره گندم در شرایط گلخانه

ابتدا گلدان‌ها با مخلوط خاک-ماسه-کود (۱:۱:۲) پر گردید. سپس مایه تلقیح قارچ بیمارگر به نسبت دو درصد وزنی به خاک گلدان‌ها اضافه شد و پس از ریختن یک لایه خاک روی آن مایه تلقیح قارچ‌های اندوفیت به نسبت چهار درصد وزنی به خاک هر گلدان اضافه شد و مجدداً روی آن خاک ریخته شد. بذور گندم پس از ضدعفونی با محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت یک دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل در گلدان‌ها کشت شدند. پنج بذر در هر گلدان کشت گردید و سه تکرار برای هر تیمار در نظر

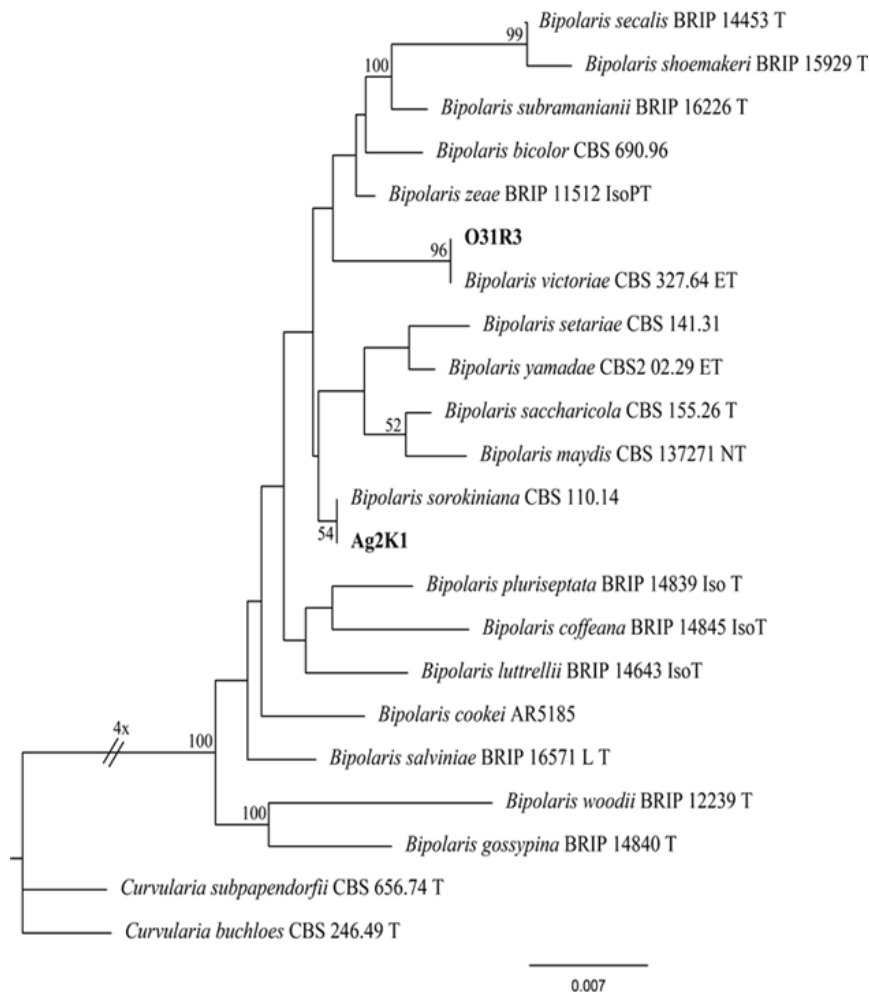
فاکتورهای رشدی مثل ارتفاع ساقه، وزن تر و خشک ریشه، وزن تر و خشک ساقه اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری وزن خشک ریشه و ساقه گیاه گندم، ریشه و ساقه گیاه را با آب معمولی شستشو داده و بعد از آن با کاغذ صافی سترون، آب آن گرفته شد. سپس نمونه‌ها را در داخل آون در دمای ۶۵ درجه سلسیوس به مدت ۷۲ ساعت خشک و توزین گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام گردید. داده‌های کمی مربوط به هر آزمون توسط نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح $P \leq 0.05$ انجام شد. (Little & Hills, 1978).

نرم افزار Blast در سایت NCBI و بر اساس خصوصیات ریخت شناسی حاصل، جدایه Ag2K1 با کد دسترسی MT102889 در کنار *Bipolaris sorokiniana* و جدایه O31R3 با کد دسترسی MT102717 در کنار *Bipolaris victoriae* قرار گرفت (شکل ۱).

O31R3 و Ag2K2 مطالعه شده در این تحقیق اضافه و هم ردیف شدند. بخش های ابتدائی و انتهائی که در بعضی توالی ها وجود نداشتند از آنالیزها حذف شدند. تعداد کل صفات استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی به علاوه گپ ها ۴۰۹ عدد بود. مقایسه توالی های بدست آمده از جدایه مورد بررسی و توالی های موجود در بانک ژن توسط



شکل ۱- درخت فیلوژنتیکی ترسیم شده بر اساس توالی نواحی ITS-rDNA متعلق به سویه Ag2k1 *Bipolaris sorokiniana* و *Bipolaris victoriae* O31R3 و ۱۸ سویه دیگر جنس *Bipolaris* است. ترسیم درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم افزار PAUP (v. 4.0b10) به روش Neighbor-joining انجام گرفت. اعداد بالای هر شاخه مقادیر اعتبارسنجی مربوط به آنالیز NJ را نشان می دهد. دو گونه *Curvularia buchloes* و *Curvularia subpappendorfii* به عنوان outgroup نشان داده شده است.

Fig. 1. Phylogenetic tree of *Bipolaris sorokiniana* Ag2k1 and *Bipolaris victoriae* O31R3 based on ITS-rDNA sequences. The phylogenetic tree was conducted using PAUP version 4.0 b10 based on Neighbor-joining method. The bootstrap values are shown on the nodes. *Curvularia subpappendorfii* and *Curvularia buchloes* are shown as outgroup.

