مقاله علمی پژوهشی
مجله دوفصل نامه
مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۱۲، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۴۰۲
صفحه ۱۶-۱

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9

DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9

Research Article
Genetic Engineering and Biosafety Journal 2023
Volume 12, Number 1, Pages: 1-16

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

شناسایی و ارزیابی اثر بازدارندگی قارچ‌های اندوفیت پیاز قرمز علیه برخی بیمارگرهای پیاز

Identification and evaluation of the inhibitory effect of endophytic fungi of red onion against some onion pathogens

اکبر شیرزاد[1]*، سودا اصغرزاده[2]، علیرضا علیزاده[3]
Akbar Shirzad*, Sevda Asgharzadeh, Alireza Alizadeh

گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید مدنی آذربایجان، تبریز، ایران.
Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Azarbaijan Shahid Madani University, Tabriz, Iran.

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: *Corresponding Author, Email
akbar.shirzad@azaruniv.ac.ir
(تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۷ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۴)

چکیده

به‌منظور شناسایی قارچ‌های همراه گیاه پیاز رقم قرمز آذرشهر (*Allium cepa* L.)، نمونه‌برداری از مناطق کشت عمده این گیاه در استان آذربایجان شرقی صورت گرفت. در مجموع ۳۶۰ جدایه قارچی از قسمت‌های مختلف پیاز (ریشه، طبق، فلس، ساقه گل‌دهنده و برگ) جداسازی و خالص-سازی شدند. گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس خصوصیات فنوتیپی جدایه‌ها روی محیط‌های غذایی و مقایسه الگوی انگشت‌نگاری DNA با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR انجام شد. شناسایی دقیق قارچ‌های اندوفیت پس از ادغام ویژگی‌های ریخت‌شناختی و تجزیه و تحلیل تبارزایی توالی ناحیه ژنومی ITS-rDNA انجام شد. بر این اساس مشخص گردید جدایه‌های اندوفیت به هشت جنس و ۱۲ گونه *Alternaria atrum*، *A. tenuissima*، *Aspergillus niger*، *A. kevei*، *Fusarium equiseti*، *Fusarium oxysporum*، *F. proliferatum*، *F. solani*، *Mortierella alpina*، *Setophoma terrestris*، *Stachybotrys chartarum* و *Trichoderma longibrachiatum* تعلق دارند. نتایج آزمون اثر بازدارندگی جدایه منتخب اندوفیت *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 روی رشد چند جدایه قارچی بیمارگر پیاز شامل *Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum*، *F. solani* و *Setophoma terrestris* نشان داد، این استرین از توانایی مطلوبی در تولید آنزیم سلولاز در محیط کشت حاوی کربوکسی متیل سلولز برخوردار است و به طور معنی‌داری باعث بازدارندگی از رشد بیمارگرهای فوق می‌گردد. بر اساس اطلاعات موجود این اولین گزارش از گونه *Aspergillus kevei* برای فلور قارچی ایران محسوب می‌شود. همچنین این پژوهش اولین مطالعه از جداسازی و شناسایی قارچ-های اندوفیت گیاه پیاز قرمز در مناطق عمده کشت آن در ایران به شمار می‌آید.

واژه‌های کلیدی

بازدارندگی رشد،
بیماری‌های پیاز،
فلور قارچی،
سلولاز،
مهار زیستی

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 12, Number 1, 2023

Abstract
In order to identify the fungi associated with Azarshahr red onion variety, sampling was conducted from the main cultivation areas of this plant in East Azarbaijan province. A total of 360 fungal isolates were obtained from different parts of onion (root, base, scale, flowering stem and leaf). The isolates were grouped based on their phenotypic characteristics on culture media and comparing the DNA fingerprinting patterns using the ISSR molecular markers. In order to accurate identification of the endophytic fungi, the morphological characteristics were combined with the phylogeny inferred from analysis of ITS-rDNA genomic region sequence. Examined endophyte isolates were belonged into eight genera and 12 species namely *Alternaria atrum*, *A. tenuissima*, *Aspergillus niger*, *A. kevei*, *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *Mortierella alpina*, *Setophoma terrestris*, *Stachybotrys chartarum* and *Trichoderma longibrachiatum*. The results of the inhibitory effect experiments of the selected endophyte *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 on the growth of several onion pathogenic fungal isolates including *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Setophoma terrestris* showed that this strain has a good ability to produce cellulase enzyme in carboxymethyl cellulose medium and significantly reduces the growth of all the above pathogens on the culture media. To our knowledge, this is the first report of *Aspergillus kevei* for the funga of Iran. Also, this research is the first study on the isolation and identification of endophytic fungi of red onion verity in its major cultivation areas in Iran.
Key words: growth inhibition, onion diseases, Funga, cellulase, biological control.

مقدمه

پیاز خوراکی (*Allium cepa* L.) یکی از مهم‌ترین سبزی‌های خانواده‌ی Amaryllidaceae می‌باشد که از نظر ارزش اقتصادی بسیار با اهمیت است (Shedeed 2014). اندام زیرزمینی این گیاه به‌عنوان سبزی، طعم دهنده و چاشنی غذا، به‌صورت سالاد و ترشی استفاده می‌شود (Attri et al. 2015). پیاز یک گیاه با ارزش غذایی زیاد بوده و بخاطر داشتن منابع با ارزش ویتامین‌ها، فلزات و آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان یک گیاه دارویی با اهمیت نیز شناخته می‌شود (Samuel and Ifeanyi 2015). پیاز خوراکی بعد از گوجه‌فرنگی به‌عنوان دومین محصول مهم سبزی در جهان شناخته شده است (Dumbre et al. 2011). قارچ‌ها از عوامل عمده بیماری‌زای پیاز محسوب می‌شوند که انواع بیماری‌ها نظیر پوسیدگی ریشه و طبق، پوسیدگی خاکستری گردن، زنگ، سیاهک، آنتراکنوز، سفیدک سطحی و ... را در این گیاه بوجود می‌آورند (Rabiei-Motlagh et al. 2010). در برخی گزارش‌ها کاهش عملکرد گیاه پیاز در نتیجه بیماری‌های گیاهی تا حدود ۵۰٪ یا بیشتر تخمین زده می‌شود که این مقدار خسارت بسته به موقعیت، شرایط محیطی و عوامل بیماری‌زا متغیر است (Schwartz and Mohan, 1995). آلودگی‌های قارچی علاوه بر کاهش عملکرد، خاک را نیز آلوده نموده و زمین زراعی را برای کشت در سال‌های بعد نامناسب می‌سازند. همچنین بسیاری از گونه‌های قارچی که پیاز را آلوده می‌کنند، توانایی تولید مقادیر زیادی از مایکوتوکسین‌ها را دارند که این متابولیت‌های قارچی برای انسان و سایر پستانداران بسیار سمی هستند (Zohri et al. 1992). گاهی اوقات خسارت بیماری‌ها در اثر آلودگی بذر موجب از بین رفتن ۱۰۰ درصد محصول پیاز می‌شود (Abdel-Hafez et al. 2014).

