The University of Tehran Press

Iranian Journal of Plant Protection Science

Online ISNN: 2008-4781

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

Biological control of Take-all disease of wheat using two fungal endophytes, *Penicillium canescens* and *Penicillium hordei*

Masumeh Gholami[1], Jahanshir Amini[2]✉, Jafar Abdollahzadeha[3], Morahem Ashengroph[4]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. E-Mail: Gholami.m2012@yahoo.com
2. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. E-Mail: jamini@uok.ac.ir
3. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran. E-Mail: J.abdollahzadeh@uok.ac.ir
4. Department of Biology and Biotechnology, Faculty of Sciences, University of Kurdistan, Sanandaj, Kurdistan, Iran. E-mail: m.ashengroph@uok.ac.ir

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 13 December 2025

Revised: 24 December 2025

Accepted: 29 December 2025

Published online: Atumn and Winter 2025

Keywords:

Calmodulin gene,

disease severity,

greenhouse,

Ggt,

Wheat Take-all.

ABSTRACT

In this study, two endophytic fungi isolate Ag1T5 and TB4L1 were isolated from *Aegilops triuncialis* and *Triticum boeoticum*, respectively. They were identified as *Penicillium canescens* Ag1T5 and *Penicillium hordei* TB4L1 based on phenotypic characteristics and molecular phylogenetic analysis of the *calmodulin* gene (Cam) sequences. Then, their abilities as potential biological control agents (BCAs) against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) were evaluated *in vitro* and greenhouse conditions. In dual-culture method assay, isolates *P. canescens* Ag1T5 and *P. hordei* TB4L1 reduced *Ggt* growth by 52.65% and 70.69%, respectively. Antifungal effects of culture filtrates were observed for *P. canescens* with 38.11% inhibition, followed by the *P. hordei* (29.44%). Unlike, the volatile metabolites of selected endophytic fungi had low effect on growth of *Ggt in vitro* (2.07 to 10.33%). Fungal endophytes produced antifungal metabolites such as chitinase, cellulase, siderophore, protease and pectinase. Both isolates did not produce HCN and they were not able to phosphate solubilization. Furthermore, both isolates produced auxin (1.57-2.09 µg/mL) and gibberellin hormones (28.85-29.91 µg/mL), which significantly enhanced growth parameters of wheat plants. Disease severity of take-all were reduced by Ag1T5 with 83.57%, followed by TB4L1 (38.74%) in greenhouse conditions. In conclusion, both selected endophytic fungi were reduced disease severity of wheat take-all disease and were improved growth parameters of wheat plant under greenhouse conditions. Moreover, *P. canescens* Ag1T5 is good candidate, which might be useful in protection of wheat plant against take-all disease under field conditions.

Cite this article: Gholami, M., Amini, J., Abdoollahzadeha, J. & Ashengaroph, M. (2025). Biological control of Take-all disease of wheat using two fungal endophytes, *Penicillium canescens* and *Penicillium hordei*. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 56 (2), 319-342. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.409466.1007101

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.409466.1007101

Extended Abstract

Introduction

Gaeumannomyces graminis var. *tritici* Walker (*Ggt*) cause wheat take-all disease and it is the most important disease of wheat and other temperate small-grain cereal such as barley and rye (Cook., 1994; Yu et al., 2009; Cook, 2003). The pathogen survives parasitically in the roots during the growing season and saprophytically on plant debris after crop harvest (Bailey et al., 1999). The pathogen damages cereal plants by rotting the root, crown, and base of the stems and the disease can spread through different ways such as soil, diseased plants, and plant debris ((Asher and Shipton, 1981). Management of the disease by current methods such as crop rotation, use of chemical fungicides, resistant varieties, tillage to hasten infected residue decomposition has been reported to be ineffective (Ghahfarokhy et al., 2011; Liu et al., 2009). Biocontrol of wheat take-all disease by means of different microorganisms could be used as an effective and sustainable approach to control take-all disease of wheat (Lirong Yang et al., 2015; Youn-Sig Kwak et al., 2012) and the use of biocontrol agents (BCAs) to management of wheat take-all can be a more efficient and environmentally friendly alternative (Lirong Yang et al., 2015). For example, Gholami et al. (2019) found that soil drenches of *Coprinopsis urticicola* and *Rhizoctonia endophytica* decreased disease severity of wheat take-all comparable to fungicide application, and Sari et al. (2006) used a seed soaking treatment with *Pseudomonas fluorescens* to control wheat take-all in the greenhouse and field conditions. The aim of this research using two endophyte isolates for their ability to suppress Ggt causing take-all disease of wheat *in vitro* and greenhouse conditions.

Materials and Methods

The pathogen Ggt was obtained from the collection of plant pathology department, university of Kurdistan (GenBank accession number: MH488732). Two fungal endophytes were isolated from healthy cereal plants and were identified under a microscope (Olympus BX51) based on the morphology (colonies, mycelia and spores) and molecular phylogenetic analysis. Pathogenicity test of Ggt was demonstrated on wheat (*Triticum aestivum* L.) seeds of cultivars Pishtaz susceptible to take-all disease. Antagonistic abilities of fungal endophytes against the pathogen were investigated through in vitro assays (dual culture, volatile metabolite and non-volatile metabolite) and greenhouse conditions in a completely randomized design with four replications. For greenhouse tests, pathogen and fungal endophytes inocula were prepared on sterilized wheat seed and incubated for 4 weeks. The wheat cultivars Pishtaz susceptible to wheat take-all disease was planted in sterilized soil -sand-peat mix (1:1:1, w/w/w) inoculated with pathogen (20 g/kg soil, in each pot) and endophytes (40 g/kg soil in each pot) in greenhouse conditions. After 35 days, the disease severity and growth parameters of the wheat plant were evaluated (Weller and Cook, 1983). Data were statistically analyzed by standard analysis of variance (ANOVA) using SAS software (Version 8.2; SAS Institute, Cary, NC, USA, 2013). Differences among different treatments were analyzed using Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at $P \leq 0.05$. Data were reported as mean values ± standard error (SE).

Results and Discussion

Two fungal endophytes were identified as *Penicillium canescens* Ag1T5 and *Penicillium hordei* TB4L1 based on phenotypic characteristics and molecular phylogenetic analysis of the calmodulin gene (Cam) sequences. The results of this research showed that two endophytes were highly capable of inhibition the mycelial colony growth of Ggt with inhibition 52.65-70.69% and 29.44-38.11% respectively by dual culture and non-volatile metabolite assays as compared to untreated control treatments after 7 days of inoculation, while volatile of *P. canescens* and *P. hordei* had no significant inhibitory effect on Ggt. The fungal endophytes such as *Fomes fomentarius* and *Coprinopsis urticicola* showed *in vitro* antifungal activity against *Ggt* by dual culture assay on PDA medium with 39.1% and 43.6% inhibition, respectively. Two fungal endophytes produced antifungal metabolites including chitinase, cellulase, siderophore, protease and pectinase. Furthermore, both isolates produced IAA and gibberellin, which had the most effect on increasing of growth parameters of wheat plant (Gholami et al., 2019). Isolate of *C. urticicola* suppressed the mycelia growth and caused change in morphology of *Ggt* so that it may be correlated with production metabolites or lytic enzymes such as protease and pectinase that caused abnormalities hyphae morphology (Gholami et al., 2019). In greenhouse conditions, both endophytes *P. canescens* and *P. hordei* were reduced disease severity 83.57% and 38.74% respectively. Furthermore, both fungal endophytes improved plant growth parameters of wheat plant. Several biocontrol agents such as of *Bacillus subtilis* (Lirong Yang et al., 2015; Lirong Yang et al., 2018), *Pseudomonas fluorescens* (Youn-Sig Kwak et al., 2012; Mohamed and Grossmann, 1994), *Streptomyces*, *Microbispora* and *Nocardioides* (Justin et al., 2004) were evaluated to control wheat take-all disease and reduced disease severity of disease. Also, *C. urticicola* M2 and *Rhizoctonia zeae* M32 effectively reduced wilt disease and increased the plant growth parameters of wheat plant in greenhouse conditions ($P \leq 0.05$) in comparison with the inoculated control (Gholami et al., 2019).

Conclusion

The results of this research indicated *P. canescens* Ag1T5 had a great potential as biocontrol agent against take-all of wheat caused by *Ggt in vitro* and greenhouse conditions. In addition, *P. canescens* Ag1T5 was improved wheat plant growth in greenhouse conditions and it can be used as a safe and suitable alternative to chemical fungicides and could be a useful biocontrol agents BCA) for take-all management.

Author Contributions

MG and JA conceptualized the project. MG and JA performed the experiments and wrote the manuscript. JA and MA edited the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Data Availability Statement

Data are available upon request from the authors.

Acknowledgements

This research was supported by a grant from the Plant Protection Department of the University of Kurdistan (Grant No: 96/19/32668)**.**

Ethical considerations

The authors avoided data fabrication, falsification, plagiarism, and misconduct.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۵۶، شماره ۲

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۸۶۸-۲۴۲۳

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

کنترل زیستی بیماری پاخوره گندم با استفاده از دو قارچ اندوفیت *Penicillium canescens* و *Penicillium hordei*

معصومه غلامی[۱]| جهانشیر امینی[۲]✉| جعفر عبداله زاده[۳]| مراحم آشنگرف[۴]

۱. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: Gholami.m2012@yahoo.com

۲. نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: jamini@uok.ac.ir

۳. گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: J.abdollahzadeh@uok.ac.ir

۴. گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. رایانامه: m.ashengroph@uok.ac.ir

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۲۲
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۱۰/۰۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۸
تاریخ انتشار: پاییز و زمستان ۱۴۰۴

کلیدواژه‌ها:
پاخوره گندم، ژن کالمودولین، Ggt، گلخانه، شدت بیماری.

چکیده

در این تحقیق، دو جدایه قارچ اندوفیت Ag1T5 و TB4L1 بترتیب از *Aegilops triuncialis* و *Triticum boeoticum* جداسازی گردید. بر اساس خصوصیات ریخت شناسی و توالی ناحیه کالمودولین (CaM) این دو جدایه به عنوان *Penicillium canescens* و *Penicillium hordei* شناسایی شدند. هر دو جدایه *P. canescens* و *P. hordei* رشد پرگنه قارچ بیمارگر را در روش کشت متقابل بترتیب به میزان ۵۲/۶۵ و ۷۰/۶۹ درصد کاهش دادند. همچنین ترکیبات غیر فرار (فیلتر شده) *P. canescens* و *P. hordei* رشد پرگنه قارچ بیمارگر را بترتیب به میزان ۳۸/۱۱ و ۲۹/۴۴ درصد کاهش دادند. برعکس، ترکیبات فرار این دو جدایه قارچ اندوفیت تاثیر قابل توجهی روی رشد پرگنه قارچ بیمارگر نداشتند (۱۰/۳۳ و ۲/۰۷ درصد). هر دو جدایه ترکیبات ضد قارچی مثل کتیناز، سلولاز، سیدروفور، پروتیناز و پکتیناز تولید کردند. هر دو جدایه قادر به تولید سیانید هیدروژن نبودند و توانایی حلالیت فسفات را نیز نداشتند. علاوه بر این، هر دو جدایه اندوفیت قارچی هورمون اکسین (۱/۵۷ تا ۲/۰۹ میکروگرم در میلی‌لیتر) و جیبرلین (۲۸/۸۵ تا ۲۹/۹۱ میکروگرم در میلی‌لیتر) تولید کردند که روی بهبود شاخص‌های رشد گیاه گندم تاثیر داشتند. شدت بیماری پاخوره گندم در شرایط گلخانه توسط دو جدایه *P. canescens* و *P. hordei* بترتیب به میزان ۸۳/۵۷ و ۳۸/۷۴ درصد کاهش یافت. هر دو جدایه قارچ اندوفیت انتخابی شدت بیماره پاخوره گندم را کاهش و شاخص‌های رشدی گندم را بصورت معنی‌داری افزایش دادند. بنابراین، جدایه *P. canescens* Ag1T5 به عنوان یک جایگزین خوب ممکن است در دفاع از گیاه گندم در مقابل بیماری پاخوره گندم در شرایط مزرعه موثر باشد.