ریخت‌شناسی قارچ‌های اندوفیت

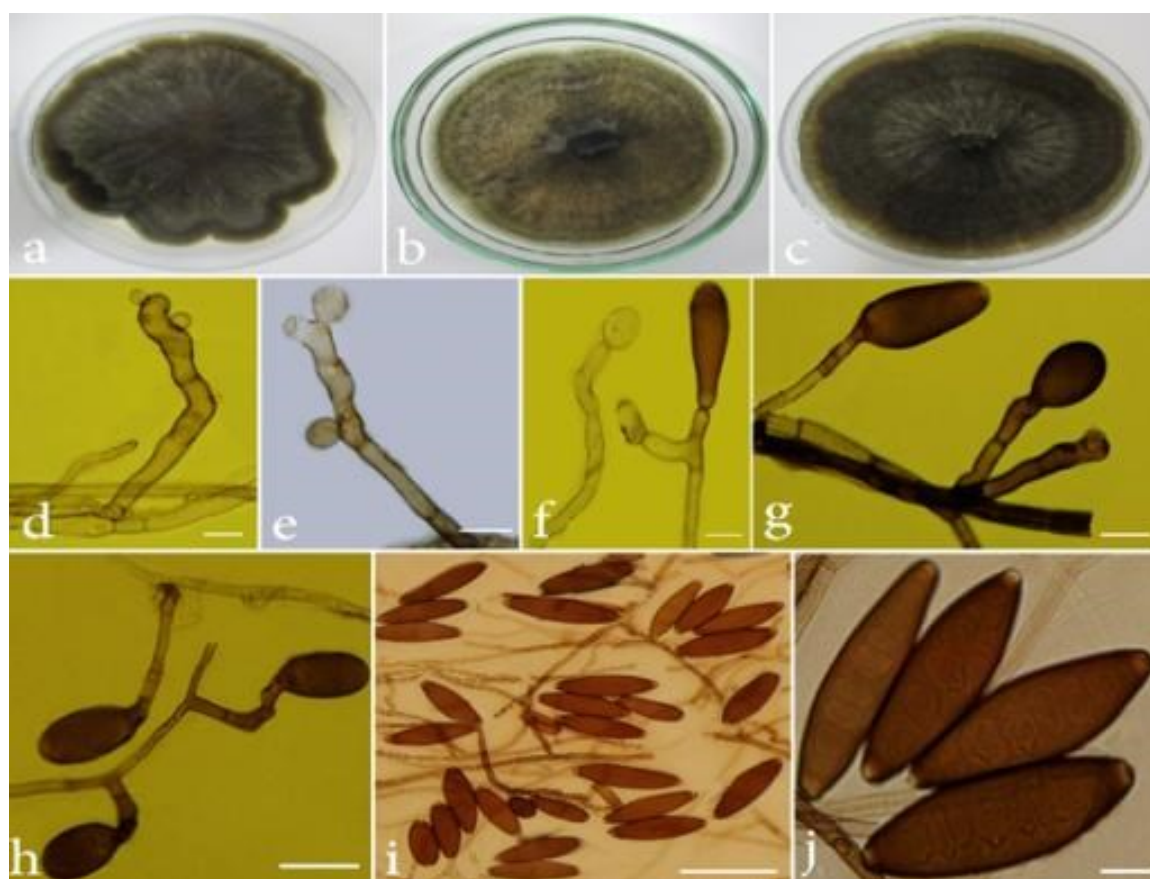
گونه *Bipolaris sorokiniana*

ویژگی‌های پرگنه

میزان رشد پرگنه روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از گذشت ۷ روز حدود ۷/۵ سانتی‌متر بود و بافت پرگنه مخملی و به رنگ سبز تیره و با حاشیه ناهموار و پشت آن نیز به صورت سبز رنگ مشاهده گردید. قطر پرگنه روی محیط PCA حدود ۶ سانتی‌متر بود. رنگ کلنی قارچ به رنگ سبز روشن دارای نقاط سیاه رنگ و پشت آن نیز به رنگ سبز بود. روی محیط MEA رنگ پرگنه سبز تیره و پشت پرگنه هم سبز با حاشیه ناهموار بود و قطر پرگنه پس از ۷ روز به ۸ سانتی‌متر رسید (شکل ۲).

ویژگی‌های میکروسکوپی

میسلیوم‌ها دارای دیواره صاف و به رنگ قهوه‌ای روشن بودند. کنیدیفورها منفرد و یا در دسته‌های کوچک و زانویی و به رنگ قهوه‌ای کم رنگ تا تیره تشکیل شده و راست تا خمیده بودند. ابعاد کنیدیفورها ۶-۴×۸۷-۵۰ میکرومتر می‌باشند. کنیدی‌ها اغلب راست تا حدی دوکی شکل یا بیضوی عریض به رنگ قهوه‌ای با سطح صاف و دارای ۳-۹ جدار عرضی کاذب و با ابعاد ۲۰-۱۳×۷۵-۵۰ میکرومتر می‌باشند (شکل ۲).



شکل ۲- ویژگی‌های ریختی گونه *B. sorokiniana*. a، b، و c شکل پرگنه روی محیط کشت‌های PDA، PCA، و MEA؛ d، e، f، g، h، و i کنیدی. مقیاس‌ها برای d، e، f، g، h، و j ۱۰ میکرومتر و برای i ۵۰ میکرومتر است.

Fig. 2. Morphology of *B. sorokiniana*. a, b and c, Colony form on PDA, PCA and MEA; d, e, f, g and h, conidiophore; i and j conidia. Bar = 10 μ m (d, e, f, g, h and j) and Bar = 50 μ m for i.

گونه *Bipolaris victoriae*

ویژگی های پرگنه

پرگنه روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از گذشت هفت روز ۹ سانتی متر و به رنگ سبز تیره تا خاکستری و دارای میسلیم های هوایی فراوان است. روی محیط PCA پرگنه سبز کم رنگ و به قطر ۷ سانتی متر و پشت آن سبز کم رنگ است (شکل ۳).

ویژگی های میکروسکوپی

کنیدیوفور منفرد و به ندرت در دسته های کوچک، راست تا مارپیچی، گاهی در بالا زانودار، قهوه ای روشن تا تیره، صاف، دیواره دار و به ابعاد $4-5 \times 12.5-15$ میکرومتر هستند. کنیدیوم ها به طور جزئی خمیده، دوکی یا استوانه ای و در قسمت میانی عریض تر، قهوه ای روشن، صاف، دارای ۳-۶ دیواره عرضی به ابعاد $9-14 \times 30-15$ میکرومتر هستند (شکل ۳).



شکل ۳- ویژگی های ریختی گونه *B. victoriae* (a و b) پرگنه قارچ روی محیط کشت های PDA و PCA، (c و d) کنیدیوفور، (e) کنیدی. مقیاس ها ۱۰ میکرومتر.

Fig. 3. Morphology of *B. victoriae*. a and b, Colony form on PDA and PCA; c and d, conidiophore; e, conidia. Bar = 10 μ m.

ارزیابی کنترل زیستی در شرایط آزمایشگاه

ارزیابی توانایی جدایه های قارچ اندوفیت در آزمون کشت متقابل نشان داد که هر دو جدایه قادر به جلوگیری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر بوده و تفاوت رشد میسلیمومی *Ggt* در آنها با تیمار شاهد معنی دار بود. درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر در جدایه Ag2K1، ۳۳/۸۵٪ و در جدایه O31R3، ۶۵/۴۱٪ بود. بررسی توانایی جدایه های اندوفیت در تولید ترکیبات خارج سلولی ضدقارچی نشان

داد که این ترکیبات باعث کاهش معنی دار رشد پرگنه قارچ بیمارگر شدند. درصد بازدارندگی در جدایه Ag2K1، ۱۱/۴۸٪ و در جدایه O31R3، ۷/۶۳٪ بود. نتایج آزمون ارزیابی توانایی تولید ترکیبات فرار نشان داد که هر دو جدایه قارچ قادر به کاهش رشد پرگنه قارچ بیمارگر در مقایسه با شاهد نشدند و تفاوت آنها هم معنی دار نبود. درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر برای جدایه

سلولاز، سیدروفور، سیانید هیدروژن و توانایی حلالیت فسفات را نداشتند (جدول ۲).