علاوه بر عوامل بیماری‌زا، گیاهان با گروهی دیگر از میکروارگانیسم‌های قارچی تعامل دارند که این عوامل اندوفیت نامیده می‌شوند. اندوفیت‌ها نه تنها باعث ایجاد علایم بیماری روی گیاهان نمی‌شوند، بلکه بسیاری از اثرات مفید آن‌ها نظیر تحریک رشد گیاه، فعال کردن سیستم دفاعی گیاه به‌صورت طبیعی و

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

افزایش تحمل به بسیاری از تنش‌های زیستی و غیرزیستی به اثبات رسیده است (Waqas et al. 2015).

تعاریف متعددی برای قارچ‌های اندوفیت ارائه شده است. تعریفی که به طور گسترده استفاده می‌شود قارچ‌های اندوفیت را به‌عنوان قارچ‌هایی که در بافت‌های داخل گیاهان زنده ساکن بوده و هیچ-گونه اثرات منفی آشکار و فوری در میزبان ایجاد نمی‌نمایند، معرفی می‌نماید (Aly et al. 2011).

شناسایی قارچ‌های محیط پیرامون، یکی از جنبه‌های اساسی در درک تنوع زیستی است و از اهمیت بسزایی برخوردار می‌باشد (Alizadeh et al. 2021). هم‌چنین شناسایی قارچ‌های بیمارگر گیاهی اولین قدم اساسی در شناخت زیست‌شناسی آن‌ها و نهایتاً مدیریت بیماری‌های گیاهی است (Alizadeh et al. 2015; Alizadeh et al. 2022). بر اساس اطلاعات موجود، عوامل بیماری‌زای قارچی فراوانی موجب وارد شدن خسارت اقتصادی در مزارع پیاز در استان آذربایجان شرقی می‌شوند (Jahedi et al. 2019). بنابراین، شناسایی صحیح گونه‌های بیمارگر پیاز برای توسعه و فراهم کردن راه‌کارهای مناسب مدیریت بیماری‌های گیاهی و تحقیقات دیگر ضروری می‌باشد. در دهه‌های اخیر توجه زیادی به استفاده از روش‌های سازگار با محیط زیست و موجودات زنده آنتاگونیست بیمارگرهای گیاهی در طبیعت طی یک راهبرد ارزشمند بنام کنترل بیولوژیک معطوف شده است. هم‌چنین اخیراً علاقه فزاینده‌ای برای مطالعه قارچ‌های اندوفیت، منشأ، تنوع زیستی، اثرات متقابل بین اندوفیت‌ها و گیاهان میزبان، نقش آن‌ها در اکولوژی و همچنین خصوصیات شیمیایی و فعالیت‌های زیستی متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط آن‌ها شکل گرفته است (Schulz and Boyle 2005).

علی‌رغم مطالعات زیادی که روی فلور قارچی پیاز در دنیا انجام گرفته، بر اساس اطلاعات موجود تاکنون مطالعه‌ای به‌منظور شناسایی قارچ‌های اندوفیت گیاه پیاز قرمز در ایران انجام نشده و هیچ اطلاعاتی از تنوع زیستی این قارچ‌ها در دست نمی‌باشد. با توجه به سابقه‌ی کشت پیاز در استان آذربایجان شرقی و توسعه‌ی کشت این گیاه در سال‌های اخیر در سطح استان، لزوم شناسایی فلور قارچی با توجه به تنوع آن‌ها و تعاملاتی که با میزبان دارند، ضروری است. بنابراین، پژوهش حاضر با هدف جداسازی و شناسایی میکوفلور و قارچ‌های اندوفیت گیاه پیاز در مناطق عمده کشت این محصول در استان آذربایجان‌شرقی و ارزیابی اثر بیوکنترلی جدایه اندوفیت منتخب علیه برخی بیمارگرهای گیاهی پیاز انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه و جداسازی قارچ‌ها: نمونه‌برداری از ساقه زیرزمینی و گیاه کامل پیاز رقم قرمز آذرشهر و از مزارع برخی مناطق شهرستان‌های ایلخچی، عجب‌شیر و گوگان در استان آذربایجان‌شرقی در طی اوایل پاییز ۹۵ و اوایل تابستان ۹۶ انجام گرفت. برای جداسازی قارچ‌های همراه، ابتدا در یک روش قطعات گیاهی بعد از شستشو با آب مقطر سترون، بدون ضدعفونی کردن به محیط کشت آب-آگار (WA) منتقل شدند. در روش دیگر برش‌های کوچکی از قسمت‌های مختلف تهیه و قطعات پس از شستشو و ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم نیم درصد به مدت ۲-۱ دقیقه، روی محیط کشت آب-آگار منتقل شدند.

جداسازی قارچ‌های اندوفیت به روش سلیمی و همکاران (Salimi et al. 2019)، از نمونه‌هایی با بافت سالم و بدون علایم انجام شد. پس از ضدعفونی، نمونه‌ها به قطعات کوچک برش داده شده و روی محیط کشت WA حاوی آنتی‌بیوتیک‌های کلرامفنیکل (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) و جنتامایسین (۵۰ میلی‌گرم در لیتر) منتقل شدند. تمامی نمونه‌های کشت یافته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۷-٤ روز درون انکوباتور نگه‌داری شدند. پس از رشد قارچ‌ها، قسمت‌هایی از حاشیه پرگنه‌های قارچی به محیط کشت WA جدید منتقل شده و بعد از ۲-۱ روز، خالص‌سازی جدایه‌های قارچی به روش نوک ریسه و تک اسپور کردن انجام گرفت.

شناسایی جدایه‌های قارچی اندوفیت

گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس نشانگر مولکولی ISSR: استخراج DNA ژنومی برای همه ۳٦۰ جدایه قارچی به روش ژانگ و

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

استفنسون انجام گرفت (Zhong and Steffenson 2001). گروه-بندی جدایه‌ها با استفاده از مقایسه الگوی انگشت‌نگاری DNA به دست آمده از نشانگر مولکولی ISSR و آغازگر ISSRAF80824 (جدول ۱) مورد ارزیابی قرار گرفت. پس از گروه‌بندی جدایه‌ها، برخی جدایه‌ها به‌عنوان جدایه‌های نماینده برای شناسایی ریخت-شناختی و مولکولی بر اساس تجزیه و تحلیل ناحیه ITS انتخاب شدند.

غلظت و مقادیر حجمی مواد به کار رفته برای تهیه مخلوط PCR با استفاده از آغازگر ISSR شامل چهار میکرولیتر آب دیونیزه استرون، چهار میکرولیتر مخلوط آماده‌ی PCR (Master Mix 2X، شرکت پیشگام، ایران)، ۰/۸ میکرولیتر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومولار و ۱/۲ میکرولیتر از DNA ژنومی با غلظت ۵۰ نانوگرم در میکرولیتر در حجم نهائی ۱۰ میکرولیتر بود. پس از تهیه مخلوط PCR میکروتیوب‌ها درون دستگاه ترموسایکلر (TProfessional Thermocycler, Biometra, Germany) قرار داده شدند. برنامه حرارتی PCR جهت تکثیر DNA با استفاده از آغازگرهای ISSR طبق جدول (۲) تنظیم شد.