استناد: غلامی، معصومه؛ امینی، جهانشیر؛ عبداله زاده، جعفر و آشنگرف، مراحم (۱۴۰۴). بررسی اثرات غیرکشندگی باکتری *Bacillus thuringiensis* روی حلزون *کنترل زیستی بیماری پاخوره گندم با استفاده از دو قارچ اندوفیت Penicillium canescens و Penicillium hordei*. *نشریه دانش گیاهپزشکی ایران*، ۵۶ (۲)، ۳۴۲-۳۱۹. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.409466.1007101

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.409466.1007101

مقدمه

بیماری پاخوره گندم توسط قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* (*Ggt*) ایجاد می‌گردد و یکی از مهمترین بیماریهای ریشه گندم در دنیا است. این بیماری در ایران بخصوص مناطق کردستان و کرمانشاه نیز خسارت قابل توجهی به محصول گندم وارد می‌کند (Gholami *et al*., 2019). قارچ بیمارگر (*Ggt*) به سیستم ریشه حمله و سبب پوسیدگی ریشه، طوقه و قسمت‌های پایین ساقه گندم می‌گردد و سرانجام سبب مرگ گیاه می‌شود (Cook, 2003). واریته‌های دیگر قارچ بیمارگر علاوه بر گندم به سایر گیاهان خانواده غلات بخصوص جو و چاودار نیز خسارت وارد می‌کند (Nilsson and Smith, 1981). روشهای زراعی مثل تناوب، عمل شخم و غیره از روشهای متداول مدیریت این بیماری است. نبود ارقام مقاوم در مقابل این بیماری، مناسب بودن قارچکش‌های شیمیایی و مصرف آنها به‌دلیل مشکلات زیست محیطی و عدم اجرای تناوب زراعی بدلیل نیاز به این محصول راهبردی، در نتیجه مدیریت این بیماری توسط روش‌های سنتی و رایج امکان پذیر نیست (Mendez *et al*., 2021; Cook &Weller, 1987). لذا استفاده از روش کنترل زیستی و کاربرد میکروارگانیسم‌های غیربیماریزا جهت مدیریت این بیماری خاکزاد یک ضرورت است. تعداد زیادی از گونه های *Pseudomonas* و *Bacillus* قادر هستند رشد پرگنه قارچ بیمارگر و شدت بیماری پاخوره گندم را با مکانیسم‌های مختلف کاهش دهند و همچنین شاخص‌های رشدی گیاه را نیز بهبود و افزایش دهند (Kianivafa *et al*., 2021; Weller and Cook, 1983; Haas & Defago, 2005; Lirong *et al*., 2015).

قارچهای اندوفیت قادر هستند که در داخل اندام‌های مختلف گیاهان میزبان خود مستقر شوند، بدون اینکه سبب علایم بیماری در آنها شوند (Petrini, 1991) و همچنین آنها قادر هستند که به عنوان عوامل کنترل زیستی سبب محدود کردن فعالیت بیمارگرهای گیاهان شودند (Arnold *et al*., 2003). مکانیسم کنترل بیماریهای‌گیاهی توسط اندوفیت‌های قارچی به سه روش تاثیر مستقیم (تقابل بین اندوفیت و بیمارگر)، تاثیر غیر مستقیم (تحریک سیستم دفاعی گیاه میزبان بر علیه بیمارگر) و تاثیرات اکولوژیکی (اشغال نیچ اکولوژیکی و رقابت بر سر غذا و فضا) صورت می‌گیرد (Geo *et al*., 2010). علاوه بر این، اندوفیت‌های قارچی ممکن است تاثیر مفید روی گیاهان داشته باشند و سبب تحریک رشد گیاهان (Barka *et al*., 2002; Gholami *et al*., 2019)، افزایش مقاومت گیاه در مقابل خشکی (Swarthout *et al*., 2009)، تحمل به شرایط نامناسب خاک (Malinowski *et al*., 2004) و حفاظت در مقابل علف‌خوارن و حشرات (Carroll, 1988; Vega *et al*., 2008) شوند. هدف از اجرای این تحقیق تاثیر دو سویه قارچ اندوفیت *Penicillium canescens* Ag1T5 و *Penicillium hordei* TB4L1 روی بیماری پاخوره گندم در شرایط آزمایشگاه و گلخانه است. همچنین تاثیر دو سویه قارچ اندفیت انتخابی روی فاکتورهای رشدی گیاه گندم در شرایط گلخانه بررسی گردید. بر اساس دانش ما، این اولین گزارش از تاثیر اندفیت‌های قارچی جنس پنیسیلیوم بر علیه قارچ *Ggt* است.

پیشینه پژوهش

میکروارگانیسم‌های متعدی گزارش شده‌اند که توانایی زیادی در کنترل بیماری پاخوره گندم دارند (Mendez *et al*., 2021; Xu *et al*., 2021; Gholami *et al*., 2019; Duffy and Weller, 1995; Wong, 1994). این میکروارگانیسم‌ها آنتی‌بیوتیک‌ها، سیانید هیدروژن، سیدروفور و غیره تولید می‌کنند که سبب محدودیت در رشد بیمارگرهای گیاهان می‌شوند (Leong and Gutterson, 1988; Gholami *et al*., 2019). همچنین اندوفیت‌های قارچی قادر هستد که از جوانه زنی اسپور قارچهای بیمارگر جلوگیری نمایند (Mohamadpoor *et al*., 2022; Schlegel *et al*., 2016). اندوفیت‌های قارچی مثل جنس‌های *Trichoderma*، *Aureobasidium*، *Fusarium* و *Penicillium* نقش زیادی در کنترل بیمارگرهای گیاهی از طریق پارازیته کردن بیمارگرها و تحریک مقاومت گیاه میزبان دارند (Arnold *et al*., 2003; Busby *et al*., 2016). گونه‌های تریکودرما تولید آنزیم‌های مثل کیتیناز و ß -1,3-glucanase و N- acetylglucominidases می‌کنند که سبب

تجزیه دیواره سلولی قارچهای بیمارگر می‌شوند (Cheong *et al*., 2017). سویه باکتری *Pseudomonas chlororaphis* YB-10 با تولید آنزیم‌های خارج سلولی مثل پروتئاز و سلولاز از رشد پرگنه قارچ عامل بیماری پاخوره گندم جلوگیری کرد و همچنین سبب تحریک سیستم دفاعی گیاه گندم از طریق تولید آنزیم‌های دفاعی در گیاه گندم شد (Xu *et al*., 2021).

گونه های جنس پنی‌سیلیوم به طور گسترده از محیط های مختلف در طبیعت جداسازی می‌شوند. همچنین این گونه‌ها از سطح و داخل اندام‌های گیاهان (بصورت اپی فیت و اندوفیت) و از منطقه ریزوسفر ریشه نیز جداسازی شده‌اند (Yadav *et al*., 2018). تعداد زیادی از گونه‌های جنس پنی‌سیلیوم طیف زیادی از متابولیت‌های ثانویه تولید می‌کنند که در کشاورزی در کنترل بیماریهای گیاهان، بیوتکنولوژی و داروسازی اهمیت دارند (Deshmukh *et al*., 2022; Wen *et al*., 2022; Xie *et al*., 2018). علاوه بر این، تعداد زیادی از سویه‌های قارچی و باکتریایی شناسایی شدند که در کنترل موثر بیماری پاخوره گندم نقش دارند (Combs *et al*., 2004; Kwak *et al*., 2012; Liu *et al*., 2009; Seri *et al*., 2006; Gholami *et al*., 2019). تحقیقات نشان داده که *Penicillium digitatum* رشد پرگنه قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp *melonis* را در شرایط آزمایشگاه مهار کرد و شدت بیماری فوزاریومی طالبی در شرایط گلخانه را کاهش داد (Hamid et al., 2018). قارچ اندوفیت *Penicillium citrinum* توانست شدت و وقوع بیماری شانکر گلابی به میزان قابل توجهی کاهش دهد (Yuan *et al*., 2021). همچنین گونه‌های مختلف قارچ *Penicillium* spp. که به‌صورت اندوفیت در گیاه بلوط مستقر هستند قادر هستند شدت بیماریهای پس از برداشت بلوط را کاهش دهند (Wen *et al*., 2024). در هر صورت گزارش در خصوص کنترل زیستی بیمارگرهای قارچی توسط جدایه‌های جنس پنی‌سیلیوم بسیار کم بوده و گزارشی از آن بر علیه قارچ پاخوره گندم وجود ندارد.

روش شناسی پژوهش

قارچ بیمارگر

سویه قارچ بیمارگر از کلکسیون آزمایشگاه کنترل زیستی گروه گیاهپزشکی دانشگاه کردستان تهیه گردید (GenBank accession number: MH488732). این سویه از روی ریشه گندم در منطقه کامیاران جداسازی و شناسایی گردید (Gholami *et al*., 2019). آزمون بیماریزایی این جدایه روی گیاه گندم رقم پیشتاز در آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه کردستان انجام شد (Weller and Cook, 1983).

جداسازی قارچ اندوفیت

جداسازی دو جدایه قارچ اندوفیت Ag1T5 و TB4L1 بترتیب از طوقه گیاه *Aegilops triuncialis* و برگ *Triticum boeoticum* جداسازی گردید. پس از انتقال نمونه‌ها به آزمایشگاه، آنها را در زیر آب شیر معمولی با فشار ملایم به مدت چند دقیقه شستشو داده تا گل و لای آن حذف گردد. اندام‌های برگ، ساقه، طوقه و ریشه گیاهان جمع آوری شده را به قطعات سه الی پنج میلی‌متری تقسیم کرده و نمونه‌ها را در الکل اتانول ۷۰ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی کرده و پس از آن به مدت سه دقیقه در محلول هیپوکلرید سدیم پنج درصد و دوباره در اتانول ۷۰ درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی کرده و سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده و سرانجام روی کاغذ صافی سترون خشک شدند (Larran *et al*., 2007). نمونه ها در داخل تشتک پتری با قطر نه سانتی متری روی محیط غذایی سیب زمینی دکسترز آگار (Potato dextrose agar (PDA حاوی ۱۵۰ میلی گرم داکسی سایکلین (Doxycycline, Iran Daru) کشت شدند (پنج قطعه در هر تشتک پتری و دو تشتک پتری برای هر نمونه). نمونه ها در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی به مدت هفت روز نگهداری شدند. سپس نمونه ها با روش تک اسپور خالص سازی و در دمای چهار درجه سلسیوس روی محیط غذایی PDA ذخیره شدند.

شناسایی قارچ اندوفیت

جدایه‌های قارچ‌های اندوفیت روی محیط‌های غذایی PDA، Malt Extract agar (MEA)، Oatmeal agar (OA)، Czapek,s agar (CzA)، Czapek yeast autolysate agar (CYA) و Yeast extract sucrose agar (YES) کشت و در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس در تاریکی به مدت دو هفته نگهداری شدند. جدایه‌های قارچی بر اساس صفات ریخت شناسی با استفاده از میکروسکوپ نوری مدل Olympus BX51 (Frisvad & Samson, 2004; Visagie et al., 2014) و توالی ناحیه کالمودولین (CaM) شناسایی شدند. به منظور استخراج DNA، قارچهای اندوفیت در داخل فلاسک ارلن ۱۰۰ میلی لیتری حاوی محیط غذایی Potato dextrose broth (PDB)، کشت و روی دستگاه شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت ده روز نگهداری شدند. محتویات ارلن‌ها روی کاغذ صافی سترون که روی یک قیف قرار داشت ریخته شد و میسلیوم قارچهای اندوفیت جمع‌آوری گردید. توده‌های میسلیومی پس از آبگیری کامل به میکروتیوب‌های ۱/۵ میلی‌لیتری سترون منتقل شدند. استخراج DNA ژنومی بر اساس روش Raeder and Broda (1985) انجام شد. به‌منظور شناسایی قارچهای اندوفیت از آغازگرهای CMD5 (CCGAGTACAAGGARGCCTTC) و CMD6 (CCGATRGAGGTCATRACGTGG) برای تکثیر بخشی از ژن *Calmodulin* استفاده شد (Hong *et al*., 2006). توالی‌های خام حاصل با استفاده از نرم‌افزار BioEdit و DNA dragon بررسی و ویرایش شدند و توالی‌های برآیند به دست آمد. سپس توالی‌های برآیند با توالی جدایه‌های معتبر موجود در بانک‌های اطلاعاتی توسط نرم‌افزار Clustal X version 2.1 همردیف شدند و در نهایت ترسیم درخت‌های فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار PAUP v. 4.0b10 (Swofford, 2002) به روش Neighbor-joining انجام گرفت.