ارزیابی کنترل زیستی در شرایط گلخانه

نتایج تاثیر دو جدایه قارچ اندوفیت روی بیماری پاخوره گندم نشان داد که هر دو جدایه شدت بیماری پاخوره گندم را به صورت معنی‌داری کاهش دادند. میزان بازدارندگی دو جدایه Ag2K1 و O31R3 به ترتیب ۵۱/۳۲ و ۵۳/۵۵ درصد بود که از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند و در یک گروه قرار گرفتند. همچنین دو قارچکش تبوکونازول و دیفنوکونازول شدت بیماری پاخوره گندم را به میزان ۱۰۰ درصد کاهش دادند. علاوه بر این دو قارچ اندوفیت نیز هیچ گونه علائم بیماری روی گندم ایجاد نکردند (جدول ۳).

جدول ۱ - تاثیر بازدارندگی جدایه‌های قارچ اندوفیت روی رشد پرگنه‌ی قارچ *Ggt* در شرایط آزمایشگاه بعد از هفت روز.

Table 1. Inhibitory effect of endophytic fungi on mycelia growth of *Ggt* under *in vitro* tests after 7 days

Treatments	Dual culture		Volatile metabolites		Non-volatile metabolites	
	Colony radius (mm)	Biocontrol efficacy (%)	Colony radius (mm)	Biocontrol efficacy (%)	Colony radius (mm)	Biocontrol efficacy (%)
Control pathogen	8.87 ± 0.13 a	—	9.00 ± 0.14 a	—	9.00 ± 0.00 a	—
Ag2K1	5.87 ± 0.18 b	33.85	8.48 ± 0.26 a	5.74	8.31 ± 0.11 b	7.63
O31R3	3.07 ± 0.13 c	65.41	8.76 ± 0.12 a	2.67	7.97 ± 0.26 b	11.48

حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند. اعداد داخل هر ستون میانگین سه تکرار است ($\pm$ خطای معیار).

Mean followed by different letters within the column represents significant differences according to the Duncan multiple range test ($P \leq 0.05$). Data are mean of three replicates with $\pm$ standard Error ($\pm$ SE).

جدول ۲ - توانایی جدایه‌های قارچی اندوفیت در تولید ترکیبات ضدقارچی و ترکیبات محرک رشد گیاه در شرایط آزمایشگاه

Table 2. Ability of fungal endophytes to produce antifungal metabolites and plant growth promoting properties *in vitro*.

Functional test	Ag2K1	O31R3
Secondary metabolites and enzymes		
Protease	—	—
Chitinase	—	++
Pectinase	++++	+
Cellulase	—	—
Siderophore	—	—
HCN	—	—
Plant growth promoting characters		
Indole-3-acetic acid (IAA) ($\mu\text{g/mL}$)	2.27	1.23
Gibberellin ($\mu\text{g/mL}$)	32.66	3.94
Phosphate solubilization	—	—

+, ++ و +++ به ترتیب نشان‌دهنده فعالیت کم، زیاد و خیلی زیاد است

+, ++ and +++: isolates showing low, high and very high activity, respectively.

جدول ۳- تاثیر قارچ‌های اندوفیت روی شدت بیماری پاخوره گندم در شرایط گلخانه، ۳۵ روز بعد از تلقیح

Table 3. Effect of selected fungal endophytes on disease severity of wheat take-all disease in greenhouse condition, 35 days after inoculation

Treatments	Disease severity	Biocontrol efficacy (%)
Control pathogen (<i>Ggt</i>)	4.93 ± 0.04 a	—
Control water	0.00 ± 0.00 c	—
<i>B. sorokiniana</i> Ag2K1	0.00 ± 0.00 c	—
<i>B. victoriae</i> O31R3	0.00 ± 0.00 c	—
<i>B. sorokiniana</i> Ag2K1 + <i>Ggt</i>	2.40 ± 0.11 b	51.32
<i>B. victoriae</i> O31R3 + <i>Ggt</i>	2.29 ± 0.05 b	53.55
Teboconazole + <i>Ggt</i>	0.00 ± 0.00 c	100
Difenoconazol + <i>Ggt</i>	0.00 ± 0.00 c	100

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح پنج درصد بر اساس آزمون دانکن می‌باشند. اعداد داخل هر ستون میانگین سه تکرار است (± خطای معیار).

Mean followed by different letters within the column represents significant differences according to the Duncan multiple range test ($P \leq 0.05$). Data are mean of three replicates with ± standard Error (± SE).

شدند. همچنین جدایه قارچ اندوفیت *B. sorokiniana* Ag2K1 به تنهایی و بدون حضور قارچ بیمارگر سبب افزایش شاخص‌های رشدی گیاه گندم در مقایسه با شاهد سالم شدند. بعلاوه شاخص‌های رشدی گیاه گندم در هر دو تیمار قارچ‌کش در مقایسه با شاهد سالم اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند (جدول ۴).

تاثیر جدایه های قارچ اندوفیت روی فاکتورهای رشدی گیاه گندم

نتایج تاثیر دو جدایه قارچ اندوفیت روی فاکتورهای رشدی گیاه گندم نشان داد که هر دو جدایه قادر به بهبود و افزایش فاکتورهای رشدی گیاه گندم بودند. هر دو جدایه سبب افزایش ارتفاع ساقه، وزن تر ساقه، وزن تر ریشه، وزن خشک ساقه و وزن خشک ریشه در حضور قارچ بیمارگر

جدول ۴- تاثیر اندوفیت‌های قارچی به تنهایی و همراه قارچ بیمارگر روی شاخص‌های رشد گیاه گندم بعد از ۳۵ روز

Table 4. Effect of selected fungal endophytes alone, and in the presence of *Ggt* on growth parameters of wheat, after 35 days.

