

بررسی اثر آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از ریشه جو بر بیمارگرهای *Pythium aphanidermatum* و *Gaeumannomyces graminis* با روش کشت متقابل

لیلا شادمانی^۱، صمد جمالی^{۲*} و اکرم فاطمی^۳

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد دانشگاه رازی ۲. استادیار قارچ‌شناسی دانشگاه رازی ۳. استادیار شیمی و حاصلخیزی خاک دانشگاه رازی
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۸/۰۳ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۳)

چکیده

قارچ‌های اندوفیت می‌توانند عوامل کنترل بیولوژیک کارآمدی باشند. در این پژوهش اثر آنتاگونیستی هفده جدایه اندوفیتی ریشه جو شامل (یک جدایه) *Alternaria alternata* (دو جدایه) *Microdochium bolleyi* (چهار جدایه) *Fusarium redolens* (یک جدایه) (یک جدایه) *F. moniliforme* (دو جدایه) *F. tricinctum* (یک جدایه) *Bipolaris zeicola* (یک جدایه) *Epicoecum nigrum* (یک جدایه) *Pythium Clonostachys rosea* (شش جدایه) و *Alternaria sp.* (یک جدایه) *Pleosporales sp.* علیه دو بیمارگر *Pythium aphanidermatum* و *Gaeumannomyces graminis* در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از بررسی تاثیر جدایه های قارچی اندوفیت بر *P. aphanidermatum* نشان داد که بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به *A. alternata* و *Alternaria sp.* و کمترین تاثیر مربوط به گونه قارچی *Epicoecum nigrum* و *Fusarium redolens* بود. نتایج به دست آمده از بررسی تاثیر جدایه های قارچی اندوفیت بر *G. graminis* نیز نشان داد که بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به *Alternaria sp.* و *F. tricinctum* بود و جدایه *Pleosporales sp.* تفاوت معنی داری با شاهد نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌های اندوفیت، آنتاگونیسم، بیمارگرهای ریشه.

Effect of barley endophytic fungi against of two pathogenic fungi, *Gaeumannomyces graminis* and *Pythium aphanidermatum*

L. shadmani¹, S. jamali^{1*} and A. Fatemi²

1 Department of Plant Protection, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

2. Department of Soil Science, College of Agriculture, Razi University, Kermanshah, Iran.

(Received: October 25, 2017 - Accepted: March 13, 2018)

ABSTRACT

Endophytic fungi can be efficient biological control agents. There is great evidences that show these fungi have a protective effect for their host plants against root pathogens. In this study, antagonistic effect of 20 isolates of endophytic fungi of barley roots including; *Alternaria sp.* (six isolates), *Microdochium bolleyi* (two isolates), *Fusarium redolens* (four isolates), *Fusarium tricinctum* (two isolates), *F. moniliforme* (one isolate), *Epicoecum nigrum* (four isolates) and *Clonostachys rosea* (four isolates) were evaluated against two pathogenic fungi; *Pythium aphanidermatum* and *Gaeumannomyces graminis in vitro*. The Results of the impact of endophytic fungal isolates on *P. aphanidermatum*, indicated that the highest percentage of inhibition was related to *A. alternata* and *Alternaria sp.* with 59.48 and 57.24 % and the least effectiveness was related to *Epicoecum nigrum* and *Fusarium redolens* with 8.92 percent. The Results of the impact of endophytic fungal isolates on *G. graminis*, indicated that the highest percentage of inhibition was related to *F. tricinctum* and *Alternaria sp.* with 71.66 and 72.22 percent inhibition. *Pleosporales sp.* indicated no significant difference as compared to control.

Key words: Endophytic fungi, Antagonism, Root pathogens.

تازه‌های تحقیق

در این پژوهش برهمکنش جدایه‌های اندوفیتی ریشه جو که به روش مورفولوژیکی و مولکولی شناسایی شده بودند با قارچ‌های بیمارگر *Pythium aphanidermatum* و *Gaeumannomyces graminis* که دو بیمارگر خطرناک گیاهی هستند، برای اولین بار در ایران در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده از این پژوهش اکثر قارچ‌های اندوفیت ریشه جو دارای توانایی آنتاگونیستی علیه این دو بیمارگر هستند، چراکه شعاع رشد بیمارگر در حضور قارچ‌های اندوفیت به صورت معنی داری نسبت به شاهد (قارچ بیمارگر به تنهایی) کاهش پیدا کرد.