آزمون های آزمایشگاهی

تهیه زادمایه

برای تهیه زادمایه قارچ بیمارگر و قارچ اندوفیت، ۱۰۰ گرم بذر گندم و ۱۵ میلی لیتر آب مقطر در فلاسک‌های ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شد و درب آنها با پنبه مسدود گردید. ارلن ها دو بار در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه با فاصله ۲۴ ساعت (در دو روز متوالی) اتوکلاو شدند. هر فلاسک ارلن مایر با پنج بلوک از پرگنه جوان قارچ بیمارگر و قارچ‌های اندوفیت به‌صورت جداگانه در شرایط سترون زیر هود بیولوژیک مایه‌زنی شد و تا زمان کلونیزاسیون کامل در ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۲۱ روز نگه‌داری گردید (Cook and Naiki, 1982) .

آزمونهای مهار زیستی قارچ بیمارگرتوسط اندوفیت‌های قارچی در شرایط آزمایشگاه

کشت متقابل

به منظور بررسی اثر بازدارندگی اندوفیت‌های قارچی روی رشد پرگنه قارچ بیمارگر، در فاصله یک سانتی متری از لبه تشتک‌های پتری حاوی محیط غذایی PDA یک قرص نیم میلی‌متری از پرگنه قارچ بیمارگر هفت روزه به صورت وارونه قرار داده و درست در نقطه مقابل آن قرص پرگنه قارچ اندوفیت مشابه قارچ بیمارگر قرار داده شد. در تیمار شاهد به‌جای قارچ اندوفیت یک قرص حاوی فقط محیط غذایی قرار داده شد(Guo *et al*., 2011). کلیه تشتک‌ها پتری در دمای ۲ ± ۲۵ سلسیوس گراد در داخل انکوباتور نگهداری شد. بعد از هفت روز درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر با استفاده از فرمول $I(\%) = (D_C-D_t)/D_c \times 100$ اندازه گیری شد، بطوریکه I، درصد بازدارندگی؛ D_c، قطر پرگنه قارچ بیمارگر در تیمار شاهد؛ D_t، قطر پرگنه قارچ بیمارگر در تیمار قارچ اندوفیت و قارچ بیمارگر می‌باشد (Guo *et al*., 2011). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

ترکیبات فرار

به‌منظور بررسی اثر متابولیت‌های اندوفیت‌های قارچی روی پرگنه قارچ بیمارگر، قارچ بیمارگر و قارچ اندوفیت به صورت جداگانه در تشک‌های پتری حاوی محیط غذایی PDA کشت گردید. دو تشتک را وارونه روی هم قرار داده شدند، بطوریکه تشتک حاوی قارچ بیمارگر در بالا قرار گرفت. در تیمار شاهد، بجای پرگنه قارچ اندوفیت از قرص نیم میلیمتری حاوی محیط غذایی PDA خالی استفاده شد. کلیه تشتک ها با پارافیلم کاملا مسدود و در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس در داخل انکوباتور نگهداری شد. بعد از هفت روز درصد بازدارندگی با استفاده از فرمول بالا محاسبه شد (Ting *et al*., 2010).

ترکیبات خارج سلولی

در این روش، ابتدا در تشتک‌های حاوی محیط غذایی PDA، ورقه‌های سلفون سترون روی محیط غذایی قرار داده شد. سپس در مرکز هر تشتک یک قرص پنج میلی‌متری از کشت هفت روزه جدایه‌های اندوفیت قرار داده شد. کلیه تشتک‌ها به مدت سه روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس ورقه‌های سلفون‌های حاوی اندام‌های رشد کرده قارچی اندوفیت قبل از اینکه میسلیوم به لبه آنها برسد، برداشته شد و مرکز تشتک‌ها با زادمایه پنج روزه قارچ بیمارگر (قرص پنج میلیمتری) تلقیح گردید (Zakira *et al*., 2009). همه تشتک‌های پتری در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و بعد از هفت روز با استفاده از فرمول بالا درصد بازدارندگی قارچ بیمارگر اندازه گیری شد (Zakira *et al*., 2009; Kraus and Loper, 1990).

آنزیمها و متابولیت های ثانویه

پروتئاز

به منظور بررسی قابلیت تولید پروتئاز توسط دو سویه قارچ اندوفیت از روش Chantawannakul *et al*. (2002) با کمی تغییرات استفاده شد. قارچ اندوفیت روی محیط کشت Skim Milk Agar (SMA) در دمای دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس کشت گردید. بعد از ۷۲ ساعت تشکیل هالهٔ بی‌رنگ یا شفاف در اطراف پرگنه قارچ اندوفیت نشان دهندهی فعالیت پروتئازی بود.

پکتیناز

به منظور بررسی قابلیت تولید پکتیناز توسط دو سویه قارچ اندوفیت از روش Sunitha *et al*.(2013) روی محیط کشت پکتیناز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد. بعد از پنج روز ظهور هالهی شفاف اطراف پرگنه قارچ اندوفیت نشان دهنده فعالیت آنزیم پکتیناز است.

سلولاز

به منظور بررسی توانایی تولید سلولاز توسط دو سویه قارچ اندوفیت انتخابی از محیط کشت Czapek-mineral salt agar در دمای ۲۵ درجه سلسیوس استفاده شد. بعد از پنج روز ۱۰ میلی لیتر از محلول یک درصد Congo Red به محیط کشت اضافه گردید و هر تشتک پتری با محلول یک مولار NaCl به‌مدت ۱۵ دقیقه لکه‌زدایی شد. سرانجام هاله روشن اطراف پرگنه قارچ اندوفیت نشان دهندهی فعالیت سلولازی است (Kasana et al., 2008).

کیتیناز

به منظور بررسی فعالیت کیتیناز توسط دو سویه قارچ اندوفیت انتخابی، سویه قارچ روی محیط کشت کلوییدال کیتین در دمای ۲۵ درجه سلسیوس کشت گردید. بعد از سه روز تشکیل هاله بنفش رنگ اطراف پرگنه قارچ اندوفیت به معنای تولید آنزیم کیتیناز در نظر گرفته شد (Agrawal & Kotasthane, 2012).

سیدروفور

بررسی توانایی تولید سیدروفور توسط دو قارچ اندوفیت با استفاده از روش Schwyn and Neilands (1987) با اندکی تغییرات و با استفاده از محیط Chrome Azorul S – blue agar (CAS) انجام گردید. تغییر رنگ محیط آبی به رنگ‌های زرد تا نارنجی، قرمز و بنفش به معنای تولید سیدروفور در نظر گرفته شد (Schwyn & Neilands, 1987).

سیانید هیدروژن

برای بررسی تولید سیانید هیدروژن، سویه‌های قارچ اندوفیت انتخابی روی محیط غذایی PDA کشت گردید. بعد از ۴۸ ساعت، کاغذ صافی سترون آغشته با محلول ۲ ٪ Na2CO3 و ۵ ٪ Picric acid در درب تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد و محکم با پارافیلم مسدود گردید. سپس، تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد. پس از گذشت هفت روز تغییر رنگ کاغذ صافی آغشته به محلول معرف از رنگ زرد به رنگ‌های کرم، قهوه ای روشن، قهوه‌ای تیره و آجری به‌عنوان نشانه تولید سیانید هیدروژن توسط قارچ‌های اندوفیت در نظر گرفته شد (Alstrom & Burns, 1989).

ترکیبات محرک رشد گیاهان

توانایی حلالیت فسفات

به مظور بررسی توانایی حلالیت فسفات توسط قارچ‌های اندوفیت، از محیط کشت Pikovskya's agar (۱۰ گرم گلوکز، ۵ گرم $Ca_3(PO4)_2$، ۰/۵ گرم $(NH_4)_2\ SO_4$، ۰/۲ گرم NaCl، ۰/۱ گرم $MgSO.2H_2O$ ، ۰/۰۰۲ گرم$MnSO_4$ ، ۰/۰۰۲ گرم $FeSO_4.7H_2O$، ۰/۲ گرم KCl ، ۰/۵ گرم عصاره مخمر و ۱۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) استفاده شد. یک قرص پنج میلی‌متری از پرگنه قارچ اندوفیت در مرکز تشتک‌ها قرار داده شد و تشتک‌ها در دمای ۲ ± ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. بعد از ۷۲ ساعت، جدایه‌هایی که هاله روشن در اطراف پرگنه قارچی نشان دادند به عنوان فعالیت مثبت برای محلولیت فسفات در نظر گرفته شدند (Gour, 1990).

تولید ایندول استیک اسید (IAA)

به‌منظور بررسی تولید هورمون اسید ایندول استیک توسط قارچ‌های اندوفیت انتخابی، قارچ‌های اندوفیت در داخل ارلن مایر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع سیب‌زمینی دکستروز (که ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر تریپتوفان پس از اتوکلاو و با عبور از فیلتر به آن اضافه شد) کشت و روی دستگاه شیکر با ۱۵۰ دور در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت هفت روز نگهداری شدند. سپس محیط کشت‌هایی که قارچ در آنها رشد کرده بود به لوله‌های فالکون ۵۰ میلی‌لیتری منتقل و در ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. محلول رویی به فلاسک جدید منتقل و رسوب حاصل نیز حذف شد. سپس یک میلی‌لیتر از محلول رویی برداشته شد و چهار میلی‌لیتر معرف سالکوسکی (۱۵۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ، ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر و ۷/۵ میلی‌لیتر FeCl3.6H20 نیم مولار) به آن اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. تغییر رنگ نمونه‌ها به قرمز، به عنوان شاخصی برای تولید ایندول استیک اسید در نظر گرفته شد. همچنین، برای تعیین میزان ایندول استیک اسید، ابتدا دستگاه اسپکتروفتومتر با محلول حاوی یک میلی‌لیتر از محیط کشتی که جدایه قارچی در آن کشت نشده بود به همراه چهار میلی‌لیتر معرف سالکوسکی کالیبره شد و سپس میزان جذب نوری نمونه‌ها درطول موج ۵۳۵ نانومتر قرائت شد. غلظت تولید اسید ایندول‌استیک در هر جدایه با نمودار استاندارد تهیه شده از غلظت‌های مشخص ایندول استیک اسید تعیین شد (Patten and Glick, 2002).

تولید اسید جیبرلیک

به‌منظور بررسی تولید جیبرلیک‌اسید سه دیسک از هر جدایه اندوفیت به داخل فلاسک‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع Czapek (۳ گرم $NaNO_3$، ۱ گرم K_2HPO_4، ۰/۵ گرم KCl، ۰/۵ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۱ گرم $FeSO_4.7H_2O$، ۳۰ گرم ساکارز در یک لیتر آب) که ۱۰۰۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر تریپتوفان پس از اتوکلاو و با عبور از فیلتر به آن اضافه و

مایه‌زنی شدند و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت شش روز نگهداری شدند. فلاسک شاهد با قارچ مایه‌زنی نشد (Waqas et al., 2012). مقدار جیبرلیک اسید موجود در مایع رویی بر اساس روش استاندارد Uthandi *et al*. (2010) تعیین شد. به این ترتیب که ۳۰ میلی لیتر از کشت‌های مایع شش روزه از هر فلاسک داخل لوله‌های جدید ریخته شد و در ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند تا هیف‌های قارچ حذف شود. ۲۵ میلی‌لیتر از مایع رویی داخل لوله‌های جدید ریخته شد و دو میلی‌لیتر استات روی یک مولار به آن‌ها اضافه گردید. بعد از دو دقیقه، دو میلی‌لیتر پتاسیم فروسیانید به هر لوله اضافه شد و لوله‌ها در ۱۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. به ازاء پنج میلی‌لیتر از این مایع رویی، حجم مساوی از HCL ۳۰٪ به آرامی اضافه شده و در درمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۷۵ دقیقه نگهداری شدند. سپس میزان جذب نور با دستگاه اسپکتروفتومتری (Labomed مدل uv-3200، ساخت آمریکا) در طول موج ۲۵۴ نانومتر اندازه گیری گردید.