جدول ۱- آغازگرهای استفاده شده در این مطالعه. **Table 1.** Primers used in this study.

Primer	Annealing temperature (°C)	Sequence (5′→ 3′)	Source
ISSRAF80824	40	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	Ratanacherdchai et al. 2010
ITS1	40	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	White et al. 1990
ITS4	51	TCCTCCGCTTATTGATATGC	White et al. 1990

جدول ۲- برنامه حرارتی PCR جهت تکثیر DNA با استفاده از آغازگر ISSRAF80824.
Table 2. PCR program for DNA amplification using ISSRAF80824 primer.

Number of cycles	Stage	Temperature, time
1	Denaturation	95 °C, 5 min.
35	Denaturation	95 °C, 45 sec.
	Annealing	40 °C, 45 sec.
	Extension	72 °C, 60 sec.
1	Final Extension	72 °C, 5 min.

به‌منظور مشاهده الگوی انگشت‌نگاری DNA از الکتروفورز ژل آگارز یک درصد استفاده شد. برای این منظور پنج میکرولیتر از محصول PCR با یک میکرولیتر بافر نمونه (Safe Stain) در چاهک‌ها بارگذاری شد. به‌منظور تعیین وزن قطعات تکثیر شده، سه میکرولیتر از نشانگر اندازه DNA با نام تجاری Gene RulerTM DNA ladder mix (Fermentas, Germany) در دو چاهک ابتدا و انتهایی ژل بارگذاری شد. در ادامه، تانک الکتروفورز به مدت ۹۰ دقیقه به منبع جریان الکتریکی با ولتاژ ۷۰-۸۰ ولت و شدت جریان ۳۰-۱۵ میلی‌آمپر متصل شد.

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از انگشت‌نگاری DNA با استفاده از نشانگرهای ISSR: امتیازدهی باندها: پس از مرئی‌شدن باندهای DNA تکثیر یافته و تعیین چندشکلی‌ها، نمره‌دهی باندها و یا قطعات تکثیر یافته DNA براساس سیستم دوگانه (صفر برای عدم وجود و یک برای وجود آن باند) با استفاده از نرم‌افزار Adobe Photoshop CS4 انجام و سپس اعداد در نرم‌افزار Microsoft Excel 2003 وارد شدند.

محاسبه ماتریس تشابه و تجزیه و تحلیل خوشه‌ای: از ماتریس داده‌ها جهت ایجاد جدول تشابه (similarity matrix) بین جدایه‌ها بر مبنای ضریب تشابه دایس (Dice's coefficient) استفاده شد. فرمول ضریب تشابه دایس عبارت است از $dij = \frac{2a+(b+c)}{b+c}$. که در آن i و j دو فردی هستند که شباهت میان آن‌ها محاسبه می‌شود، a نشان‌دهنده تعداد باندهای مشترک در هر دو فرد، b نشان‌دهنده تعداد باندهای موجود فقط در فرد i و c نشانگر تعداد باندهای موجود فقط در فرد j است. بر اساس جدول تشابه، تجزیه و تحلیل خوشه‌ای بر اساس الگوریتم UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

average) با استفاده از نرم‌افزار کامپیوتری NTSYSpc-2.02e (Rohlf et al. 2009) انجام و فنوگرام رسم گردید.

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی: شناسایی ریخت-شناختی جدایه‌های قارچی بر اساس ویژگی‌های پرگنه و خصوصیات میکروسکوپی با مراجعه به کلیدهای شناسایی معتبر انجام شد. برای تعیین میزان و نحوه رشد و ارزیابی خصوصیات پرگنه قارچ از محیط کشت عمومی PDA (Nelson et al. 1983) استفاده شد. به‌طور اختصاصی جهت ارزیابی خصوصیات ریخت-شناختی گونه‌های جنس *Alternaria* از محیط کشت سیب‌زمینی –هویج–آگار (PCA) (Simmons 2007)، برای شناسایی گونه‌های جنس *Fusarium* از محیط کشت برگ میخک–آگار (CLA) و SNA (Leslie and Summerell 2006)، و برای شناسایی ریخت‌شناختی جنس *Aspergillus* از محیط کشت عصاره مخمر چاپک آگار (CYA) (Klich 2002) استفاده شد.

مطالعات فیلوژنتیکی: پس از گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس نشانگر مولکولی ISSR و شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها، تعداد ۱۲ جدایه اندوفیت به‌عنوان نماینده برای شناسایی مولکولی بر اساس تعیین توالی ناحیه ITS-rDNA با استفاده از از آغازگرهای ITS1 و ITS4 (White et al. 1990) انتخاب شدند.

غلظت و مقادیر حجمی مواد به‌کار رفته در مخلوط PCR شامل ۱۴ میکرولیتر آب دیونیزه سترون، ۱۲ میکرولیتر Taq DNA Polymerase 2X Master Mix RED (Ampliqon co., South Korea)، یک میکرولیتر از هر آغازگر با غلظت ۱۰ پیکومولار و دو میکرولیتر DNA ژنومی با غلظت حدود ۵۰ نانوگرم بر میکرولیتر و در حجم نهائی ۳۰ میکرولیتر تهیه شد. واکنش PCR برای هر دو جفت آغازگر طی چرخه‌های دمایی مشابه شامل واسرشت‌سازی اولیه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت پنج دقیقه، ۳۵ چرخه شامل واسرشت‌سازی در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت یک دقیقه، اتصال (annealing) در ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ ثانیه، بسط در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و بسط نهایی در ۷۲ درجه سلسیوس به مدت هفت دقیقه، انجام گردید. نمونه‌ها پس از تعیین غلظت برای انجام تعیین توالی به شرکت بیومجیک ژن (Bio Magic Gene Co., Iran) ارسال شدند.

تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی داده‌ها و ترسیم تبارنما: بعد از دریافت نتایج حاصل از تعیین توالی نواحی ژنومی، کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Chromas pro 1.7.6 و نرم‌افزار Editseq 5.01 مشاهده و در صورت لزوم به‌صورت دستی ویرایش شدند. آزمون مشابهت‌یابی توالی‌ها در بانک داده‌های ژنومی (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) GenBank و Q-bank (http://www.q-bank.eu) صورت پذیرفت (Altschul *et al.* 1990). توالی‌های دارای بیشترین شباهت به همراه توالی جدایه تیپ گونه‌ها از بانک ژن اخذ و در کنار توالی‌های مورد مطالعه در این پژوهش مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. توالی‌های به دست آمده در این پژوهش در بانک ژن ذخیره و شماره دسترسی اخذ گردید (جدول ۳).