مقدمه

قارچ‌های *Pythium aphanidermatum* و *Gaeumannomyces graminis* از جدی‌ترین و مخرب‌ترین بیمارگرهای محصولات زراعی در سراسر جهان هستند. مدیریت این بیمارگرها در اکثر موارد با مصرف سموم شیمیایی است که این مواد می‌توانند آثار زیان باری بر سلامت انسان و حیوانات داشته باشند و موجب آلودگی محیط زیست شوند. در سال‌های اخیر استفاده از کنترل زیستی برای کنترل بیمارگرهای گیاهی بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Waard et al. 1993). قارچ‌های اندوفیت قارچ‌هایی هستند که در لحظه نمونه‌برداری بدون علائم آشکاری داخل بافت گیاهی حضور دارند (Porrás-Alfaro and Bayman 2011). گزارش‌های متعددی وجود دارد که استفاده از قارچ‌های اندوفیت موجب بهبود عملکرد دانه، افزایش تحمل سرما و خشکی، مقاومت به بیمارگرهای گیاهی و حشرات گیاهخوار شده است (Rodríguez Mejía et al. 2008, et al. 2009)، از این رو می‌توان این قارچ‌ها را به عنوان یک عامل کنترل زیستی در حفاظت از محصولات زراعی مورد استفاده قرار داد. در این پژوهش با توجه به اهمیت دو بیمارگر *P. aphanidermatum* و *G. graminis* در استان

کرمانشاه از نظر میزان خسارت زیاد به محصولات، اثر آنتاگونیستی هفده جدایه اندوفیتی جداسازی شده از ریشه گیاه جو در شرایط آزمایشگاه به روش کشت متقابل مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت

برای جداسازی قارچ‌های اندوفیت نمونه‌برداری از گیاهان جو سالم در اراضی کشاورزی اطراف شهر کرمانشاه به صورت تصادفی در بهار سال ۱۳۹۴ صورت گرفت. جداسازی قارچ‌های اندوفیت با روش لاران و همکاران صورت گرفت (Larran et al. 2007). به منظور مطالعه مولکولی استخراج دی.ان.ای. با روش سی تب (CetylTrimethyl Ammonium Bromide) صورت گرفت. نواحی ITS1-5.8S-ITS2 از دی.ان.ای. ریبوزومی هسته‌ای با استفاده از ترکیب آغازگرهای عمومی ITS1 به همراه ITS4 فزون‌سازی شد (White et al. 1990). ژن‌های فزون‌سازی شده برای توالی‌سنجی به شرکت ماکروژن کره جنوبی ارسال و توالی‌های به دست آمده به روش دستی و با استفاده از نسخه 7.1 نرم افزار Bioedit (Hall 1999) ویرایش شدند. درخت فیلوژنتیکی با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 با روش پیوست همسایه‌ها با تکرار هزار بار بوت‌استرپ صورت پذیرفت.

بررسی اثر آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت بر

قارچ بیمارگر *Pythium aphanidermatum* و

Gaeumannomyces graminis

برای این آزمون از یک جدایه *G. graminis* و یک جدایه *P. aphanidermatum* که بیماری‌زایی آن‌ها در تحقیقات قبلی اثبات شده بود استفاده شد. از حاشیه پرگنه هفت‌روزه جدایه‌های اندوفیتی، یک پلاگ پنج میلیمتری در یک گوشه پتری و به‌طور همزمان از حاشیه پرگنه هفت روزه *G. graminis* یک پلاگ پنج میلیمتری و بعد از ۴۸ ساعت از حاشیه پرگنه دو روزه قارچ بیمارگر *P.*

قارچ *G. graminis* است. جدایه TW24 تفاوت معنی داری با شاهد نداشت (شکل ۱). توانایی قارچ-های اندوفیت مورد بررسی در بازدارندگی از رشد *P. aphanidermatum* از ۸/۹۲ تا ۵۹/۴۸ متفاوت بود (جدول ۱). در این مطالعه شاهد با میزان رشد نه سانتی متر با بازدارندگی صفر درصد در نظر گرفته شده است. بر اساس گروه بندی صورت گرفته با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج درصد بیشترین میزان تفاوت نسبت به شاهد در جدایه های TW63 و TBR5 با درصد بازدارندگی ۵۹/۴۸ و ۵۷/۲۴ از *P. aphanidermatum* است (شکل ۲).