آزمونهای گلخانه ای

اثبات بیماریزایی قارچ بیمارگر

جهت اثبات بیماریزایی جدایه قارچ بیمارگر، از بذور گندم رقم پیشتاز استفاده گردید. زاد مایه قارچ بیمارگر به نسبت ۲ درصد وزنی به خاک سترون (خاک–ماسه–کود: ۲:۱:۱ وزنی) داخل گلدان اضافه و مخلوط شد. بذور گندم، ابتدا با محلول هیپوکلریت سدیم ۵٪ به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شده و در داخل گلدان‌های مربوطه کشت شدند (در هر گلدان پنج بذر کشت گردید). این آزمون با سه تکرار (گلدان) انجام شد.

گلدان‌ها به اتاقک رشد در دمای ۲۲ درجه سلسیوس ، رطوبت نسبی ۷۰–۶۰ درصد و در شرایط نوری ۱۶ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی نگهداری شدند. بعد از ۳۵ روز، گیاهچه‌ها به آرامی از درون گلدان‌ها خارج و ریشه آنها در معرض آب ملایم شیر معمولی شستشو داده شد. علائم بیماری روی ریشه‌ها و طوقه به دقت بررسی و شدت آلودگی بر اساس سیستم رتبه بندی از صفر تا پنج اندازه‌گیری شد به طوریکه 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 گیاهان شدیداً کوتاه یا مرده است (Weller and Cook, 1983). جداسازی قارچ عامل بیماری دوباره پس از پایان آزمایش از ریشه‌های آلوده صورت گرفت.

مهار زیستی بیماری پاخوره گندم توسط قارچ‌های اندفیت در شرایط گلخانه

به منظور بررسی تاثیر اندوفیت‌های قارچی روی بیماری پاخوره گندم، ابتدا گلدان‌های یک لیتری با مخلوط خاک سترون (خاک–ماسه–کود: ۲:۱:۱ وزنی) پر شدند. سپس زادمایه قارچ بیمارگر و اندوفیت‌های قارچی به‌ترتیب به نسبت دو و چهار درصد وزنی به خاک گلدانها اضافه گردید (Gholami *et al*., 2019). بعد از آن بذر گندم رقم پیشتاز توسط محلول هیپوکلرید سدیم ۵٪ به مدت یک دقیقه ضدعفونی و پس از شستشو با آب مقطر سترون در داخل گلدانها کشت گردید. در هر گلدان پنج عدد بذر کشت و برای هر تیمار سه تکرار (گلدان) در نظر گرفته شد. تیمارها شامل: شاهد منفی (بذر گندم اتوکلاو شده بدون زادمایه قارچ بیمارگر)، شاهد مثبت (قارچ بیمارگر)، تیمار قارچ‌های اندوفیت به تنهایی، تیمار قارچ‌های اندوفیت بعلاوه قارچ بیمارگر و تیمار قارچکش‌های تبوکونازول و دیفنوکونازول بود. قارچکش‌های تبوکونازول و دیفنوکونازول به صورت جامد و به ترتیب به نسبت ۱/۵ در هزار و ۲ در هزار و به میزان ۴۵ میلی گرم و ۶۰ میلی گرم به ۳۰ گرم خاک گلدان حاوی زادمایه قارچ بیمارگر اضافه و مخلوط شد. سرانجام بعد از پنج هفته میزان شدت بیماری پاخوره گندم اندازه گیری شد (Weller and Cook, 1983) و شاخص‌های رشد گیاه مثل ارتفاع بوته (بر حسب سانتیمتر)، طول ریشه (بر حسب سانتیمتر)، وزن تر ریشه و وزن تر ساقه (بر حسب گرم) اندازه گیری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر تیمار انجام گردید. در آزمون‌های گلخانه‌ای هر تکرار (گلدان) حاوی پنج واحد آزمایشی یا بوته بود. داده‌های کمی مربوط به هر آزمون توسط نرم افزار SAS (Version 8.2; SAS

Institute, Cary, NC, USA, 2013) تجزیه و تحلیل شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح $P\leq0.05$ انجام شد. (Little and Hills, 1978).

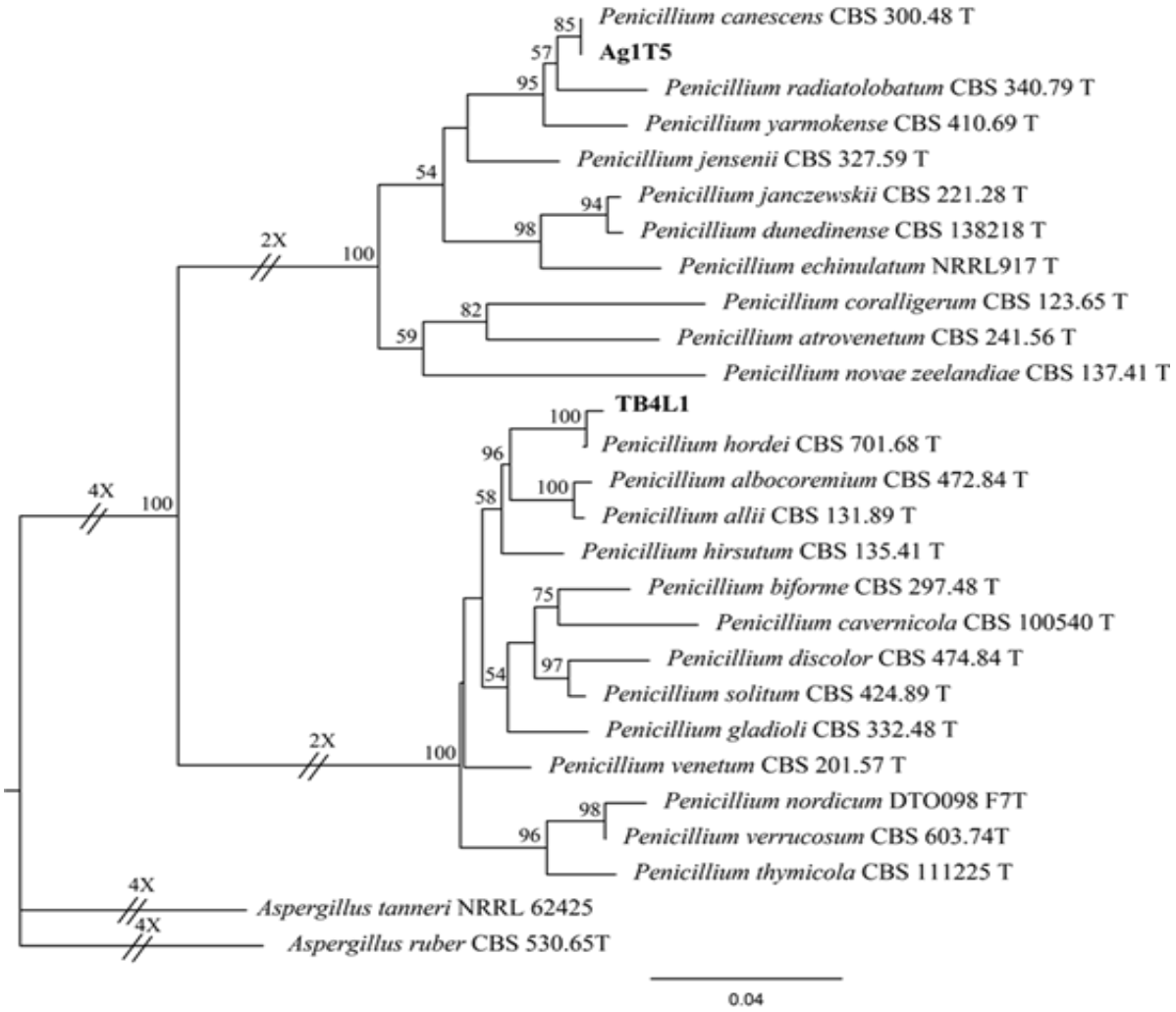
یافته های پژوهش

بیماریزایی قارچ بیمارگر(GenBank accession number: MH488732)

بعد از یک ماه از کاشت بذر در گلدان‌های آلوده به قارچ بیمارگر، علائم بیماری به صورت سیاه شدگی ریشه، طوقه و قسمت‌های پایین ساقه نمایان شد. علاوه بر این، بوته‌های بیمار نسبت به تیمار شاهد کوتوله، زرد و رنگ پریده بودند.

شناسایی اندوفیت های قارچی

توالی‌های مربوط به ناحیه *CaM* (کالمودولین) ۲۳ جدایه نماینده جنس *Penicillium* به همراه توالی جدایه‌های TB4L1 و Ag1T5 مطالعه شده در این تحقیق هم‌ردیف شدند. بخش‌های ابتدائی و انتهایی که در بعضی توالی‌ها وجود نداشتند از آنالیزها حذف شدند. تعداد کل صفات استفاده شده در آنالیزهای فیلوژنتیکی به علاوه گپ‌ها ۴۰۷ عدد بود. آنالیزها با روش NJ انجام شد. دو جدایه متعلق به گونه‌های *Aspergillus tanneri* و *Aspergillus ruber* به عنوان گروه خارجی در نظر گرفته شدند (شکل ۱). بر اساس نتایج حاصل جدایه TB4L1 در کنار *Penicillium hordei* با کد دسترسی MT093679 در بانک ژن و جدایه Ag1T5 در کنار *Penicillium canescens* با کد دسترسی MT104568 در بانک ژن قرار گرفت.

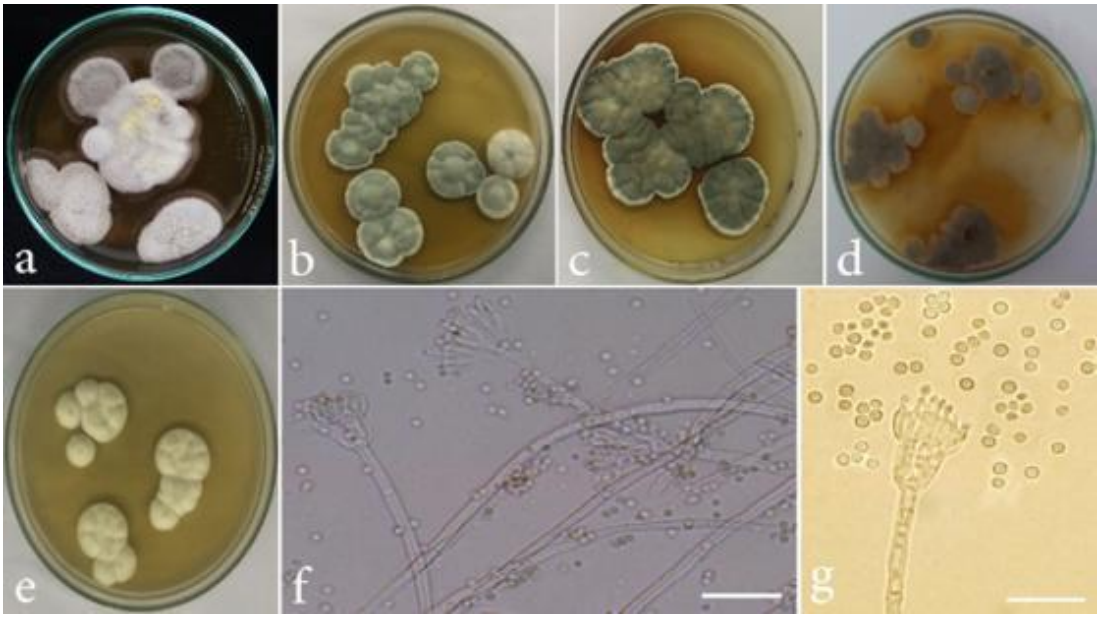


شکل ۱. درخت فیلوژنتیکی بدست آمده بر اساس توالی ناحیه CaM متعلق به جنس *Penicillium* با روش neighbor-joining (NJ). اعداد بالای هر شاخه مقادیر اعتبارسنجی مربوط به آنالیز (NJ) را نشان می‌دهد. دو جدایه متعلق به گونه‌های *Aspergillus tanneri* و *Aspergillus ruber* به‌عنوان outgroup و ۲۵ جدایه به‌عنوان ingroup در نظر گرفته شدند.