آزمون بازدارندگی جدایه اندوفیت منتخب علیه برخی بیمارگرهای گیاهی: در این آزمون اثر بازدارندگی جدایه اندوفیت *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 روی رشد چند جدایه قارچی شامل *Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani* و *Setophoma terrestris* که از بیمارگرهای مهم پیاز هستند، بررسی شد. برای این آزمون از روش کشت متقابل روی محیط غذایی با پیروی از روش Dennis و Webster (Dennis and Webster 1971) استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی انجام شد. بدین منظور ابتدا تشتک‌های پتری نه سانتی‌متری حاوی محیط غذایی سیب‌زمینی–دکستروز–آگار آماده گردید. حلقه‌های میسلیومی پنج میلی‌متری از استرین اندوفیت و هر کدام از بیمارگرهای دیگر در دو طرف تشتک پتری و به فاصله یک سانتی متر از لبه قرار داده شد. در تیمارهای شاهد نیز به همان صورت عمل شد و بجای استرین اندوفیت، یک حلقه پنج میلی‌متری از محیط کشت روی محیط غذایی با همان شرایط قرار داده شد. تشتک‌های پتری در درون انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگه‌داری شدند و پس از رشد کامل جدایه قارچی در تیمار شاهد و پوشاندن تمام سطح پتری، آزمایش متوقف شده و اندازه رشد پرگنه جدایه‌های

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

قارچی در تیمارها و شاهد اندازه‌گیری شد. آزمایش با پنج تکرار برای تیمار و شاهد انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9.0 انجام شده و رسم نمودارها با استفاده از نرم-افزار Excel 2019 صورت پذیرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD با سطح احتمال آماری ۵٪ استفاده شد. تعیین درصد بازدارندگی سویه اندوفیت علیه بیمارگرهای به روش Kermajany و همکاران (Kermajany et al. 2017) انجام شد.

آزمون تولید آنزیم سلولاز جدایه اندوفیت منتخب: آزمون ارزیابی توانایی تولید آنزیم سلولاز توسط استرین اندوفیت *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 به پیروی از روش پاشائوری و همکاران (Pachauri et al. 2017) انجام شد. این آزمون روی محیط غذایی کربوکسی متیل سلولز (CMC) انجام شده و قطر هاله روی این محیط غذایی پس از یک هفته اندازه‌گیری شد.

نتایج و بحث

جمع‌آوری نمونه و جداسازی قارچ‌ها

در مجموع از ٤٦ نمونه از اندام‌های مختلف گیاه پیاز، تعداد ٣٦٠ جدایه به‌عنوان قارچ‌های همراه پیاز جداسازی گردید. از این تعداد، ٤٦ جدایه را جدایه‌های اندوفیت تشکیل می‌دادند که با روش اختصاصی جداسازی قارچ‌های اندوفیت (Salimi et al. 2019) به دست آمده بودند.

گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس نشانگر مولکولی ISSR

برای گروه‌بندی جدایه‌ها و تفکیک گونه‌های به دست آمده، الگوی انگشت‌نگاری DNA تعداد ٣٦٠ جدایه با استفاده از نشانگر مولکولی ISSR و آغازگر ISSRAF80824 مقایسه گردید. در مجموع تعداد ٤٧ باند با استفاده از این آغازگر برای جدایه‌ها تشکیل شد. مقایسه جدایه‌ها بر اساس ٤٠ باند چندشکل (polymorphic) با طول تقریبی ٢٥٠ تا ٣٠٠٠ جفت باز انجام گرفت. گروه‌بندی جدایه‌ها بر اساس نشانگر مولکولی ISSR نشان داد که تعداد ٣٦٠ جدایه در قالب ٥١ گروه انگشت‌نگاری (Fingerprinting group) در سطح تشابه ٧٠٪ قرار می‌گیرند. بنابراین از هر گروه یک جدایه به‌عنوان نماینده برای شناسایی ریخت‌شناختی انتخاب شد. همچنین مقایسه الگوی انگشت‌نگاری DNA برای ٤٦ جدایه اندوفیت نشان داد این جدایه‌ها به ١٢ گروه مجزا تعلق دارند. بر این اساس از هر گروه نیز یک جدایه به‌عنوان نماینده برای شناسایی بر اساس تجزیه و تحلیل فیلوژنتیکی بر اساس ناحیه ژنومی ITS انتخاب شد. در مجموع تعداد ٢٢ باند چند شکلی قابل ارزیابی توسط آغازگر AF80824 تکثیر شد. الگوی انگشت‌نگاری DNA برای برخی جدایه‌ها در شکل (١) نشان داده شده است.

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچی

بررسی و مقایسه خصوصیات ریخت‌شناختی و پرگنه (اندازه، شکل پرگنه، رنگ پرگنه و نوع بافت پرگنه) نشان داد که تعداد ٤٦ جدایه نماینده اندوفیت به هشت جنس شامل *Alternaria*، *Aspergillus*، *Fusarium*، *Mortierella*، *Rhizoctonia*، *Setophoma*، *Stachybotrys* و *Trichoderma* و ١٢ گروه ریخت‌شناختی (morphotype) مجزا تعلق دارند. از هر مورفوتایپ، یک جدایه به عنوان نماینده برای شناسایی با استفاده از تجزیه و تحلیل تبارزایی انتخاب شد.

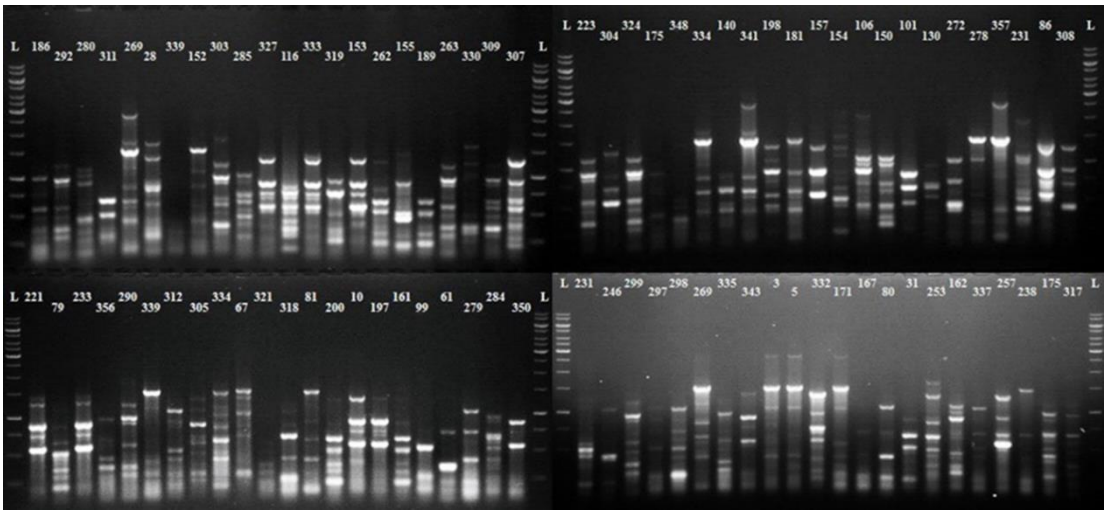
مطالعات فیلوژنتیکی

پس از تطبیق داده‌های حاصل از مطالعات ریخت‌شناختی و گروه-بندی حاصل از نشانگر مولکولی ISSR، تعداد ١٢ جدایه به‌عنوان جدایه‌های نماینده برای شناسایی دقیق قارچ‌های اندوفیت به دست آمده از پیاز با استفاده از توالی‌یابی ناحیه ژنومی ITS1-5.8S-ITS2 انتخاب شدند. تجزیه و تحلیل تبارزایی با استفاده از هر سه روش Neighbor-joining، Maximum likelihood و Maximum parsimony تفکیک ١٢ جدایه نماینده در قالب ١٢ گروه مونوفیلتیک را نشان داد. هرگروه جدایه نماینده‌ای را شامل می‌شد که با درجه اعتبارسنجی بالا به همراه یک جدایه تیپ و یا معتبر قارچی قرار می‌گرفت. مطالعات فیلوژنتیکی ١٢ جدایه نماینده اندوفیت، نتایج شناسایی ریخت‌شناختی را تأیید نمود. به طوری که تعداد ٤٦ جدایه اندوفیت در قالب هشت جنس و ١٢ گونه مجزا شامل *Alternaria atrum*، *A. tenuissima*