نمونه های شناسایی شده

در این پژوهش شش جدایه از جنس *Alternaria* و یک جدایه از گونه *A. alternata* شناسایی شد. گونه های زیادی از آلترناریا از جمله *A. alternata* و *A. brassicae* به عنوان قارچ اندوفیت از تعدادی گونه گیاهی شامل *Cannabis sativa*، *Cedrus deodara* و *Rauwolfia serpentina* به همراه تولید هفتاد متابولیت ثانویه فعال و موثر علیه باکتری های گرم منفی و مثبت گزارش شده است (Qadri et al. 2013). در این پژوهش یک جدایه از *B. zeicola* از ریشه گیاه جو به دست آمد. این گونه از بافت های سالم گونه گیاهی *Piptadenia adiantoides* و گونه *B. sorokiniana* از برگ های گیاه *Rhazya stricta* به عنوان اندوفیت گزارش شده اند (Rosa et al. 2010). در این پژوهش سه جدایه از جنس فوزاریوم شامل *F. moniliforme* (یک جدایه)، *F. tricinctum* (دو جدایه) و *F. redolens* (چهار جدایه) از ریشه گیاه جو به دست آمد. گونه های فوزاریوم از جمله فراوان ترین قارچ های اندوفیت هستند (Liang et al. 2012). تاکنون اثر کنترل زیستی بعضی گونه های فوزاریوم مانند *F. oxysporum* (Nel et al. 2006) و *F. equiseti* (Macia-Vicente et al. 2008b) به ترتیب روی جدایه های بیماری زای *F. oxysporum* و *G. graminis* گزارش شده است. در بررسی حاضر دو جدایه از *M. bolleyi* از ریشه گیاه جو به دست

یک پلاگ پنج میلی متری در گوشه دیگر تشتک های پتری قرار داده شد. پس از کشت هر جدایه با سه تکرار و شاهد بدون قارچ اندوفیت با سه تکرار، تشتک های پتری در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. به علت کند بودن سرعت رشد قارچ *G. graminis* بعد از ده روز و به علت سریع بودن سرعت رشد *P. aphanidermatum* بعد از کمتر از دو روز که پرگنه قارچ در تیمار شاهد تمام تشتک پتری را پر کرد، میزان رشد بیمارگر و درصد کاهش رشد میسلیم اندازه گیری شد. برای این منظور از معادله $N = (C - T) / C * 100$ استفاده شد که در آن N درصد بازدارندگی جدایه اندوفیتی، T قطر پرگنه قارچ بیمارگر در حضور قارچ های اندوفیت مختلف و C قطر پرگنه قارچ بیمارگر در تیمار شاهد است. این آزمون در قالب یک طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار صورت پذیرفت و آنالیز نتایج با استفاده از نسخه ۱۶ نرم افزار SPSS انجام گرفت.

نتایج و بحث

آزمون کنترل زیستی

در این مطالعه ۱۷ جدایه اندوفیت از ریشه گیاه جو بدست آمد که پس از شناسایی مولکولی و تأیید صحت تشخیص با تبارنمای فیلوژنتیکی بر اساس توالی های نواحی نسخه برداری شده داخلی دی.ان.ای. ریپوزومی، توانایی آنها در بازدارندگی دو گونه بیمارگر گیاهی شامل *G. graminis* و *P. aphanidermatum* مورد بررسی قرار گرفت. توانایی قارچ های اندوفیت مورد بررسی در بازدارندگی از رشد قارچ *G. graminis* از ۱/۶۶ تا ۷۲/۲۲ متفاوت بود (جدول ۱). در این مطالعه، شاهد با میزان رشد هفت سانتی متر با بازدارندگی صفر درصد در نظر گرفته شده است. بر اساس گروه بندی صورت گرفته با استفاده از آزمون دانکن در سطح پنج درصد بیشترین میزان تفاوت نسبت به شاهد در جدایه های B14، TBL26، TBL33، TBR8 با درصد بازدارندگی ۷۱/۶۶، ۷۱/۶۶، ۷۲/۲۲ و ۷۲/۲۲ از