ریخت شناسی گونه Penicillium canescens Ag1T5

قطر پرگنه قارچ روی محیط کشت CZA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از هفت روز ۴/۲ سانتی‌متر بود. رنگ سطح پرگنه خاکستری تا سفید و رنگ پشت پرگنه قهوه‌ای تیره دیده می‌شد. قطر پرگنه قارچ بر روی محیط کشت CYA پس از هفت روز به ۴/۵ سانتی‌متر رسید. سطح پرگنه قارچ ابتدا سفید تا خاکستری با بافت پنبه‌ای و رنگ پشت پرگنه قهوه‌ای تیره دیده می‌شد. رنگ سطح پرگنه قارچ روی محیط YES خاکستری و به صورت دوائر متحدالمرکز رشد کرده و پشت پرگنه قارچ نیز به‌رنگ قهوه‌ای تیره دیده می‌شد. قطر پرگنه پس از هفت روز به ۵ سانتی‌متر رسیده بود. روی محیط OA قطر پرگنه پس از هفت روز به ۴/۲ سانتی‌متر رسیده بود. سطح پرگنه به‌رنگ خاکستری روشن و پشت پرگنه به‌رنگ زرد تا قهوه‌ای روشن و صاف بود. قطر پرگنه قارچ روی محیط غذایی MEA پس از هفت روز به ۴ سانتی‌متر رسید. رنگ سطح پرگنه ابتدا سفید و سپس به رنگ خاکستری درآمده و به صورت دوائر متحدالمرکز دیده می‌شد. رنگ پشت پرگنه در ابتدا کرم و سپس به رنگ قهوه‌ای تیره و به صورت دوائر متحدالمرکز مشاهده می‌شد (شکل ۲).

مشخصات میکروسکوپی عبارت بودند از کنیدیوفورهای روشن و اغلب از نوع Biverticillat، فیالیدها شمعی یا آمپولی شکل، صاف تا زبر و با ابعاد ۳–۲×۹/۵–۶ میکرومتر، متولا استوانه‌ای، زبر و با ابعاد ۳/۲–۱/۶×۱۰/۴–۴/۶ میکرومتر،کنیدی‌ها نیمه کروی تا کروی، دارای دیواره زبر و ناهموار، قهوه‌ای روشن و به ابعاد ۳/۶–۱/۶×۲/۴–۱/۵ میکرومتر بود (شکل ۲). مشخصات میکروسکوپی جدایه Ag1T5 با گونه *P. canescens* مطابقت داشت(Samson, 2004; Visagie et al., 2014 & Frisvad).



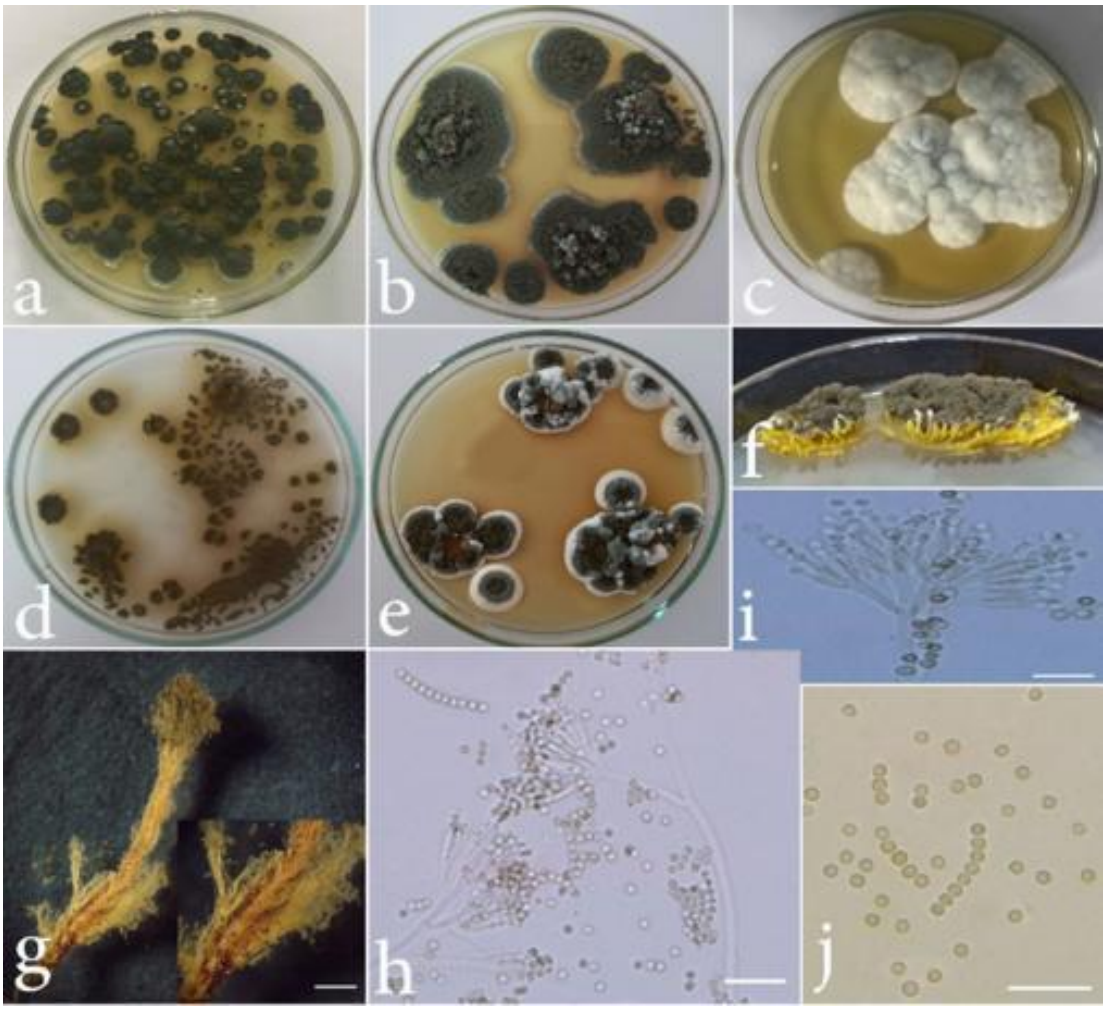
شکل ۲. ویژگی‌های ریختی گونه *P. canescens*. a، b، c، d و e شکل پرگنه قارچ روی محیط کشت‌های CZA، CYA، YES، OA و MEA. f و g کنیدیوفور و کنیدی قارچ. مقیاس‌ها ۱۰ میکرومتر.

ریخت شناسی گونه TB4L1 *Penicillium hordei*

قطر پرگنه قارچ روی محیط غذایی CZA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از هفت روز ۶/۲ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. سطح پرگنه قارچ به‌رنگ خاکستری و پشت پرگنه به‌رنگ زرد تا قهوه‌ای کم‌رنگ دیده شد. قطر پرگنه قارچ روی محیط غذایی CYA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از هفت روز ۵/۴ سانتی‌متر بود. شکل رویی پرگنه به صورت دوایرمتحدالمرکز به رنگ خاکستری تیره با حاشیه سفید و پشت آن به‌رنگ زرد تا قهوه‌ای همراه با شیارهای شعاعی مشاهده شد. سطح رویی پرگنه قارچ روی محیط YES در ابتدا سفید و سپس خاکستری و رنگ پشت پرگنه زرد بود. قطر پرگنه قارچ روی محیط غذایی OA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از هفت روز به ۵/۴ سانتی‌متر رسید. روی محیط OA قطر پرگنه قارچ در دمای ۲۵ درجه سلسیوس پس از هفت روز به ۴ سانتی‌متر رسید. رنگ سطح رویی پرگنه قارچ به‌رنگ خاکستری تیره با ترشح متابولیت‌های زرد رنگ و پشت آن به‌رنگ زرد و صاف دیده شد. قطر پرگنه قارچ روی محیط غذایی MEA پس از ۷ روز ۷/۴ سانتی متر و سطح رویی پرگنه قارچ خاکستری و رنگ پشت پرگنه قهوه‌ای بود (شکل ۳).

مشخصات میکروسکوپی شامل کنیدیوفورها روشن و جارویی شکل و از نوع Terverticillate هستند. راموس استوانه ای و با ابعاد ۴–۲/۳ ×۲۷–۱۶میکرومتر، متولا استوانه‌ای و با ابعاد ۳–۲/۳×۷–۵/۱۰ میکرومتر، فیالیدها شمعی استوانه‌ای و با ابعاد ۲/۵–۲×۷–۱۰ میکرومتر هستند. کنیدی‌ها دارای دیواره زبر و ناهموار، کروی تا نیمه کروی و به ابعاد ۳–۱/۶×۲/۸–۱/۲

میکرومتر و به صورت زنجیری روی فیالیدها قرار دارند (شکل ۳). مشخصات میکروسکوپی جدایه TB4L1 با گونه *P. hordei* مطابقت داشت(Frisvad & Samson, 2004; Visagie et al., 2014).



شکل ۳. – ویژگی‌های ریختی گونه *P. hordei*. شکل a، b، c، d و e بترتیب پرگنه قارچ روی محیط کشت‌های CZA، CYA، YES، OA و MEA . شکل f و g ساختارهای ایستاده روی محیط کشت و ترشحات روی آن. شکل h و i کنیدیوفور وکنیدی، شکل j، کنیدی قارچ. مقیاس‌ها: h، ۲۰ میکرومتر؛ i و j، ۱۰ میکرومتر؛ g، ۲ میلی‌متر.

تاثیر جدایه های قارچ اندوفیت روی رشد پرگنه قارچ *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*

نتایج تاثیر دو اندوفیت قارچی *P. canescens* و *P. hordei* در روش کشت متقابل بعد از هفت روز نشان داد که دو قارچ اندوفیت بترتیب قادر هستند رشد پرگنه قارچ بیمارگر را به میزان ۵۲/۶۵ و ۷۰/۶۹ درصد در مقایسه با تیمار شاهد کاهش دهند. متابولیت خارج سلولی (ترکیبات غیر فرار) هر دو قارچ *P. canescens* Ag1T5 و *P. hordei* TB4L1 نیز توانستند رشد پرگنه قارچ بیمارگر را بترتیب به میزان ۳۸/۱۱ و ۲۹/۴۴ درصد کاهش دهند. اما ترکیبات فرار دو اندوفیت قارچی تاثیر زیادی در مقایسه با تیمار شاهد روی رشد پرگنه قارچ نداشتند و فقط توانستند ۱۰/۳۳–۲/۱۰ درصد رشد پرگنه قارچ *Ggt* را کاهش دهند (جدول ۱).

جدول ۱. تاثیر دو قارچ اندوفیت *P. canescens* Ag1T5 و *P. hordei* TB4L1 روی رشد پرگنه قارچ بیمارگر (*Ggt*) در شرایط آزمایشگاه بعد از ۷ روز

تیمارها	روش کشت متقابل		متابولیت فرار		متابولیت خارج سلولی	
	قطر پرگنه قارچ (cm)	بازدارندگی (٪)	قطر پرگنه قارچ (cm)	بازدارندگی (٪)	قطر پرگنه قارچ (cm)	بازدارندگی (٪)
Control (pathogen alone)	8.87 a ± 0.13	-	9.00 a ± 0.14	-	9.00 a ± 0.00	-
P. canescens Ag1T5	4.20 b ± 0.30	52.65	8.07 b ± 0.09	10.33	5.57 c ± 0.13	38.11
P. hordei TB4L1	2.60 c ± 0.11	70.69	8.75 a 0.00	2.07	6.35 b ± 0.07	29.44

داده ها میانگین ± خطای استاندارد هستند. میانگین های دارای حروف مشترک در هر ستون اختلاف معنی داری با هم ندارند. گروه بندی جدایه بر اساس آزمون دانکن می‌باشد($P\leq0.05$). آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار برای هر تیمار انجام شد.