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

Aspergillus niger، *A. kevei*، *Fusarium equiseti*، *F. oxysporum*، *F. proliferatum*، *F. solani*، *Mortierella alpina*، *Setophoma terrestris*، *Stachybotrys chartarum* و *Trichoderma longibrachiatum* شناسایی شدند. شکل ۲ تبارنمای ترسیم شده به روش حداکثر درست نمایی (ML) را نشان می‌دهد.



شکل ۱- الگوی انگشت‌نگاری DNA برخی جدایه‌های قارچی به‌دست آمده از پیاز با نشانگر ISSR روی ژل آگارز ۱٪، با استفاده از آغازگر ISSRAF80824.

Fig. 1. DNA fingerprinting pattern of some fungal isolates obtained from onion by ISSR marker on 1% agarose gel, using primer ISSRAF80824.

جدول ۳- مشخصات ۱۳ جدایه نماینده اندوفیت پیاز شناسایی شده به دو روش ریخت‌شناختی و مولکولی بر اساس تجزیه و تحلیل تبارزایی ناحیه ژنومی ITS-rDNA.

Table 3. Information of 13 representative endophytic isolates of onion identified by morphology and molecular methods based on phylogenetic analysis of ITS-rDNA genomic region.

No.	Species	Isolate	Location	Plant tissue	Accession number
1	*Aspergillus keveii*	AZFC SA-S319	Khaslu	Leaf	OQ848620
2	*Aspergillus niger*	AZFC SA-AP11	Posyan	Leaf	OQ848630
3	*Mortierella alpina*	AZFC SA-S116	Gowaravan	Leaf	OQ848621
4	*Setophoma terrestris*	AZFC SA-S175	Nansa	Leaf	OQ848622
5	*Fusarium proliferatum*	AZFC SA-AP48	Posyan	Leaf	OQ848623
6	*Fusarium oxysporum*	AZFC SA-AG90	Gowaravan	Leaf	OQ848624
7	*Fusarium equiseti*	AZFC SA-ASh269	Shiraz	Leaf	OQ848625
8	*Fusarium solani*	AZFC SA-AM349	Marjanlu	Leaf	OQ848626
9	*Alternaria tenuissima*	AZFC SA-AP70	Posyan	Leaf	OQ848627
10	*Alternari atra*	AZFC SA-AP32	Posyan	Leaf	OQ848628
11	*Trichoderma longibrachiatum*	AZFC SA-S268	Shiraz	Leaf	OQ848629
12	*Rhizoctonia solani*	AZFC SA-S245	Kordlar	Scale	OQ848631
13	*Stachybotrys chartarum*	AZFC SA.AG132	Gowaravan	Root	OQ848632

در این مطالعه از نشانگر مولکولی ISSR برای گروه‌بندی اولیه جدایه‌های قارچی همراه و اندوفیت پیاز استفاده شد. در دو دهه اخیر از این نشانگر مولکولی به‌طور گسترده برای بررسی تنوع ژنتیکی انواع قارچ‌ها استفاده شده و عملکرد موفق آن در تفکیک گونه‌ها و جمعیت‌های میزبانی و جغرافیایی قارچ‌های بیمارگر گیاهی به اثبات رسیده است (Akbarzadeh et al 2023; Alizadeh et al. 2017; Atghia et al. 2015; Behnia et al. 2016; Nazari et al. 2015; Salimi et al. 2019a, b). نتایج مطالعات فیلوژنتیکی، کارایی و کارآمدی نشانگر مولکولی ISSR در تفکیک گونه‌های مختلف قارچ‌های اندوفیت پیاز در این مطالعه را نیز به اثبات رساند.

تاکنون پژوهش‌های متعددی در سطح جهان و ایران به منظور شناسایی فلور قارچی گیاه پیاز انجام گرفته است (Sohi and Puttoo 1972, Vélez-Rodríguez and Rivera-Vargas 2007, Rabiei-Motlagh et al. 2010, Dabire et al. 2021, Jahedi et al. 2019). طی مطالعات متعددی نیز به بررسی اثرات بازدارندگی قارچ‌های اندوفیت به دست آمده از پیاز روی بیمارگرهای این

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

محصول پرداخته شده است (Akrami et al. 2009, Peyghami 2002, Ordentlich et al. 1999, Abdollahzadeh et al. 2006).

بر اساس اطلاعات موجود این مطالعه اولین گزارش از گونه *A. keveii* برای فهرست قارچ‌های ایران محسوب می‌شود. همچنین به استناد منابع، گونه‌های جنس قارچی *Trichoderma* از تواناترین و موفق‌ترین عوامل بیوکنترل بیمارگرهای گیاهی به شمار می‌آیند. لذا ذیلا به توصیف ریخت‌شناختی دو گونه اخیر پرداخته شده است.

شکل ۲- تبارنمای ترسیم شده بر اساس ناحیه ژنومی ITS برای جدایه‌های نماینده اندوفیت پیاز به روش Maximum Liklihood. اعداد بالای شاخه‌ها، نتایج اعتبارسنجی را با ۱۰۰۰ تکرار نشان می‌دهد. جدایه‌های مورد استفاده در این مطالعه با نام استرین (AZFC...) به صورت بولد در درخت تبارزایی نشان داده شده است. استرین *Pythium ultimum* ABH16 به‌عنوان گروه خارجی در این تبارنما استفاده شده است. اعداد بالای شاخه‌ها درجات اعتبارسنجی (بوت استرپ) را نشان می‌دهند. بوت استرپ‌های تبارنمای ترسیم شده با استفاده از روش‌های Maximum Liklihood و Maximum parsimony به‌ترتیب با رنگ‌های مشکی و قرمز دیده می‌شوند.

Fig. 2. Phylogram drawn based on sequence of ITS genomic region of representative endophytic isolates of onion by Maximum Likelihood method. The numbers above the branches show the bootstraps with 1000 replicates. The isolates used in this study are shown as bold strains (AZFC...) in the tree. *Pythium ultimum* strain ABH16 has been used as an out-group in this study. The numbers above the branches indicate the bootstrap. Bootstraps of the Maximum Likelihood and Maximum Parsimony methods are shown in black and red colors, respectively.