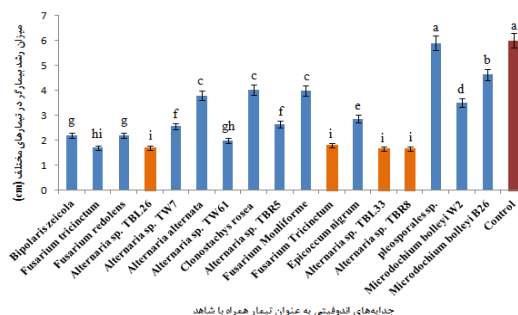
افزایش سرعت رشد گیاهان میزبان خود نیز می‌شود (Lübeck *et al.* 2002). در این پژوهش یک جدایه از راسته *Pleosporales* شناسایی شد که همزیستی دو جانبه قارچ‌های سپتوم‌دار تیره در این راسته با گیاهان میزبان گزارش شده است (Likar and Regvar 2013). با توجه به نقش اکولوژیکی و استفاده‌های اخیر از متابولیت‌های به دست آمده از اندوفیت‌ها در علم پزشکی، کشاورزی و صنایع، شناسایی قارچ‌های اندوفیت از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه شناسایی قارچ‌های اندوفیت ریشه‌ جو با توجه به خصوصیات مورفولوژیکی و مولکولی و ارزیابی اثر آنها به روش کشت متقابل علیه دو بیمارگر مورد بررسی قرار گرفت و مطالعات بعدی در خصوص ارزیابی اثر این قارچ‌ها بر بیمارگرهای قارچی، در شرایط گلخانه و محیط بیرون در دست بررسی است.

آمد. این قارچ یک اندوفیت فراوان و موفق در ریشه-های غلات است و به‌عنوان یک آنتاگونیست موثر علیه انواع بیمارگرهای ریشه از جمله *Septoria Bipolaris*، *Fusarium culmorum nodorum* و *Gaeumannomyces graminis sorokiniana* و *Microbotryum violaceum* موثر گزارش شده است (Zhang *et al.* 2008). گونه *E. nigrum* نیز در این پژوهش از ریشه گیاه جو به دست آمد که اثر کنترل‌کنندگی این گونه در کنترل بیماری پوسیدگی قهوه‌ای درختان میوه هسته دار (De Cal *et al.* 2009) و بیماری لکه برگ گیاه *Lablab purpureus* گزارش شده است (Mahadevakumar *et al.* 2015). در بررسی حاضر یک جدایه از گونه *C. rosea* از ریشه گیاه جو به دست آمد. این گونه علاوه بر اثر کنترل‌کنندگی بیماری‌های بذرزاد غلات *Botrytis cinerea* در برگ و گلبرگ رز، موجب

جدول ۱. نتایج مربوط به برهم‌کنش قارچ بیمارگر و جدایه‌های اندوفیتی

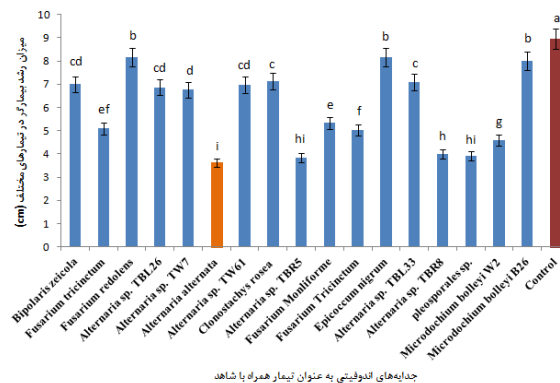
Table 1. List of identified endophytic fungi in this study, their accession numbers and their Percentage of inhibition.

Code of isolates	Species	Accession number	Percentage of inhibition (<i>Pythium aphanidermatum</i>)	Percentage of inhibition (<i>Gaeumannomyces graminis</i>)
Tw24	<i>pleosporales</i>	KX061191	56.5	1.66
Tw26	<i>Bipolaris zeicola</i>	KT833867	21.93	63.33
Tw7	<i>Alternaria</i> sp.	KX061187	24.53	57.22
Tw63	<i>Alternaria alternata</i>	KX061189	59.48	36.66
Tw61	<i>Alternaria</i> sp.	KX061188	22.3	66.66
W2	<i>Microdochium bolleyi</i>	KX343031	48.69	41.66
TBR8	<i>Alternaria</i> sp.	KX061185	55.39	72.22
TBL26	<i>Alternaria</i> sp.	KX061184	23.41	71.66
TBR5	<i>Alternaria</i> sp.	KX061190	57.24	56.11
TBL33	<i>Alternaria</i> sp.	KX061186	20.81	72.22
B5	<i>Clonostachys rosea</i>	-	20.44	32.77
B26	<i>Microdochium bolleyi</i>	KX343032	10.87	22.77
B3	<i>Epicoccum nigrum</i>	-	8.92	52.22
B12	<i>Fusarium redolens</i>	KX343030	8.82	63.33
B24	<i>F. moniliforme</i>	KX343028	40.52	33.33
B14	<i>F. tricinctum</i>	KX343029	43.12	71.66
B149	<i>F. tricinctum</i>	KX343033	43.86	70



شکل ۱) گروه‌بندی میزان رشد قارچ بیمارگر *Gaeumannomyces graminis* در تیمار با جدایه‌های اندوفیتی نسبت به شاهد با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد

Fig. 1. The growth of pathogenic fungus *Gaeumannomyces graminis* in the treatment with endophytic species compared to the control using Duncan test at 5%.