توانایی تولید آنزیمها، متابولیت های ضد قارچی و ترکیبات محرک رشد گیاهان

توانایی تولید آنزیم‌ها، ترکیبات ضد قارچی و ترکیبات محرک رشد گیاهان توسط دو اندفیت قارچی در جدول ۲ آورده شده است. هر دو جدایه قارچ اندوفیت توانستند که تولید سیدروفور، سلولاز، کیتیناز نمایند. ولی هیچ کدام قادر به تولید سیانید هیدروژن نبوده و توانایی حلالیت فسفات را نیز نداشتند. قارچ *P. hordei* TB4L1 بر خلاف قارچ *P. canescens* Ag1T5 قادر به تولید پکتیناز بود. برعکس *P. canescens* Ag1T5 برخلاف *P. hordei* TB4L1 توانست پروتئاز تولید کند. علاوه براین، هر دو قارچ اندوفیت قادر به تولید هورمون اندول استیک اسید (اکسین) و جیبرلین بودند (جدول ۲).

جدول ۲. توانایی تولید آنزیم‌ها و ترکیبات ضدقارچی و ترکیبات محرک رشد گیاهان توسط دو قارچ اندوفیت *P. canescens* Ag1T5 و *P. hordei* TB4L1

اندوفیت های قارچی	پروتئاز	کیتیناز	پکتیناز	سلولاز	سیدروفور	سیانید هیدروژن	حلالیت فسفات	IAA (µg/mL)	جیبرلین (µg/mL)
P. canescens Ag1T5	+	++++	-	+++	+	-	-	2.09	28.85
P. hordei TB4L1	-	++	++++	+++	+	-	-	1.57	29.91

*تولید خیلی کم (+)، تولید کم (++)، تولید زیاد (+++)، و تولید خیلی زیاد (++++)

تاثیر سویه‌های قارچ اندوفیت روی شدت بیماری پاخوره گندم

تاثیر دو سویه قارچ اندوفیت روی بیماری پاخوره گندم در شرایط گلخانه نشان داد که هر دو سویه قارچ اندوفیت قادر به کاهش شدت بیماری پاخوره گندم هستند. دو سویه قارچ اندوفیت *P. canescens* و *P. hordei* بترتیب توانستند شدت بیماری پاخوره گندم را به میزان ۸۳/۵۷ و ۳۸/۷۴ درصد در مقایسه با تیمار شاهد آلوده کاهش دهند. همچنین دو قارچکش تبوکونازول و دیفنوکونازول به میزان صد درصد بیماری را کنترل کردند (جدول ۳).

جدول ۳. تاثیر دو قارچ *P. canescens* Ag1T5 و *P. hordei* TB4L1 روی شدت بیماری پاخوره گندم در شرایط گلخانه بعد از ۳۵ روز

تیمارها	شدت بیماری	کارایی (٪)
Uninfected control	0.00 d ± 0.00	-
Control pathogen	4.93 a ± 0.04	-
P. canescens	0.00 d ± 0.00	-
P. hordei	0.00 d ± 0.00	-
P. canescens + Ggt	0.81 c ± 0.09	83.57
P. hordei + Ggt	3.02 b ± 0.09	38.74
Teboconazole + Ggt	0.00 d ± 0.00	-
Difenoconazole + Ggt	0.00 d ± 0.00	-

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 تیمارهاست.

تاثیر سویه‌های قارچ اندوفیت روی فاکتورهای رشدی گیاه گندم

نتایج تاثیر سویه‌های اندوفیت روی فاکتورهای رشدی گیاه گندم نشان داد که هر دو سویه قادر به بهبود و افزایش شاخص‌های رشدی گیاه گندم بودند. هر دو سویه سبب افزایش طول ریشه (۵–۲ برابر)، طول ساقه (۲/۲–۱/۸ برابر)، وزن تر ریشه (۱۵–۴/۶ برابر) و وزن تر ساقه (۲۶–۷ برابر) در حضور قارچ بیمارگر در مقایسه با شاهد آلوده شدند. همچنین دو جدایه قارچ اندوفیت به تنهایی و بدون حضور قارچ بیمارگر سبب افزایش شاخص های رشدی گیاه گندم در مقایسه با تیمار کنترل بیمارگر شدند. سویه *P. canescens* Ag1T5 نسبت به سویه *P. hordei* TB4L1 فاکتورهای رشدی گیاه گندم را به میزان بیشتری در مقایسه با شاهد آلوده توانست افزایش دهد. بعلاوه دو قارچکش تبوکونازول و دیفنوکونازول شاخص های رشدی گیاه گندم (بجز وزن تر ریشه) در مقایسه با تیمار شاهد سالم حفظ کردند (جدول ۴).

جدول ٤. تاثیر دو قارچ *P. canescens* Ag1T5 و *P. hordei* TB4L1 به‌تنهایی و همراه قارچ بیمارگر روی فاکتورهای رشدی گیاه گندم در شرایط گلخانه بعد از ۳۵ روز

تیمارها	طول ریشه (cm)	طول ساقه (cm)	وزن تر ریشه (گرم)	وزن تر ساقه (گرم)
Control water	15.95 ± 0.68 b	38.58 ± ±0.61 b	0.058 ± 0.001 b	0.490 ± 0.010 b
Control pathogen	2.48 ± 0.06 e	17.41 ± 0.97 e	0.003 ± 0.001 f	0.018 ± 0.003 d
P. canescens	17.82 ± 0.48 a	41.76 ± 0.30 a	0.082 ± 0.006 a	0.645 ± 0.020 b
P. canescens + Ggt	12.64 ± 0.42 c	32.30 ± 1.50 c	0.045 ± 0.001 d	b٠0.468 ± 0.18
P. hordei	15.59 ± 0.51 b	39.04 ± 0.81 ab	0.054 ± 0.003 bc	0.487 ± 0.020 b
P. hordei + Ggt	5.27 ± 0.10 d	26.21 ± 1.25 d	0.014 ± 0.002 e	0.133 ± 0.160 c
+ Ggt Teboconazole	15.41 ± 0.96 b	37.72 ± 1.06 b	0.052 ± 0.001 c	0.487 ± 0.014 b
Difenoconazole + Ggt	15.56 ± 0.82 b	39.05 ± 0.66 ab	0.053 ± 0.001 c	0.497 ± 0.017 b

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 تیماره است.

بحث

بیماری پاخوره گندم یکی از مهمترین بیماریهای خاکزاد گندم است که سبب پوسیدگی ریشه، طوقه و قسمت های پایین ساقه گندم می‌شود (Cook, 2003). سویه قارچ بیمارگر (*Ggt*) قبلا از گیاه گندم در شهرستان کامیاران جداسازی گردید و بر اساس ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی گردید (Gholami *et al*., 2019). بیماریزایی سویه قارچ بیمارگر روی گیاه گندم رقم پیشتاز اثبات گردید. بعد از یک ماه علایم بیماری به صورت سیاه شدگی ریشه، طوقه و قسمت‌های پایین ساقه ظاهر گردید و بوته‌های بیمار نسبت به تیمار شاهد کوتوله، زرد و رنگ پریده شدند (Sattary *et al*., 2020; Gholami *et al*., 2019). این قارچ علاوه بر گندم به سایر گیاهان خانواده گرامینه از جمله جو و چاودار نیز خسارت وارد می‌کند. البته حساسیت گیاهان خانواده گرامینه در مقابل این بیماری متفاوت است. بیشترین حساسیت را گندم و جو به این بیماری دارند، درصورتیکه چاودار به صورت نسبی در مقابل بیماری پاخوره گندم مقاوم است (Gutteridge et al., 2003; Bithell *et al*., 2011). کنترل شیمیایی بیماری پاخوره گندم توسط قارچکش‌ها و کاربرد آنها در خاک مشکلات زیست محیطی بدنبال داشته و سبب تجمع ترکیبات سمی در خاک می‌شود (Rojo et al., 2007). کاربرد مکرر قارچکش‌ها سبب بروز مقاومت در عوامل بیمارگر شده و کارایی قارچکش‌ها را کاهش می‌دهد (Sanssene *et al*., 2011; Selim *et al*., 2014). سایر روش‌های زراعی از قبیل تناوب، استفاده از ارقام مقاوم و غیره نیز به اندازه کافی کارایی ندارند (Liu *et al*., 2009). بنابر این، کاربرد عوامل بیوکنترل، بخصوص قارچ‌های اندوفیت در مدیریت این بیماری به عنوان جایگزین روش‌های مذکور می‌تواند موثرتر و سازگاری بیشتری با محیطزیست داشته باشد (Gholami *et al*., 2019). تحقیقات زیادی از نقش و توانایی اندوفیت‌های قارچی به‌عنوان عوامل بیوکنترل در مدیریت بیماریهای خاکزاد گیاهان در میزبانهای مختلف گیاهی انجام و گزارش شده است (Liu *et al*., 2009; Sun *et al*., 2025; Yuan *et al*., 2021; Samain *et al*., 2017). در این مطالعه، دو سویه قارچ اندوفیت *P. canescens* و *P. hordei* از گیاهان خانواده غلات به عنوان اندوفیت جداسازی و توانایی آنها در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

بر علیه بیماری پاخوره گندم بررسی شد. اندوفیت‌ها به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک در بافت‌های مختلف گیاهان مستقر هستند و نقش بسیار حیاتی در سلامت گیاه دارند و به‌عنوان عوامل بیوکنترل از گیاهان در مقابل عوامل بیماریزا محافظت می‌کنند (Zhang *et al*., 2014; Xiang *et al*., 2016). دو سویه بر اساس خصوصیات ریخت شناسی و مولکولی به عنوان *P. canescens* و *P. hordei* شناسایی شدند. هر دو سویه در شرایط آزمایشگاه و گلخانه به‌ترتیب سبب کاهش رشد پرگنه قارچ *Ggt* و شدت بیماری پاخوره گندم شدند. نتایج تاثیر دو سویه قارچ اندوفیت روی کاهش فعالیت قارچ پاخوره گندم (*Ggt*) در شرایط گلخانه بیشتر از آزمایشگاه بود. این نتایج ممکن است ناشی از استقرار و تکثیر اندوفیت‌های قارچی در ریشه گیاه گندم و بعد از آن تولید ترکیبات ضدقارچی مثل سیدروفور، سلولاز و کیتیناز (هر دو قارچ اندوفیت)، پروتئاز (*P. canescens* Ag1T5) و پکتیناز (*P. hordei* TB4L1) باشد (Gholami *et al*., 2019; Ahmadzadeh and Sharifi Tehrani, 2009). قارچ اندوفیت *P. canescens* Ag1T5 در شرایط گلخانه تاثیر بیشتری روی کاهش فعالیت قارچ بیمارگر نسبت سویه دوم داشت که احتمالاً به این دلیل است که آنزیم‌ها و ترکیبات ضدقارچی تولید شده توسط اندوفیت قارچی ممکن است در شرایط طبیعی خاک سبب غیر فعال کردن تاثیر قارچ بیمارگر شده و در کنترل زیستی این عامل بیماریزا در خاک نقش بیشتری داشته باشند. از طرفی قارچ اندوفیت *P. hordei* TB4L1 در شرایط گلخانه (۳۸/۷۴ درصد) تاثیر کمتری روی قارچ بیمارگر نسبت به شرایط آزمایشگاه (۷۰/۶۹ درصد) داشت. این نتایج نشان می‌دهد که رابطه مستقیمی میان فعالیت و عملکرد قارچهای اندوفیت در شرایط آزمایشگاه و گلخانه ممکن است وجود نداشته باشد (Elsherif and Grossman, 1994; Weller and Cook, 1983; Gholami *et al*., 2019). همچنین تحقیقات نشان داده که شرایط داخل خاک از قبیل دما، رطوبت، اسیدیته و بافت خاک ممکن است روی عملکرد عوامل بیوکنترل تاثیر بگذارد و در نتیجه عوامل مختلف بیوکنترل ممکن است در شرایط مختلف، متفاوت عمل بکنند (Huang and Erickson, 2008). نتایج به دست آمده در این تحقیق با نتایج پژوهش‌های انجام شده توسط محققین دیگر مطابقت داشت (Wen *et al*., 2024; Sun *et al*., 2025; Gholami *et al*., 2019; Mohamadpoor *et al*., 2022; Alijani *et al*., 2022).