***Aspergillus keveii* Varga, Frisvad & Samson 2007 – MycoBank MB505570.**

Holotype strain: CBS 209.92, isolated from soil, Las Palmas, Spain

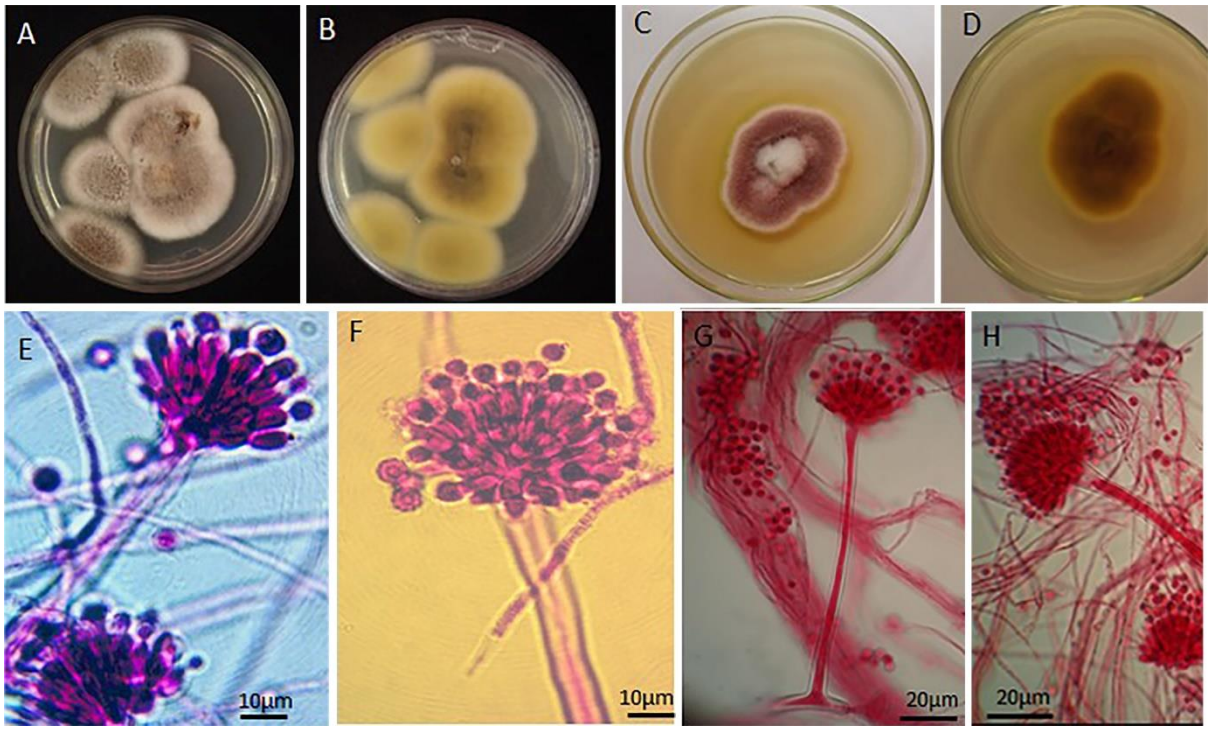
خصوصیات ریخت‌شناختی: رنگ پرگنه روی محیط کشت PDA خاکستری مایل به قهوه‌ای تا قهوه‌ای مایل به صورتی، و روی محیط کشت MEA به رنگ صورتی کم‌رنگ با لبه‌های سفید، بافت پرگنه به صورت تافت یا متشکل از موهای پشم مانند، سطح

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

تحتانی پرگنه روی محیط کشت PDA زرد قهوه‌ای زیتونی مایل به قهوه‌ای تیره، سطح تحتانی پرگنه روی محیط کشت MEA مشابه با سطح رویی مایل به زرد می‌باشد.

کنیدیوفورها راست و افراشته، با تنه‌ای (stipes) قهوه‌ای رنگ با دیواره صاف و یا موجدار به‌اندازه ۵/۵-۵ × ۲۰۰-۲۵۰ میکرومتر می‌باشند. سرهای کنیدیومی به‌صورت ستونی و سست بوده، وزیکول‌ها گلابی شکل، ۱۲-۱۱ میکرومتر، دو ردیفه (biseriate)، متولاها با ابعاد ۳/۵-۲/۵ × ٦-۵/۵ میکرومتر، فقط نیمه بالایی تا سه چهارم وزیکول را می‌پوشانند. فیالیدها ۳-۲ × ٦-۷ میکرومتر؛ کنیدیوم‌ها کروی با برجستگی‌های سطحی نسبتاً درشت، به ابعاد ٤-۵ میکرومتر می‌باشند.

ارزیابی خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌های *A. kevei* در این مطالعه نشان داد، این ویژگی‌ها با توصیف Varga, Frisvad & Samson (Houbraken et al. 2007) مطابقت کامل دارند.



شکل ۳- گونه *Aspergillus keveii*، جدایه AKh319. A) سطح رویی پرگنه روی محیط غذایی PDA. B) سطح پشتی پرگنه روی محیط غذایی PDA. C) سطح رویی پرگنه روی محیط MEA. C) سطح پشتی پرگنه روی محیط MEA. E, F, H) سرهای کنیدیومی. G) کنیدیوفور.

Fig. 3. *Aspergillus keveii* species, isolate AKh319. A) The surface of colony on the PDA culture medium. B) The bottom of the colony on PDA culture medium. C) The surface of colony on the MEA culture medium. C) The bottom of the colony on the MEA culture medium. E, F, H) conidial heads. G) Conidiophore.

اطلاعات فیلوژنی: بر اساس فیلوژنی مولکولی این گونه در بخش (section) Usti از جنس *Aspergillus* قرار می‌گیرد (Houbraken et al. 2007). این بخش شامل چهار سری (series) Calidousti، Deflecti، Monodiorum و Usti می‌باشد. یازده گونه اعم از *A. asper*، *A. calidoustus*، *A. carlsbadensis*، *A.germanicus*، *A. insuetu*، *A. kevei*، *A. keveioides*، *A. monodii*، *A. pseudodeflectus*، *A. thesauricus* و *A. sigarelli* در این سری قرار می‌گیرند (Da Sun et al. 2020). در این مطالعه ناحیه ژنومی ITS به‌خوبی توانست این گونه را از سایر گونه‌های نزدیک قرار گرفته در این بخش تفکیک نماید. این نتیجه تأییدکننده نتایج Da Sun و همکاران (Da Sun et al. 2020) می‌باشد که بیان داشتند توالی ناحیه ITS برای دو گونه *A. kevei* و *A. sigarelli* منحصربه‌فرد است. بر اساس آزمون مشابهت‌یابی در بانک ژن (blast) جدایه مورد آزمون (AZFC SA-S319) بیشترین شباهت ژنتیکی به میزان ۱۰۰٪ را با *A. keveii* strain AUMC 14299 نشان داد. در این آزمون شباهت ژنتیکی به دست آمده با استرین تیپ گونه (CBS 209.92) مقدار ۹۹/۸٪ به دست آمد. در هر سه تبارنمای ترسیم شده به روش‌های ML، MP و NJ جدایه