Treatments	PH (cm)	SFW (g)	RFW (g)	SDW (g)	RDW (g)
Control Water	38.58 ^{bc} ± 0.06	0.49 ^{ab} ± 0.01	0.058 ^b ± 0.002	0.073 ^b ± 0.0016	0.035 ^b ± 0.001
Infected control	17.41 ^e ± 0.97	0.02 ^d ± 0.003	0.003 ^c ± 0.001	0.014 ^d ± 0.0019	0.002 ^d ± 0.002
<i>B. sorokiniana</i> Ag2K1	40.82 ^a ± 0.57	0.65 ^a ± 0.025	0.084 ^a ± 0.003	0.860 ^a ± 0.0025	0.063 ^a ± 0.0002
<i>B. victoriae</i> O31R3	38.32 ^{bc} ± 0.9	0.49 ^{ab} ± 0.023	0.058 ^b ± 0.005	0.075 ^b ± 0.0016	0.035 ^b ± 0.002
<i>B. sorokiniana</i> Ag2K1 + <i>Ggt</i>	28.75 ^d ± 1.02	0.25 ^c ± 0.11	0.034 ^d ± 0.002	0.051 ^c ± 0.003	0.02 ^b ± 0.002
<i>B. victoriae</i> O31R3 + <i>Ggt</i>	29.52 ^d ± 1.15	0.50 ^{ab} ± 0.017	0.042 ^c ± 0.001	0.053 ^c ± 0.0026	0.026 ^c ± 0.001
Teboconazole+ <i>Ggt</i>	37.72 ^c ± 1.06	0.49 ^{ab} ± 0.014	0.052 ^b ± 0.001	0.490 ^{ab} ± 0.014	0.034 ^b ± 0.001
Difenoconazole+ <i>Ggt</i>	39.05 ^{bc} ± 0.66	0.50 ^{ab} ± 0.017	0.053 ^b ± 0.001	0.500 ^{ab} ± 0.017	0.036 ^b ± 0.002

اعداد متن جدول، میانگین (± خطای استاندارد) سه تکرار هستند که به وسیله آزمون دانکن در سطح ۵٪ مقایسه شده‌اند. حروف مختلف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است. PH، ارتفاع ساقه؛ SFW، وزن تر ساقه؛ RFW، وزن تر ریشه؛ SDW، وزن خشک ساقه؛ RDW، وزن خشک ریشه

Mean followed by different letters within the column represents significant differences according to the Duncan multiple range test ($P \leq 0.05$). Data are mean of three replicates with ± standard Error (± SE). PH, plant height; SFW, shoot fresh weight; RFW, root fresh weight, SDW, shoot dry weight and RDW, root dry weight.

بیوکترول است (sundaramoorthy et al., 2012). قارچ عامل بیماری پاخوره گندم *Ggt* از کلکسیون قارچ‌های آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشکده کشاورزی دانشگاه

بیماری پاخوره گندم یکی از بیماری‌های مهم خاک‌زاد گندم در استان کردستان است. یکی از روش‌های موثر و ایمن بر علیه عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد گیاهان، استفاده از عوامل

و *Waitea circinate* را به صورت قابل توجهی کاهش دادند (Abaya et al., 2021).

هر دو سویه قارچ اندوفیت نه تنها شدت بیماری پاخوره گندم را در شرایط گلخانه کاهش دادند، بلکه فاکتورهای رشدی گیاه گندم را نیز در مقایسه با کنترل پاتوژن افزایش دادند. علاوه بر این، هر دو سویه قادر به تولید هورمون اکسین (۲/۲۷-۱/۲۳ میکروگرم در میلی‌لیتر) و جیبرلین (۳۲/۶۶-۳/۹۴ میکروگرم در میلی‌لیتر) بودند. تولید این هورمون‌ها نه تنها سبب رشد گیاه گندم می‌شوند، بلکه تحمل گیاه را در مقابل تنش‌های عوامل زنده و غیرزنده نیز افزایش داده و مقاومت گیاه را در مقابل بیمارگرها افزایش می‌دهند (Yasmin et al., 2017). هورمون اکسین با افزایش تعداد سلول‌های ریشه سبب رشد طولی و توسعه آن شده و از این طریق مقاومت گیاه را در مقابل عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد گیاهان افزایش می‌دهد (Yu et al., 2009; González-Lamothe et al., 2012). همچنین هورمون جیبرلین نیز باعث افزایش سطح و تعداد ریشه گیاه می‌گردد و موجب افزایش بهبود رشد گیاه و افزایش تحمل آن در مقابل بیمارگرها می‌شود (Bhattacharyya & Jha, 2012). سویه‌های اندوفیت قارچی *Sarocladium strictum* A. C113L، *Anthracoystis floculosa* P1P1 و *Penicillium olsonii* ML37 و *floculosa* F63P از قسمت‌های هوایی گندم سالم جمع آوری و شناسایی گردید. این سویه‌ها شدت بیماری سوختگی خوشه گندم ناشی از قارچ *F. graminearum* در شرایط گلخانه به صورت قابل توجهی کاهش دادند (Roja et al., 2020). تحقیقات نشان داده که قارچ اندوفیت *Sarocladium zeae* قادر است در بافت‌های داخلی گیاه گندم مستقر شود و با تولید متابولیت‌های ثانویه قادر است از گیاه گندم در مقابل بیماری سوختگی خوشه گندم محافظت نماید (Kemp et al., 2020). دو سویه قارچ اندوفیت *Coprinopsis urticicola* M2 و *Rhizoctonia zeae* M32 از قسمت‌های طوقه و ریشه گیاهان سالم غلات جداسازی گردید. این دو سویه شدت بیماری پاخوره گندم را در شرایط گلخانه به

کردستان انتخاب شد که قبلاً از مزارع گندم شهرستان کامیاران جداسازی گردید (Gholami et al., 2019). در این تحقیق دو سویه قارچ اندوفیت *B. sorokiniana* Ag2K1 و *B. victoriae* O31R3 از گیاهان خانواده غلات در مرحله گلدهی جداسازی شدند. هر دو سویه قارچ اندوفیت در شرایط آزمایشگاه به روش کشت متقابل رشد پرگنه قارچ بیمارگر را به صورت قابل توجهی کاهش دادند و تفاوت آنها با تیمار کنترل پاتوژن معنی دار بود. اما تاثیر ترکیبات فرار دو سویه روی رشد پرگنه قارچ *Ggt* در مقایسه با شاهد معنی دار نبود و تاثیر ترکیبات غیر فرار نیز روی رشد پرگنه قارچ بیمارگر قابل توجه نبود. هر دو سویه قارچ اندوفیت تولید آنزیم پکتیناز کردند. سویه *B. victoriae* O31R3 بر خلاف سویه *B. sorokiniana* Ag2K1 تولید آنزیم کیتیناز کرد. این نتایج نشان می‌دهد که این آنزیم‌ها توانایی عوامل کنترل زیستی را در برابر قارچ‌های بیمارگر افزایش می‌دهند. ترشح آنزیم‌های پکتیناز و کیتیناز توسط عوامل کنترل زیستی سبب تجزیه دیواره سلولی قارچ‌های بیمارگر می‌شوند (Ben Abdallah et al., 2016). تولید آنزیم پکتیناز توسط عوامل بیوکنترل در کلونیزاسیون بافت‌های گیاهی نقش داشته و با تجزیه الیگوساکاریدها و قطعات پکتیکی فعال دیواره سلولی گیاه باعث تحریک سیستم دفاعی در گیاه شده و سبب مقاومت آن در مقابل بیمارگرها می‌گردد (Davis et al., 1984). همچنین تحقیقات نشان داده که قارچ *Penicillium oxalicum* با تولید آنزیم پکتیناز موجب مقاومت موضعی گیاه خیار در برابر *Cladosporium cucumerinum* می‌گردد (Peng et al., 2004). دو سویه قارچ اندوفیت *Bipolaris* sp. LF7 و *Trichoderma asperellum* F11 رشد پرگنه قارچ *Ganoderma boninense* را در شرایط آزمایشگاه به صورت قابل توجهی کاهش دادند (Sim et al., 2019). همچنین قارچ‌های اندوفیت *Simplicillium lamellicola* و *Cladorrhinum flexuosum* از گیاه گندم جداسازی گردید و رشد پرگنه قارچ‌های *Fusarium graminearum*