جدایه‌های اندوفیتی به عنوان تیمار همراه با شاهد

شکل ۲) گروه‌بندی میزان رشد قارچ بیماری‌گر *Pythium aphanidermatum* در تیمار با جدایه‌های اندوفیتی نسبت به شاهد با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد

Fig. 2. The growth of pathogenic fungus *Pythium aphanidermatum* in the treatment with endophytic species compared to the control using Duncan test at 5%.

REFERENCES

- Ainsworth G, Bisby G (1961) A Dictionary of the Fungi. Commonwealth Mycological Institute Kew, England.
- Barnett HL, Hunter BB (1998) Illustrated genera of imperfect fungi. vol Ed. 4. American Phytopathological Society (APS Press).
- De Cal A et al. (2009) Population dynamics of *Epicoccum nigrum*, a biocontrol agent against brown rot in stone fruit. *Journal of Applied Microbiology* 106:592-605.
- Hall TA BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: Nucleic acids symposium series, 1999. pp 95-98.
- Larran S, Perelló A, Simón MR, Moreno V (2007) The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.) *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23:565-572.
- Liang H, Xing Y, Chen J, Zhang D, Guo S, Wang C (2012) Antimicrobial activities of endophytic fungi isolated from *Ophiopogon japonicus* (Liliaceae). *BMC Complement and Alternative Medicine* 12: 238-243.
- Likar M, Regvar M (2013) Isolates of dark septate endophytes reduce metal uptake and improve physiology of *Salix caprea* L. *Plant and Soil* 370:593-604 doi:10.1007/s11104-013-1656-6.
- Lübeck M, Knudsen IMB, Jensen B, Thrane U, Janvier C, Jensen DF (2002) GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies *Mycological Research* 106:815-826 doi:10.1017/s095375620200607x
- Macia-Vicente JG, Jansson HB, Mendgen K, Lopez-Llorca LV (2008) Colonization of barley roots by endophytic fungi and their reduction of take-all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* *Canadian Journal of Microbiology* 54:600-609 doi:10.1139/w08-047
- Mahadevakumar S, Jayaramaiah K, Janardhana G (2015) First report of leaf spot disease caused by *Epicoccum nigrum* on *Lablab purpureus* in India *Mycological Progress* 14.
- Mejía LC et al. (2008) Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control* 46:4-14.
- Nel B, Steinberg C, Labuschagne N, Viljoen A (2006) The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing *Fusarium* wilt of banana. *Plant Pathology* 55:217-223
- Porrás-Alfaro A, Bayman P (2011) Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. *Annual Review of Phytopathology* 49:291-315 doi:10.1146/annurev-phyto-080508-081831.
- Qadri M, Johri S, Shah BA, Khajuria A, Sidiq T, Lattoo SK, Abdin MZ, Riyaz-Ul-Hassan S (2013) Identification and bioactive potential of endophytic fungi isolated from selected plants of the Western Himalayas. *SpringerPlus* 2:8-22.
- Rodriguez RJ, White JF, Jr., Arnold AE, Redman RS (2009) Fungal endophytes: diversity and functional roles. *The New Phytologist* 182:314-330 doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02773x.
- Rosa LH, Gonçalves VN, Caligiorne RB, Alves TMA, Rabello A, Sales PA, Alvaro J. Romanha

- AJ, et al.** (2010) Leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activities of endophytic fungi associated with bioactive plants in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology* 41: 420-430
- Waard M, Georgopoulos S, Hollomon D, Ishii H, Leroux P, Ragsdale N, Schwinn F** (1993) Chemical control of plant diseases: problems and prospects. *Annual Review of Phytopathology* 31:403-421.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18:315-322
- Zhang W, Krohn K, Draeger S, Schulz B** (2008) Bioactive isocoumarins isolated from the endophytic fungus *Microdochium bolleyi*. *Journal of Natural Products* 71:1078-1081.