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

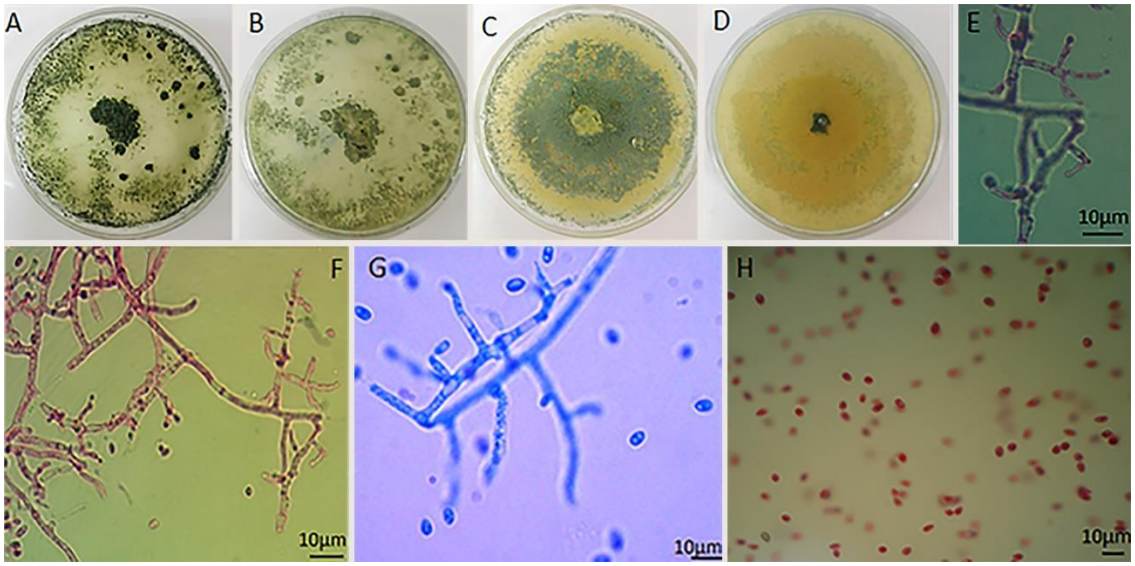
AZFC SA-S319 با درجات اعتبارسنجی بترتیب ۸۲٪، ۹۸٪ و ۹۵٪ به همراه جدایه تیپ گونه (CBS 209.92) و تعدادی از جدایه‌های معتبر گونه در یک کلاد قرار گرفت. گونه نزدیک به این گونه *A. insetus* می‌باشد. هر دو گونه بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی و توالی ناحیه ITS از هم تفکیک می‌شوند.

اهمیت و پراکنش: تاکنون این گونه از هوای داخل ساختمان، لاستیک، مصالح ساختمانی و از انسان جداسازی و شناسایی شده است. این گونه در کشورهای ترکیه، فنلاند، آلمان و ایالات متحده آمریکا پراکنش دارد (Farr and Rossman 2021). بیماری‌زایی این گونه روی انسان و یا سایر موجودات زنده هنوز گزارش نشده است. بر اساس اطلاعات موجود این اولین گزارش از وجود گونه *A. kevei* برای میکوبیوتای ایران است. همچنین گیاه پیاز به‌عنوان میزبان جدیدی برای این اندوفیت محسوب می‌گردد.

***Trichoderma longibrachiatum* Rifai, Mycol. Pap. 116: 42 (1969)**

خصوصیات ریخت‌شناختی: پرگنه روی محیط کشت PDA به رنگ سبز تیره و سطح زیرین به رنگ سبز زرد، اندازه قطر پرگنه ۶۰ میلی‌متر بعد از گذشت هفت روز می‌باشد. قطر پرگنه روی محیط کشت MEA نیز به رنگ سبز مایل به زرد و سطح پشتی زرد مایل به نارنجی، اندازه قطر پرگنه بیش از ۶۰ میلی‌متر پس از هفت روز است. کنیدیوفورها بلند و دارای انشعابات کم و نامنظم می‌باشند و اغلب با محور اصلی تشکیل زاویه قائمه می‌دهند. فیالیدها به شکل استوانه‌ای تا سیلندری و به‌صورت منفرد و گاهی به‌صورت دسته‌های دوتایی و سه تایی در انتهای کنیدیوفورها تشکیل می‌شوند. فیالیدها به ابعاد ۲-۱ × ۱۰-۵ میکرومتر، کنیدیوم‌ها تخم‌مرغی و بیضوی دارای سطح صاف و در اندازه ۳-۲ × ۴-۳ میکرومتر می‌باشند. کلامیدوسپور به‌صورت بی‌رنگ و فراوان و به شکل کروی در میان هیف‌ها مشاهده می شود (شکل ۴). خصوصیات ریخت‌شناختی جدایه‌های گونه *T. longibrachiatum* در این مطالعه با ویژگی‌های ذکر شده در مطالعه Ghasemi esfahlan و همکاران (Ghasemi esfahlan et al. 2017) مطابقت کامل دارد.

اهمیت: گونه *Trichoderma longibrachiatum* به‌عنوان عامل بیوکنترلی قوی علیه بسیاری از بیمارگرهای گیاهی از جمله نماتدها استفاده می‌شود (Zhang et al 2015). علاوه بر این، این قارچ توانایی تولید آنزیم سلولاز را دارا می‌باشد (Pachauri et al. 2017).



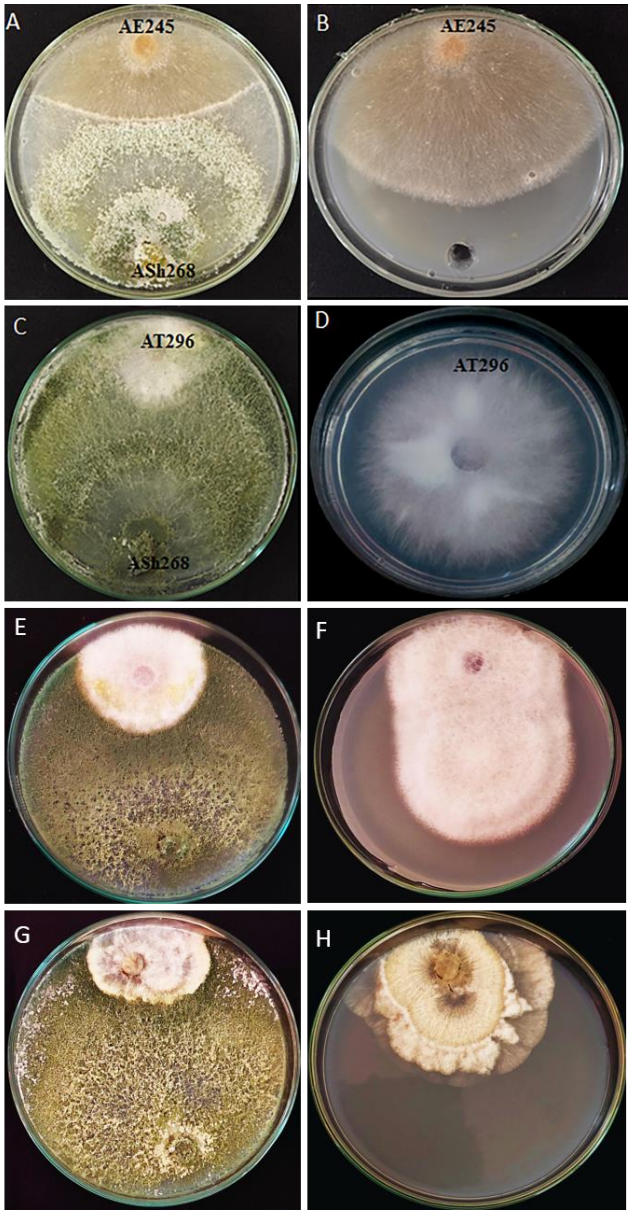
شکل ۴- گونه *Trichoderma longibrachiatum*، استرین ASh268. A) سطح رویی پرگنه روی محیط غذایی PDA. B) سطح پشتی پرگنه روی محیط غذایی PDA. C) سطح رویی پرگنه روی محیط MEA. D) سطح پشتی پرگنه روی محیط MEA. E-G) کنیدیوفورها. H) کنیدیوم‌ها.