هر دو سویه قارچ اندوفیت قادر به تولید سیدروفور بودند. عوال بیوکنترل با تولید سیدروفور می‌توانند آهن مورد نیاز قارچ بیمارگر را جذب کرده و به مصرف خود برسانند و آن را از دایره رقابت حذف نمایند (Alijani *et al*., 2020, 2021; Mohamadpoor *et al*., 2019; Gholami *et al*., 2019). همچنین تولید ترکیبات خارج سلولی مثل پروتئاز و پکتیناز توسط قارچ اندوفیت سبب کاهش رشد پرگنه قارچ بیمارگر، ممانعت از جوانه زنی اسپور آن و کاهش شدت بیماری در شرایط گلخانه می‌گردد (Alijani *et al*., 2021; Mohamadpoor *et al*., 2022; Stein, 2005; Singh *et al*., 2008). این آنزیم‌ها قادرند که دیواره سلولی قارچ بیمارگر را تجزیه کنند و نقش بسیار مهمی در ممانعت از آلودگی گیاه توسط عوامل بیمارگر بازی کنند (Xu *et al*., 2021; Haggag *et al*., 2006; Karimi *et al*., 2017). قارچهای *Trichoderma harzianum* و *T. viride* به‌عنوان عوامل آنتاگونیست طی مکانیسم پارازیتیسم و رشد و پیشروی روی هیف‌های قارچ عامل بیماری پاخوره گندم مانع رشد پرگنه قارچ شده و بتدریج شروع به پیشروی، کلنیزاسیون و اسپورزایی روی هیف‌های قارچ *Ggt* میکنند (Kianivafa *et al*., 2021). مکانیسم کنترل زیستی بیماری پاخوره گندم ممکن است ترکیبی از روش‌های مختلف مثل رقابت، آنتی بیوز و تحریک مقاومت گیاه در مقابل بیمارگر باشد (Mendez *et al*., 2021; Xu *et al*., 2021; Wipat and Harwood, 1999; Alijani *et al*., 2019). از طرفی ترکیبات خارج سلولی سویه *P. canescens* Ag1T5 نسبت به سویه *P. hordei* TB4L1 رشد پرگنه قارچ بیمارگر را در شرایط آزمایشگاه به میزان بیشتری کاهش داد و این نتایج با یافته‌های گلخانه مطابقت داشت (Gholami *et al*., 2019). سویه اندوفیت *C. urticicola* M2 از گیاه گندم سالم جداسازی گردید و رشد پرگنه قارچ *Ggt* در شرایط آزمایشگاه کاهش داد و شدت بیماری پاخوره گندم را به میزان قابل توجهی در مقایسه با تیمار شاهد کاهش داد و توانست در اندامهای ریشه و طوق گندم مستقر گردد (Gholami *et al*., 2019). باکتری اندوفیت *Bacillus subtilis* و گونه‌های اکتینومیست از جنس‌های مثل *Streptomyces*، *Microsbispora* و *Nocardioides* قادر

هستند رشد پرگنه قارچ *Ggt* و شدت بیماری پاخوره گندم را در آزمایشگاه و گلخانه کاهش دهند (Khezri, 2017; Liu *et al*., 2009; Coombs *et al*., 2004). علاوه بر این، هر دو سویه قارچ اندوفیت تولید فیتوهورمون جیبرلین و اکسین کردند که نقش مهمی در تحریک و رشد گیاه گندم و افزایش بیوماس آن داشتند. تولید فیتوهورمون جیبرلین توسط قارچ *Penicillium citrinum* در گیاه برنج و *Artiplex gemelinii* سبب جوانه‌زنی بذر برنج و بهبود رشد آن گردید (Khan *et al*., 2008; Xu *et al*., 2021). تولید ترکیبات فیتوهورمون توسط عوامل بیوکنترل سبب تحریک رشد گیاهان می‌شود و تحمل گیاهان را در مقابل تنش‌های زیستی و غیر زیستی افزایش داده و گیاهان را در مقابل عوامل بیماریزا محافظت می‌کنند (Gonzalez Lamothe *et al*., 2012; Mohamadpoor *et al*., 2022). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که سویه قارچ اندوفیت *P. canescens* Ag1T5 می‌تواند به‌عنوان عوامل آنتاگونیست مؤثر و در قالب کودهای زیستی در مدیریت بیماری پاخوره گندم و افزایش عملکرد محصول مورد استفاده قرار گیرند.

نتیجه گیری و پیشنهادات

نتایج این تحقیق نشان داد که سویه قارچ اندوفیت *P. canescens* Ag1T5 به عنوان عوامل کنترل زیستی توانست رشد پرگنه قارچ بیمارگر و شدت بیماری پاخوره گندم ناشی از قارچ *Ggt* را به صورت قابل توجهی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه کاهش دهد. مکانیسم عمل دو سویه قارچ اندوفیت ممکن است ترکیبی از روشهای مختلف مثل کلونیزه کردن بافت های داخلی ریشه گندم، رقابت بر سر مواد غذایی، آنتی بیوز و تولید ترکیبات خارج سلولی و تولید فیتوهورمون‌هایی مثل اکسین و جیبرلین جهت تحریک رشد گیاه گندم باشد. بر اساس دانش ما، این اولین گزارش از تاثیر *P. canescens* Ag1T5 روی قارچ *Ggt* عامل بیماری پاخوره گندم در شرایط آزمایشگاه و یا گلخانه است. لذا با توجه به اهمیت کشت گندم در استان کردستان و ناکارمد بودن روش‌های سنتی و نبود اراقام مقاوم گندم در مقابل این بیماری، بررسی و انجام روش‌های جایگزین مثل کنترل زیستی این بیماری جهت تجاری سازی و استفاده عملی از این عوامل زیستی در قالب کودهای زیستی لازم و انجام مطالعات تکمیلی در شرایط مزرعه ضروری است.

سپاسگزاری

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

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافعی بین نویسندگان وجود ندارد

REFERENCES

Agrawal, T., & Kotasthane, A.S. (2012). Chitinolytic assay of indigenous *Trichoderma* isolates collected from different geographical locations of Chhattisgarh in Central India. *Springerplus*, 1 (1), 73. http://www.springerplus.com/content/1/1/73

Ahmadzadeh, M., & Sharifi Tehrani, A. (2009). Evaluation of fluorescent Pseudomonas for plant growth promotion, antifungal activity against *Rhizoctonia solani* on common bean, and biocontrol potential. *Biological Control*, 48, 101–107. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.10.012

Alijani, Z., Amini, J., Ashengroph, M., & Bahramnejad, B. (2019). Antifungal activity of volatile compounds produced by *Staphylococcus sciuri* strain MarR44 and its potential for the biocontrol of *Colletotrichum nymphaeae* causal agent strawberry anthracnose. *International Journal of Food Microbiology*, 307, 108276. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108276

Alijani, Z., Amini, J., Ashengroph, M., & Bahramnejad, B. (2021). Microbial detoxification of toxin and antifungal activity of several endophytic bacterial strains against *Colletotrichum nymphaeae* causal agent of strawberry anthracnose. *Biological control*, 164, 104776, https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104776

Alijani, Z., Amini, J., Karimi, K., & Ilaria, P. (2022). Characterization of the mechanism of action of *serratia rubidaea* Mar61-01 against Botrytis cinerea in strawberries. *Plants*, 12, 154. https://doi.org/10.3390/plants12010154

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. https://doi.org/10.1007/bf00709654

Arnol, A.E., Mejia, L.C., Kyllo, D., Rojas, E.I., Maynard, Z., Robbins, N., & Herre, E.A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proc. Natl. Acad. Sci*. U.S.A. 100, 15649-15654. DOI:10.1073/pnas.2533483100

Asher, M.J.C., & Shipton, P.J. (1981). Biology and Control of Take-all. *Academic Press*. London, UK. ISBN 10: 0120653206 / ISBN 13: 9780120653201

Barka, E. A., Gogies, S., Nowak, J., Audran, J.C., & Belarbi, A. (2002). Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. *Biological control*, 24, 135-142. DOI:10.1016/S1049-9644(02)00034-8

Bailey, D.J., & Gilligan, C.A. (1999). Dynamics and primary and secondary infection in take-all epidemics. *Phytopathology*, 89, 84-91. DOI: 10.1094/phyto.1999.89.1.84

Bithell, S.L., Butler, R.C., Haeeow, S., McKay, A., & Cromey, M.G. (2011). Susceptibility to take-all of cereal and grass species, and their effects on pathogen inoculum. *Annals Applied Biology*, 159, 252-266. https:// doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00493.x.

Busby, P.E., Ridout, M., & Newcombe, G. (2016). Fungal endophytes modifiers of plant disease. *Plant Molecular and Biology*, 90, 645-655. DOI: 0.1007/s11103-015-0412-0

Carrol, C. (1988). Fungal endophytes in stems and leaves-from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology*, 69, 2-9. https://doi.org/10.2307/1943154

Cheong, S.L., Cheow, Y.L., & Ting, A.S.Y. (2017). Characterizing antagonistic activities and host compatibility (via simple endophyte-calli test) of endophytes as biocontrol agents of *Canoderma boninense*. *Biological control*, 105, 86-92. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2016.12.002

Cook, R.J. (1994). Problems and progress in the biological control of wheat take-all. *Plant pathology*, 43, 429-437. https:// doi.org/10.1111/j.1365-3059.1994.tb01576.x

Cook, R.J. (2003). Take-all of wheat. Review. *Physiology and Molecular Plant pathology*, 62, 73-86. https://doi.org/10.1016/S0885-5765(03)00042-0

Cook, R., & Naiki, T. (1982). Virulence of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* from fields under short-term and long-term wheat cultivation in the Pacific Northwest, U.S.A. *Plant pathology*, 31, 201-207. doi:10.1094/ PHYTO-99-5-0472

Coombs, J.T., Michelsen, P.P., & Franco, C.M. (2004). Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological Control*. 29, 359–366. DOI:10.1016/j.biocontrol.2003.08.001

Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 363-369.

Deshmukh, S.K., Dufossé, L., Chhipa, H., Saxena, S., Mahajan, G.B. & Gupta, M.K. (2022). Endophytes: a potential source of antibacterial compounds. *Journal of Fungi*, 8, 164. DOI: 10.3390/jof8020164

Duffy, B.K., & Weller, D.M. (1995). Use of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* alone and in combination with fluorescent *Pseudomonas* spp. To suppress take-all of wheat. *Plant Disease*, 79, 907-911. DOI:10.1094/PD-79-0907

Elsherif, M., & Grossmann, F. (1994). Comparative investigation on the antagonistic activity of fluorescent pseudomonads against *Gaeumannomyxes graminis* var. *tritici* in vitro and *in vivo*. *Microbiology Research*, 149 (4), 371–377. https://doi.org/10.1016/S0944-5013(11)80084-4

Eziashi, E.L., Uma, N.U., Adekunle, A.A., & Ariede, C.E. (2006). Effect of metabolites produced by *Trichoderma* species against *Ceratocystis paradoxa* in culture medium. *Africa Journal of Biotechnology*, 5, 703–706. DOI: 10.4314/AJB.V519.42775

Frisvad, J.C. & Samson, R.A. (2004). Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and air-borne terverticillate Penicillia and their mycotoxins. *Studies in Mycology*, 49: 1–174.

Gao, F.K., Dai, C.C., & Liu, X.Z. (2001). Mechanisms of fungal endophytes in plant protection against pathogens. *Africa Journal of Microbiology Research*, 4, 1346-1351.

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 (1), 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. https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2018.12.012

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.

Guo, Z., Hua, R., Bai, Y., Wu, X., Cao, H., Li, X., Wu, X., & Tang, J. (2011). Screening and evaluation of antiphytopathogenic activity of endophytic fungi from live foliages of Ginkgo biloba L. *African journal of microbiology research*, 13, 1686–1690.