(Takenaka et al., 2003). علاوه بر این، قارچ غیر بیماریزای *P. oligandrum* سبب کاهش رشد باکتری *Ralstonia solanacearum* عامل پژمردگی باکتریایی گوجه فرنگی شده و تلقیح آن به ریشه گوجه فرنگی سبب تحریک مقاومت گیاه گوجه فرنگی در مقابل این بیماری می شود (Hase et al., 2008).

نتایج حاصل از تاثیر دو سویه قارچ اندوفیت روی بیماری پاخوره گندم نشان داد که حضور این قارچ ها در اطراف ریشه گندم، سبب حفاظت گیاه میزبان در برابر حمله قارچ *Ggt* می شوند. این پدیده می تواند به سبب کلونیزاسیون ریشه گیاه گندم و اشغال نیچ اکولوژیکی توسط عامل بیو کنترل، ایجاد رقابت بر سر مواد غذایی و همچنین ممکن است در اثر تحریک مقاومت سیستمیک گیاه میزبان در مقابل عامل بیماریزا باشد (Latz et al., 2018). بحرحال، استفاده از روشهای طبیعی و استفاده از میکروارگانیزم های آنتاگونیست و عوامل کنترل زیستی که با شرایط طبیعی و اکولوژیکی خاک سازگارند به عنوان یک روش جایگزین یک ضرورت است (Huang et al., 2012). بر اساس بررسی های انجام شده، این اولین گزارش از تاثیر این دو سویه قارچ *Bipolaris* غیربیماریزا روی بیماری پاخوره گندم در دنیا است.

نتیجه گیری

قارچهای اندوفیت به عنوان عوامل بیو کنترل ظرفیت بسیار زیادی در مدیریت بیماریهای گیاهان دارند. نتایج این تحقیق در شرایط آزمایشگاه و گلخانه نشان داد که دو سویه قارچ اندوفیت *B. sorokiniana* Ag2K1 و *B. victoriae* O31R3 توانایی کنترل بیماری پاخوره گندم را به عنوان عوامل بیو کنترل دارند و می توانند در مدیریت بیماری پاخوره گندم و بهبود و افزایش عملکرد محصول مورد استفاده قرار گیرند. با توجه به اهمیت کشت گندم در استان کردستان و محدودیت مصرف قارچکش ها به دلیل آلودگی های زیست محیطی ناشی از مصرف آفت کش های شیمیایی، بکارگیری روش های جایگزین مانند کنترل زیستی و بکارگیری عوامل بیو کنترل بر علیه بیماری پاخوره گندم

میزان ۸/۸۹ و ۵۴/۶۷ درصد بترتیب در مقایسه با کنترل پاتوژن کاهش دادند و هر دوسویه با تولید هورمون اکسین و جیبرلین فاکتورهای رشدی گیاه گندم را به صورت قابل توجهی افزایش دادند (Gholami et al., 2019).

قارچ *B. sorokiniana* به عنوان عامل سوختگی گیاهچه و پوسیدگی ریشه و طوقه معمولی گندم (Liu et al., 2023) و *B. victoriae* به عنوان عامل بیماری لکه قهوه ای برنج (Safari & Mohammadia, 2016) گزارش شده است. اما تلقیح این دو جدایه Ag2k1 و O3R31 روی ریشه گندم هیچ گونه علایم بیماری روی سیستم ریشه و قسمت های هوایی گندم ایجاد نکرد. قارچ های غیر بیماریزای زیادی از جمله *Penicillium* spp.، *Fusarium oxysporum*، *Pythium* spp. و *Phoma* spp. به صورت اندوفیت از گیاهان جداسازی و شناسایی شده اند. تحقیقات نشان داده که این قارچ ها بافت های داخلی گیاهان را کلنیزه کرده و با مکانیسم های مختلف از گیاهان در مقابل عوامل بیماریزا حفاظت کرده و سبب بهبود رشد گیاه و افزایش پارامترهای رشدی آنها می شوند (Rai et al., 2022; Olson & Benson, 2007; Segarra et al., 2007; Shores et al., 2005; Waller et al., 2008). تحقیقات نشان داده که

قارچ های اندوفیت غیربیماریزا تغییرات و نوسانات محیطی اطراف خود را بخوبی تحمل و به راحتی با اجتماع میکروبی مجاور خود از نظر اکولوژیکی رقابت کرده و در نتیجه جمعیت خود را در بستر رقابت افزایش و سازگاری و تعامل خود را با گیاه میزبان افزایش می دهند (Trillas & Segarra, 2009). قارچ غیربیماریزای *F. oxysporum* Avr5 از طریق تحریک مقاومت گیاه گوجه فرنگی سبب کاهش بیماری پژمردگی گوجه فرنگی ناشی از قارچ *F. oxysporum* f. *lycopersici* sp. شد (Amini & Dzhililov, 2010). همچنین قارچ غیر بیماریزای *Pythium oligandrum* به عنوان عامل کنترل بیولوژیک، ریشه گیاهان را کلنه کرده و گیاهان را در مقابل عوامل بیماریزای خاکزاد از طریق مکانیسم های مختلفی مثل رقابت بر سر مواد غذایی، میکوبارازیتسم، آنتی بیوز و تولید مواد تحریک کننده مقاومت گیاه، حفاظت می کند (Picard et al., 2000).

سپاسگزاری

نگارندگان از دانشگاه کردستان بخاطر حمایت مالی این پروژه با کد ۹۶/۱۹/۳۲۶۶۸ قدردانی می‌نمایند.

ضروری می‌باشد. همچنین ارزیابی تاثیر این عوامل کنترل‌زیستی در شرایط مزرعه و تعیین مکانیسم کنترلی از جمله تحریک مقاومت گیاه گندم در مقابل بیماری پاخوره گندم توسط این دو سویه قارچ بیوکنترل پیشنهاد می‌گردد.

References

- Abaya, A., Xue, A. & Hsiang, T. 2021. Selection and screening of fungal endophytes against wheat pathogens. *Biological control*, 154: 104511. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104511>
- Agrawal, T. & Kotasthane, A.S. 2012. Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springerplus*, 1: 73.
- Ajjiah, N., Fiodor, A.F., Kazimierzczuk, K., Urbaniak, M., Enow, E. & Stasiuk, R. 2024. *Pseudomonas protegens* ML15 and *Trichoderma koningiopsis* Tr21 co-culture: A potent strategy for suppressing *Fusarium cerealis* infections in wheat through augmented antifungal metabolite production. *Biological control*, 198: 105621.
- Alstrom, S. & Burns, R.G. 1989. Cyanide production by rhizobacteria as a possible mechanism of plant growth inhibition. *Biology and Fertility of Soils*, 7: 232–238.
- Amini, J. & Dzhililov, F.S. 2010. Induction of systemic resistance in tomato plants to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of *Fusarium* wilt of tomato by non-pathogenic *F. oxysporum* under greenhouse conditions. *Applied Entomology and Phytopathology*, 78: 15–32.
- Arora, N.K. & Verma, M. 2017. Modified microplate method for rapid and efficient estimation of siderophore produced by bacteria. *3 Biotech*, 7: 1–9.
- Asher, M.J. C. & Shipton, P.J. 1981. *Biology and Control of Take-all*. Academic Press. London, UK.
- Chebotar, V.K., Malfanora, N.V., Scherbakov, A.V., Ahtemova, G.A. & Borisov, A.Y. 2015. Endophytic bacteria in microbial preparations that improve plant development. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51: 271–277.
- Backman, P.A., Wilson, M. & Murphy, J.F., 1997. Bacteria for biological control of plant diseases. In: Recheigl, N.A., Recheigl, J.E. (Eds.), *Environmentally safe approaches to crop disease control*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp. 95–109.
- Ben Abdallah, R.A., Mejdoub-Trabelsi, B., Nefzi, A., Jabnoun-Khiareddin, H. & Daami-Remadi, M. 2016. Isolation of endophytic bacteria from *Withania somnifera* and assessment of their ability to suppress *Fusarium* wilt disease in tomato and to promote plant growth. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 7: 1–11.
- Bhattacharyya, P.N. & Jha, D.K. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 4: 1327–1350.
- Chantawannakul, P., Oncharoen, A., Klanbut, K., Chukeatirote, E. & Lumyong, S. 2002. Characterization of protease of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from traditionally fermented soybean in northern Thailand. *Science Asia*, 28: 241–245.
- Collinge, D.B., Jørgensen, H.J., Latz, M.A., Manzotti, A., Ntana, F., Rojas Tayo, E.C. & Jensen, B. 2019. Searching for novel fungal biological control agents for plant disease control among endophytes. pp. 25–51. In: Hodkinson, T.R., Doohan, F.M., Saunders, M.J. & Murphy, B.R. (eds.). *Endophytes for a Growing World*. Cambridge University Press, 444 P.
- Coombs, J.T., Michelsen, P.P. & Franco, C.M.M. 2004. Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological control*, 29: 359–366.
- Davis, K.R., Lyon, G.D., Darvill, A.G. & 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: 52–60.
- Delaney, S.M., Mavrodi, D.V., Bonsall, R.F. & Thomashow, L.S. 2001. phzO, a gene for biosynthesis of 2-hydroxylated phenazine compounds in *Pseudomonas aureofaciens* 30–84. *Journal of Bacteriology*, 183:318–327.
- Dennis, C. & Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*, production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 25–39.
- Dias, A.C.F., Costa, F.E.C., Andreote, F.D., Lacava, P.T., Teixeira, M.A., Assumpcao, L.C., Araujo, W.L., Azevedo, J.L. & Melo, I.S. 2009. Isolation of micropropagated strawberry endophytic bacteria and assessment of their potential for plant growth promotion. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25: 189–195.

- Ghahfarokhy, M.R., Goltapeh, E.M., Purjam, E., Pakdaman, B.S., Modarres Sanavy, S.A.M. & Varma, A. 2011. Potential of mycorrhiza-like fungi and *Trichoderma* species in biocontrol of Take-all disease of wheat under greenhouse conditions. *Journal of Agriculture and Technology*, 7: 185–195.
- Gholami, M., Amini, J., Abdollahzadeh, & Ashengroph, M. 2019. Basidiomycetes fungi as biocontrol agents against take-all disease of wheat. *Biological control*, 130: 34–43.
- González-Lamothe, R., El Oirdi, M., Brisson, N. & Bouarab, K. 2012. The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *Plant Cell*, 24: 762–777.
- Gour, A.C. 1990. Physiological functions of phosphate solubilizing micro-organisms. In: Gour, A. C. (ed.) *Phosphate solubilizing micro-organisms as biofertilizers*. Omega scientific publishers. New Delhi, 16–72.
- Hase, S., Takahashi, S., Takenaka, S., Nakaho, K., Arie, T., Seo, S., Ohashi, Y. & Takahashi, H. 2008. Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathology*, 57: 870–876.
- Holbrook, A.A., Edge, W.J.W. & Bailey, F. 1961. Spectrophotometric method for determination of Gibberellic acid. *Advances in Chemistry*, 28: 159–167.
- Huang, X., Zhang, N., Yong, X., Yang, X.Y. & Shen, Q.R. 2012. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off disease in cucumber with *Bacillus pumilus* SQR-N43. *Microbiology Research*, 167: 135–143. doi: 10.1016/j.micres.2011.06.002
- Jolanata, J.S., Ewa, K., Krystyna, W., Anata, B. & Aleksander, L. 2008. Colonization of root tissues and protection against Fusarium wilt of rye (*Secale cereale*) by non-pathogenic rhizosphere strains of *Fusarium culmorum*. *Biological Control*, 45: 297–307.
- Kasana, R. C., Salwan, R., Dhar, H., Dutt, S. & Gulati, A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using gram's iodine. *Current Microbiology*, 57: 503–507.
- Kemp, N.D., Vaughan, M.M., McCormick, S.P. & Brown, J.A. 2020. *Sarocladium zeae* is a systemic endophyte of wheat and an effective biocontrol agent against Fusarium head blight. *Biological control*, 149: 104329. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104329>
- Kraus J. & Loper, J.E. 1990. Biocontrol of *Pythium damping off* by *Pseudomonas fluorescens* pf-5: Mechanistic studies. In Keel C., Kadler, B. & Defago G. *Plant growth promoting rhizobacter*. The second workshop on plant growth promoting rizobacteria. Inter Laken, Switzerland, 172–175.
- Kwak, Y.S., Bakker, P.A.H.M., Glandorf, D.C.M., Rice, J.T., Paulitz, T.C. & Weller, D.M. 2009. Diversity, virulence, and 2,4-diacetylphloroglucinol sensitivity of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* isolates from Washington state. *Phytopathology*, 99: 472–9.
- Larran, S., Perello, A., Simon, M.R. & Moreno, V. 2007. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 565–572.
- Little, T.M., & Hills, F.J. 1978. *Agricultural Experimentation Design and Analysis*. John Wiley and Sons, New York, 350 pp.
- Liu, B., Qiao, H., Huang, L., Buchenauer, H., Han, Q., Kang, Z. & Gong, Y. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control*, 49: 277–285.
- Liu, B. Y. & Zhou, J. 2013. Effect study on isolation and screening of antagonistic actinomycetes in soil. *Mod. Agri. Technol*, 17: 225–228.
- Liu, H., Park, S. & Sang, H. 2023. Identification and Fungicide control of *Bipolaris sorokiniana* causing leaf spot and blight on common hop (*Humulus lupulus*) in korea. *Plant Disease*, 107: 2939–2943.
- Liu, Z., Xia, J., Zhang, X., Dou, S., Gae, T., Wang, D. & Zhang, D. 2022. Influence of *Bacillus subtilis* strain Z-14 on microbial communities of wheat rhizospheric soil infested with *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Frontiers in microbiology*, 13: 923242. Doi:10.3389/fmicb.2022.923242
- Louden, B.C., Haarmann, D. & Lynne, A.M. 2011. Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology and Biology Education*, 12: 51–53.
- Manamgoda, D.S., Rossman, A.Y., Castlebury, L.A., Crous, P.W., Madrid, H., Chukeatirote, E. & Hyde, D.K. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*, 19: 221–288.
- Olson, H.A. & Benson, D.M. 2007. Induced systemic resistance and the role of binucleate *Rhizoctonia* and *Trichoderma hamatum* 382 in biocontrol of Botrytis blight in geranium. *Biological Control*, 42: 233–241.
- Palma-Guerrero, J., Chancellor, T., Spong, J., Canning, G., Hammond, J. & McMillan, V.E. 2021. Take-all disease: New insights into an important wheat root pathogen. *Trends in Plant Science*. 26: 836–848. doi: 10.1016/j.tplants.2021.02.009
- Pal, K.K. & Gardener, B.M. 2006. Biological control of plant pathogens. *Plant Health Instructor*, 2: 1117–1142.
- Patten, C.L. & Glick, B.R. 2002. Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 3795–3801.
- Peng, X., Zhang, H., Bai, Z. & Li, B. 2004. Induced resistance to *Cladosporium cucumerinum* in cucumber by pectinases extracted from *Penicillium oxalicum*. *Phytoparasitica*, 32: 377–87.