Gutteridge, R.J., Bateman, G.I., & Todd, A.D. (2003). Variation in the effects of take-all disease on grain yield and quality of winter cereals in field experiments. *Pest Management science*, 59, 215-224.

Haas, D., & Defago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathology by fluorescent pseudomonads. Nature *Reviews Microbiology*, 56, 1-13.

Haggag, W.M., Kansoh, A.L., & Aly, A.M. (2006). Proteases from Talaromyces flavus and *Trichoderma harzianum*: Purification, characterization and antifungal activity against brown spot disease on faba bean. *Plant Pathology. Bulletin*. 15, 231–239.

Hamid, N.B., Ben salem., & Hamid, M.M. (2018). Evaluation of the efficiency of *Trichoderma*, *Penicillium*, and *Aspergillus* species as biological control agents against four soil-born fungi of melon and watermelon. *Egyptian journal of biological control*, 28, 25. Doi:10.1186/s41938-017-0010-3

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

Huang, H.C., & Erickson, R.S., 2008. Factors affecting biological control of Sclerotinia sclerotiorum by fungal antagonists. *Journal of Phytopathology*, 156, 628–634.

Hong, S.B., Cho, H.S., Shin, H.D., Frisvad, J.C., & Samson, R.A. (2006). Novel Neosartorya species isolated from soil in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(2): 477-486.

Justin, T.C., Philip, P.M., & Christopherm M.M.F. (2004). Evaluation of endophytic actinobacteria as antagonists of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* in wheat. *Biological control*, 29, 359-366.

Karimi, K., Babai Ahari, A., Arzanlou, M., Amini, J., & Pertot, I. (2017). Comparison of in digamous *Trichoderma* spp. strains to a foreign commercial strain in terms of bio control efficacy against *Colletotrichum nymphaeae* and related biological features. *Journal of Plant Disease and Protectection*, 124, 453–466.

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.

Khan, S.A., Hamayun, M., Yoon, H., Kim, H.Y., Suh, S.J., Hwang, S.K., Kim, J.M., Lee, I. J., Choo, Y.S., & Yoon, U.H. (2008). Plant growth promotion and *Penicillium citrinum*. *BMC Microbiology*, 8, 231.

Khezri, M. (2017). Biological control of wheat take-all disease using some biofilm-forming *Bacillus subtilis* strains. *Journal of biocontrol in plant protection*, 1, 15-30. doi. 0.22092/BCPP.2017.116039 (In Persian)

Kianivafa, S., Bazgir, E & Darvisnia, M. (2021). Biological control of wheat take-all disease using *Trichoderma harzianum* and *T. viride*. Journal of *Applied Research in Plant Protection*, 10(3), 93-107. Doi.10.22034/ARPP.2021.13305 (In persian)

Kraus 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.

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.

Leong, D.U., & Gutterson, N. (1988). Characterization of antibiotic biosynthesis locus of *Pseudomonas fluorescent* strain HV37A. *Phytopathology*, 78, 1535.

Lirong Y., Xin Q., Baogue X., Paul, H. G., Shubing, L., Jinhui, W., Du, W., & Chao, W. (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.

Little, T.M., & Hills, F.J. (1978). Agricultural Experimentation Design and Analysis. *John Wiley and Sons*, New York, 350 pp.

Lirong, Y., Xiaoyun, H., Fan, Z., Paul, H.G., Yanyan, Y., Jia, L., & *et al*. (2018). Screening *Bacillus* species as biological control agents of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* on wheat. *Biological control*, 118, 1-9.

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 (3), 277–285.

Malinowski, D.P., Zuo, H., Beleski, D.P., & Alloush, G.A. (2004). Evidence for copper binding by extracellular root exudates of tall fescue but not parental ryegrass infected with *Neoryphodium*

spp. *Endophytes. Plant soil*, 267, 1-12.

Mendez, I., Fallard, A., Soto, I., Tortella, G., De La, M., & *et al*. (2021). Efficient Biocontrol of *Gaeumannomyces graminis var. tritici* in Wheat: Using Bacteria Isolated from Suppressive Soils. *Agronomy*, 11, 2008. https://doi.org/ 10.3390/agronomy11102008

Mohamadpoor, M., Amini, J., Ashengroph, M., & Azizi, A. (2022). Evaluation of biocontrol potential of *Achromobacter xylosoxidans* strain CTA8689 against common bean root rot. *Physiological and Molecular Payhology*, 117, 101769. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2022.101769

Mohamed, E., & Grossmann, F. (1994). Comparative investigations on the antagonistic activity of fluorescent pseudomonads against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici in vitro* and *in vivo*. *Microbiology research*, 149, 371-377.

Nilsson, H.E., & Smith, J.D. (1981). Take-all of grasses. In: Asher, M.J.C., Shipton, P.J. (Eds.), Biology and control of Take-all. *Academic Press*, London, pp. 433-448.

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.

Petrini, O. (1991). Fungal endophytes of tree leaves. In: Microbial Ecology of Leaves. *Springer-Verlag*. New York, p. 497.

Raeder, J., & Broda, P. (1985). Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Letters in Applied Microbiology*, 1, 17-20.

Rojo, F.G., Reynoso, M.M., Ferez, S., Chulze, S.N., & Torres, A.M. (2007). Biological control by *Trichoderma* species of *Fusarium solani* causing peanut brown root rot under field conditions. *Crop Protection*, 26 (4), 549–555.

Samain, E., Van Tuineu, D., Jeandet, Ph., Aussenac, Th., Selim, S. (2017). The plant growth-promoting rhizobacterium *Paenibacillus* sp. strain B2 stimulates wheat defense mechanism against septoria leaf blotch and root colonization by *Curtobacterium plantarum*. *Biological Control*, 114, 87–96.

Sanssene, J., Selim, S., Roisin-Fichter, C., Djerroud, L., Deweerb, C., Halam, P. (2011). Protective and curative efficacy of prothioconazole against isolates of *Mycosphaerella graminicola* differing in vitro sensitivity to DMI fungicides. *Pest Managment Science*, 67 (9), 1134–1140.

Sattary, M., Amini, J., & Hallaj, R. (2020). Antifungal activity of the lemongrass and clove oil encapsulated in mesoporous silica nanoparticles against wheat's take-all disease. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *170*: 104696. http:// doi.org/1001016/j.pestbp.2020.104696

Selim, S., Roisin-Fichter, C., Andry, J.B., Bogdanow, B., Sambou, R. (2014). Real-time PCR to study the effect of timing and persistence of fungicide application and wheat varietal resistance on *Mycosphaerella graminicola* and its sterol 14α-demethylation inhibitor-resistant genotypes. *Pest Management Sciemce*, 70 (1), 60–90.

Seri, E., Etebarian, H.R., Roustaei, A., & Aminian, H. (2006). Biological control of *Gaeumanomyces graminis var. tritici* on wheat with some isolates of *Pseudomonas fluorescent*. *Pakistan Journal of Biology sciences*, 9(7), 1205-1211.

Schiegel, M., Dubach, V., Buol, L.V., & Sieber, T.N. (2016). Effects of endophytic fungi on the ash dieback pathogen. *FEMS Microbiology and Ecology*, 92(1), 142-150.

Schwyn, Schwyn, B., & Neilands, J.B. (1987). Universal chemical assay for the detection and de termination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160 (1), 47–56.

Singh, N., Pandey., Dubet, R.C., & Matheshwari, D.K. (2008). Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* anf growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1669-1679.

Stein, T. (2005). *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. *Molecular and Microbiology*, 56(4), 845-857.

Sun, W., Shahrajabian, M.H., & Guan, L. (2025). The biocontrol and growth-promoting potential of *Penicillium* spp. and *Trichoderma* spp. in sustainable agriculture. *Plants*, 14, 2007. https://doi.org/10.3390/plants14132007

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), 1–9.

Swofford, D.L. (2002) PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods), *Version 4.0 Beta 10*. *Sinauer Associates*, Sunderland.

Swarthout, D., Harper, E., Judd, S., Gonthier, D., Shyne, R., Stowe, T., & Bultman, I. (2009). Measure of leaf-level water-use efficiency in drought stressed endophyte infected and non-infected tall fescue grasses. *Environ. Exp*. Bot, 66, 88-93.

Ting, 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.

Uthandi, Uthandi, S., Karthikeyan, S. & Sabarinathan, K.G. (2010). Gibberellic acid production by *Fusarium fuzikoroi* SG2. *Journal of scientific and industrial research*, 69, 211-214.

Vega, F.E., Posada, F., Aime, M.C., Pava-Ripoll, M., Infante, F., & Rehner, S.A. (2008). Entomopathogenic fungal endophytes. *Biological control*, 46, 72-82.

Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., *et al*. (2014). Identification and nomenclature of the genus Penicillium. *Studies in Mycology*, 78(1), 343-471. http://doi.org/10.1016/j.simyco.2014/09.001

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 (9): 10754–10773.

Weller, D.M., & Cook, R.J. (1983). Suppression of take-all of wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 73 (3), 463–469.

Wen, J., Okyere, S.K., Wang, S., Wang, J., Xie, L., Ran, Y., & et al. (2022). Endophytic fungi: an effective alternative source of plant- derived bioactive compounds for pharmacological studies. *Journal of Fungi*, 8, 205.

Wen, Y., Li, M., Yang, S., Peng, L., Fan, C., & Kang, H. (2024). Isolation of antagonistic endophytic fungi from postharvest Chestnuts and their biocontrol on host fungal pathogens. *Journal of Fungi*, 10, 573. https://doi.org/10.3390/jof10080573

Wipat, A., & Harwood, C.R. (1999). The *Bacillus subtilis* genome sequence. The molecular blueprint of a soil bacterium. *FEMS Microbiology and Ecology*, 28, (1), 1-9.

Wong, P.T.W. (1994). Biocontrol of wheat Take-all in the field using soil bacteria and fungi. Pp: 24-28. In: Rder, M.H., P.M. Stephens and G.P. Bowen (Eds.), Improving Plant productivity with Rhizosphere bacteria, *Adelaide, South Australia.*

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.

Xie J., Wu, Y.Y., Zhang, T.Y., Zhang, M.Y., Peng, F., Lin, B., & *et al*. (2018). New antimicrobial compounds produced by endophytic *Penicillium janthinellum* isolated from *Panax notoginseng* as potential inhibitors of FtsZ. *Fitoterapia*, 131, 35– 43.

Xu, W., Xu, L., Deng, X., Goodwin, P., Xia, M., *et al*. (2021). Biological control take-all and growth promotion in wheat by *Pseudomonas chlororaphis* YB-1. *Pathogens*, 10(7), 903. doi:10.3390/pathogens10070903

Yadav, A.N., Verma, P., Kumar, V., Sangwan, P., Mishra, S., Panjiar, N. *et al*. (2018) Chapter 1 – biodiversity of the genus *Penicillium* in different habitats. In: New and future developments in microbial biotechnology and bioengineering. *Amsterdam: Elsevier*, pp. 3– 18.

Youn-Sig, K., Robert, F.B., Patricia, A.O., Timothy, C.P., Linda, S.T., & David, M.W. (2012). Factors impacting the activity of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing *Pseudomonas fluorescens* against take-all of wheat. *Soil Biology & Biochemistry*, 54, 48-56.

Yuan, H., Shi, B., Huang, T., Zhou, Z., Wang, L., Hou, H., & Tu, H. (2021). Biological control of pear valsa canker caused by *Valsa pyri* using *Penicillium citrinum*. *Horticulturae*, 7, 198. http://doi.org/10.3390/horticulturae7070198

Yu, Y., Kang, Z., Buchenauer, H., & Huang, L. (2009). Purification and characterization of a novel extracellular ß-1, 3-glucanase complex (GluGgt) secreted by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *World Journal Microbiology and Biotechnology*, 25 (12), 2179–2186.

Zakira Naureen, Adam, H. Price., Fauzia. Y. Hafeez., & Michael. R. Roberts. (2009). Identification of rice blast disease suppressing bacterial strains from the rhizosphere of rice grown in Pakistan. *Crop Protection*, 28, 1052-1060.

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.