- Picard, K., Ponchet, M., Blein, J.-P., Rey, P., Tirilly, Y. & Benhamou, N. 2000. Oligandrin. A proteinaceous molecule produced by the mycoparasite *Pythium oligandrum* induces resistance to *Phytophthora parasitica* infection in tomato plants. *Plant Physiology*, 124: 379–395.
- Raeder, U. & Broda, P. 1985. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1: 17–20.
- Rai, M., Zimowska, B. & Kövics, G.J. 2022. *Phoma: Diversity, Taxonomy, Bioactivities and nanotechnology*. Springer.
- Roja, E.C., Jensen, B., Jørgensen, H.J.L., Latz, M.A.C., Esteban, P., Ding, Y. & Collinge, D.B. 2020. Selection of fungal endophytes with biocontrol potential against Fusarium head blight in wheat. *Biological control*, 144: 104222. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104222>
- Ryan, R.P., Germaine, K., Franks, A., Ryan, D.J. & Dowling, D.N. 2008. Bacterial endophytes: recent developments and applications. *Federation of European Microbiological Societies*, 278: 1–9.
- Safari M.R. & Mohammadian, S. 2016. Biological control of rice brown spot disease caused by *Bipolaris victorise* by some fungal isolates in the greenhouse and in vitro conditions. *Biocontrol in Plant Protection*, 3: 11–25.
- Schalchli, H., Pardo, F., Hormazába, E., Palma, R., Guerrero, J. & Bensch, E. 2012. Antifungal activity of wheat root exudate extracts on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* growth. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 12: 329–337.
- Schwyn, B. & Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophore. *Analytical Biochemistry*, 160(1): 47–56.
- Segarra, G., Casanova, E., Bellido, D., Odena, M.A., Oliveira, E. & Trillas, I. 2007. Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34. *Proteomics*, 7: 3943–3952.
- Silva, S., De Costa, H., Lopes, T., Ramos, V., Rodrigues, N., Pereira, A., Lino-Neto, T. & Baptista, P. 2023. Potential of the endophyte *Penicillium commune* in the control of olive anthracnose via induction of antifungal volatiles in host plant. *Biological control*, 187: 105373.
- Sim, G.S.F., Chem, Y.L., Ng, S.L. & Ting, A.S.Y. 2019. Antifungal activities of metal-tolerant endophytes against *Ganoderma boninense* under the influence of metal stress. *Biological Control*, 130: 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.12.004>
- Sivanesan, A. 1987. *Graminicolous* species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *Mycological Papers*, 158: 1–261.
- Shores, M., Yedidia, I. & Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology*, 95: 76–84.
- Swofford, D.L. 2002. *phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)*. Sunderland, Massachusetts Sinauer Associates.
- Sundaramoorthy, S., Raguchander, T., Ragupathi, N. & Samiyappan, R. 2012. Combinatorial effect of endophytic and plant growth promoting rhizobacteria against wilt disease of *Capsicum annum* L. caused by *Fusarium solani*. *Biological control*, 60: 59–67. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.10.002>
- Sunitha, V.H., Devi, D.N. & Srinivas, C. 2013. Extracellular enzymatic activity of endophytic fungal strains isolated from medicinal plants. *World Journal of Agricultural Sciences*, 9: 1–9.
- Takenaka, S., Nishio, Z. & Nakamura, Y. 2003. Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathology*, 96: 908–916.
- Ting, A.S.Y., Mah, S.W. & Tee, C. S. 2010. Identification of Volatile Metabolites from Fungal Endophytes with Biocontrol Potential towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4. *American Journal of Agricultural and Biological Science*, 5: 177–182.
- Tiru, M., Muleta, D., Bercha, G. & Adugna, G. 2013. Antagonistic effect of rhizobacteria against coffee wilt disease caused by *Gibberella xylarioides*. *Asian Journal Plant Pathology*, 7: 109–122.
- Trillas, M.I. & Segarra, G. 2009. Chapter 8 Interaction between nonpathogenic fungi and plant. *Advances in botanical research*, 51: 321–359.
- Vera Palma, C.A., Madariaga Burrows, B.P., González, M.G., Gamboa, B.R. & Moya-Elizondo, E.A. 2019. Integration between *Pseudomonas protegens* strains and fluquinconazole for the control of take-all in wheat. *Crop Protection*, 121: 163–172.
- Uthandi, S., Karthikeyan, S. & Sabarinathan, K.G. 2010. Gibberellic acid production by *Fusarium fujikuroi* SG2. *Journal of scientific and industrial research*, 69: 211–214.
- Waller, F., Mukherjee, K., Deshmukh, S.D., Achatz, B., Sharma, M., Schäfer, P. & Kogel, K.H. 2008. Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related Sebaciniales species. *Journal of Plant Physiology*, 165: 60–70. doi: 10.1016/j.jplph.2007.05.017

- Waqas, M., Khan, A.L., Kamran, M., Hamayun, M., Kang, S.M., Kim, Y.H. & Lee, I.J. 2012. Endophytic fungi produce gibberellins and indoleacetic acid and promotes host-plant growth during stress. *Molecules*, 17: 10754–10773.
- Weller, D.M. & Cook, R.J. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73: 463–469.
- White, T.J., Bruns, T. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White JW (eds). *A Guide to Molecular Methods and Applications*. Academic Press, New York. 315–322.
- Xiang, L., Gong, S., Yang, L., Hao, J., Xue, M., Zhang, F., Shi, W., Wang, H. & Yu, D. 2016. Biocontrol potential of endophytic fungi in medicinal plants from Wuhan botanical garden in China. *Biological Control*, 94: 47–55.
- Yan, L., Zhu, J., Zhao, X., Shi, J., Jiang, C. & Shao, D. 2019. Beneficial effects of endophytic fungi colonization on plants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 103: 3327–3340. [https:// doi.org/10.1007/s00253-019-09713-2](https://doi.org/10.1007/s00253-019-09713-2)
- Yasmin, S., Hafeez, F.Y., Mirza, M.S., Rasul, M., Hafiz, M.I., Arshad, H.M.I., Zubair, M. & Iqbal, M. 2017. Biocontrol of Bacterial Leaf Blight of Rice and Profiling of Secondary Metabolites Produced by Rhizospheric *Pseudomonas aeruginosa* BRp3. *Frontiers in Microbiology*, 8: 1–23.
- Yang, L.R., Quan, X., Xue, B.G., Goodwin, P.H., Lu, S.B. & Wang, J.H. 2015. Isolation and identification of *Bacillus subtilis* strain YB-05 and its antifungal substances showing antagonism against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Biological Control*, 85: 52–58. Doi:10.1016/j.biocontrol.2014.12.010
- Yu, Y., Kang, Z., Buchenauer, H. & Huang, L. 2009. Purification and characterization of a novel extracellular β -1, 3-glucanase complex (GluGgt) secreted by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 25: 2179–2186.
- Zakira, N., Adam, H.P., Fauzia. Y.H. & Michael. R.R. 2009. Identification of rice blast disease suppressing bacterial strains from the rhizosphere of rice grown in Pakistan. *Crop Protection*, 28: 1052–1060.
- Zhao, G., Sun, T., Zhang, Z., Zhang, J., Bian, Y., Hou, C., Zhang, D., Han, S. & Wang, D. 2023. Management of Take-all disease caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat through *Bacillus subtilis* strains. *Frontiers in microbiology*, 1118176. doi: 10.3389/fmicb.2023.1118176
- Zhang, J., Yan, H., Xia, M., Xie, L., Goodwin, P.H., Quan, X., Sun, R., Wu, C. & Yang, L. 2020. Wheat root transcriptional responses against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Phytopathology Research*, 2: 1–23.
- Zhang, C.Y., Wang, W.W., Xue, M., Liu, Z., Zhang, Q.M. & Hou, J.M. 2021. The combination of a biocontrol agent *Trichoderma asperellum* SC012 and hymexazol reduces the effective fungicide dose to control Fusarium wilt in cowpea. *Journal of Fungi*, 7: 685. doi: 10.3390/jof7090685
- Zhang, Q.H., Zhang, J., Yang, L., Zhang, L., Jiang, D.H., Chen, W.D. & Li, G.Q. 2014. Diversity and biocontrol potential of endophytic fungi in *Brassica napus*. *Biological Control*, 72: 98–108.

Isolation and identification of *Bipolaris* strains as biocontrol agents of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the causal agent of wheat take-all disease

Masumeh gholami ¹, Jahanshir Amini ², Jafar abdollahzadeh ³, Morahem ashengroph ⁴

1., 2., 3. Ph.D. student, Professor, Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

4. Professor, Department of Biology and Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Kurdistan, Iran.

Corresponding author: Jahanshir Amini, email: jamini@uok.ac.ir

Received: Jan., 06, 2026

12(2) 81–100

Accepted: Feb., 09, 2026

Abstract

Take-all disease caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (Ggt) is one of main wheat diseases worldwide. It is the most important disease of wheat and other temperate small-grain cereal such as barley and rye. Biological control is promising approach to protecting plants from disease. In this study, two endophytic fungi isolated from healthy cereals plants and their potential as biological control agents (BCAs) were tested against *Ggt* under *in vitro* and greenhouse conditions. The fungal endophytes were identified based on morphology and ITS rDNA sequences as *Bipolaris sorokiniana* Ag2K1 and *B. victoriae* O31R3. The selected isolate of pathogen (*Ggt*) was pathogenic on wheat plant c.v Pishta.z and the first symptoms of disease appeared after 20 days. Pathogen infected wheat roots and caused a root rot, and symptoms progressed into the crown and base of the wheat stem. Both endophytic fungi represented *in vitro* antifungal activity against *Ggt* by dual culture test with (33.85%) in *B. sorokiniana* Ag2K1 and (65.41%) in *B. victoriae* O31R3. But both endophytic fungi had low effect on growth of *Ggt in vitro* by volatile and non-volatile compounds (2.67% to 11.48%). Both isolates produced Pectinase. Isolate of *B. victoriae* O31R3 produced Chitinase. None of isolates produced Protease, Cellulase, Siderophore, HCN and phosphate solubilization. Both isolates *Bipolaris sorokiniana* Ag2K1 and *B. victoriae* O31R3 had significant effects on controlling take-all in greenhouse conditions and reduced disease severity of take-all in wheat with ranging from 51.32% to 53.55%, respectively. Also, both isolates *Bipolaris sorokiniana* Ag2K1 and *B. victoriae* O31R3 produced IAA and gibberellin, which had the most effect on increasing of growth parameters of wheat plant in greenhouse conditions. The results of *in vitro* and greenhouse conditions showed that the endophytic fungi had an effective antifungal activity against *Ggt* causal agent of take-all disease in wheat. No disease symptoms were observed in seedlings infected by these isolates (*B. sorokiniana* Ag2k1 and *B. victoriae* O31R3). Therefore, it is possible, that these endophytes as biocontrol agents were protected wheat plant against *Ggt* causal agent take-all disease. The results of this study showed that it may be possible to manage wheat take-all disease effectively by using endophytic fungi as biological control agents for use in the field.

Keywords: Antifungal compounds, biological control, Fungal endophytes, *ITS rDNA* gene