Fig. 4. *Trichoderma longibrachiatum*, strain ASh268. A) The surface of colony on the PDA nutrient medium. B) The bottom of colony on PDA nutrient medium. C) The surface of colony on the MEA environment. D) The bottom of colony on the MEA environment. E-G) Conidiophores. H) Conidia.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

در ایران این قارچ اولین بار توسط رضایی دانش و همکاران از روی قارچ خوراکی گزارش شده است (Ershad 2009). همین‌طور این قارچ توسط قاسمی اسفهلان و همکاران به‌عنوان قارچ اندوفیت از درختان بلوط شناسایی و گزارش شده است (Ghasemi esfahlan et al. 2017). این گونه اولین بار از روی گیاه پیاز به‌عنوان قارچ اندوفیت در دنیا و ایران گزارش می‌شود.

آزمون بازدارندگی جدایه اندوفیت منتخب علیه برخی بیمارگرهای گیاهی: نتایج آزمون اثر بازدارندگی جدایه اندوفیت *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 روی رشد چند جدایه قارچی بیمارگر شامل *Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani* و *Setophoma terrestris* نشان داد این استرین بازدارندگی قابل توجهی در برابر رشد بیمارگرهای قارچی فوق دارد و به‌طور معنی‌داری باعث کاهش رشد پرگنه همه بیمارگرهای فوق می‌شود. جدول ٤ نتایج قطر رشد پرگنه و جدول ٥ نتایج بازدارندگی استرین *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 را نشان می‌دهد. بر این اساس، بیشترین اثر بازدارندگی این استرین در برابر بیمارگر *Fusarium oxysporum* و کمترین اثر بازدارندگی در برابر *Setophoma terrestris* مشاهده شد.



شکل ٥- آزمون ارزیابی اثر بازدارندگی رشد *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 علیه بیمارگرهای *Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani* و *Setophoma terrestris*. A) اثر بازدارندگی رشد استرین Ash268 روی قارچ *Rhizoctonia solani*. B) شاهد: رشد قارچ *R. solani* روی محیط غذایی PDA. C) اثر بازدارندگی رشد استرین Ash268 روی قارچ *Fusarium oxysporum*. D) شاهد: رشد قارچ *F. oxysporum* روی محیط غذایی PDA. E) اثر بازدارندگی رشد استرین Ash268 روی قارچ *Fusarium solani*. F) شاهد: رشد قارچ *F. solani* روی محیط غذایی PDA. G) اثر بازدارندگی رشد استرین Ash268 روی قارچ *Setophoma terrestris*. H) شاهد: رشد قارچ *S. terrestris* روی محیط غذایی PDA.

Fig. 5. The evaluation of growth inhibition effect of *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 against *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani and Setophoma terrestris*. A) Growth inhibitory effect of strain Ash268 on *Rhizoctonia solani*. B) Control: growth of *R. solani* on PDA. C) Growth inhibitory effect of strain Ash268 on *Fusarium oxysporum*. D) Control: growth of *F. oxysporum* on PDA. E) Growth inhibitory effect of strain Ash268 on *Fusarium solani*. F) Control: growth of *F. solani* fungus on PDA. G) Growth inhibitory effect of strain Ash268 on *Setophoma terrestris*. H) Control: growth of *S. terrestris* on PDA.

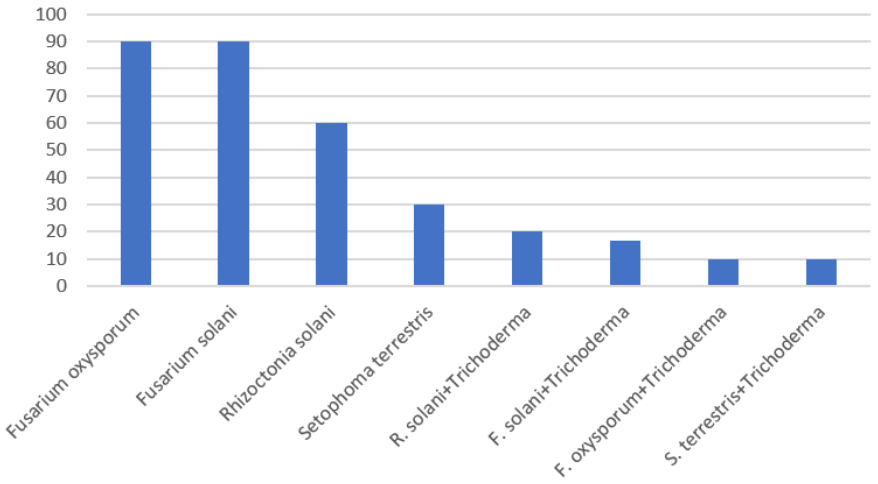
[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

جدول ٤- مقایسه میانگین قطر رشدی پرگنه بیمارگرهای *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani*، *Rhizoctonia solani* و *Setophoma terrestris* در کشت متقابل با *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس شش روز پس از کشت (بر حسب میلی‌متر).

Table 4. Comparison of average growth diameter of *Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Rhizoctonia solani and Setophoma terrestris* pathogens in dual-culture with *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 on PDA at 25°C six days after cultivation (in millimeters).

Setophoma terrestris	*Rhizoctonia solani*	*Fusarium solani*	*Fusarium oxysporum*	
30	57	89	90	**Control**
13.4	24	16.4	14.6	**Dual culture with *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268**
0.29	0.25	0.14	0	**Stdv.**



شکل ٦- مقایسه میانگین قطر رشدی پرگنه بیمارگرهای *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani*، *Rhizoctonia solani* و *Setophoma terrestris* به‌تنهایی و در آزمون کشت متقابل با *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس شش روز پس از کشت (بر حسب میلی‌متر).

Fig. 6. Comparison of the average growth diameter of the colonies of *Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Rhizoctonia solani* and *Setophoma terrestris* pathogens alone and in dual-culture test with *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 on PDA culture medium at 25°C six days after cultivation (in millimeters).

جدول ٥- مقایسه بازدارندگی رشد بیمارگرهای *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani*، *Rhizoctonia solani* و *Setophoma terrestris* توسط *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 در کشت متقابل روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس شش روز پس از کشت (بر حسب میلی‌متر).

Table 5. Comparison of growth inhibition of *Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Rhizoctonia solani* and *Setophoma terrestris by Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 in dual-culture with PDA medium at 25°C six days after cultivation (in mm).

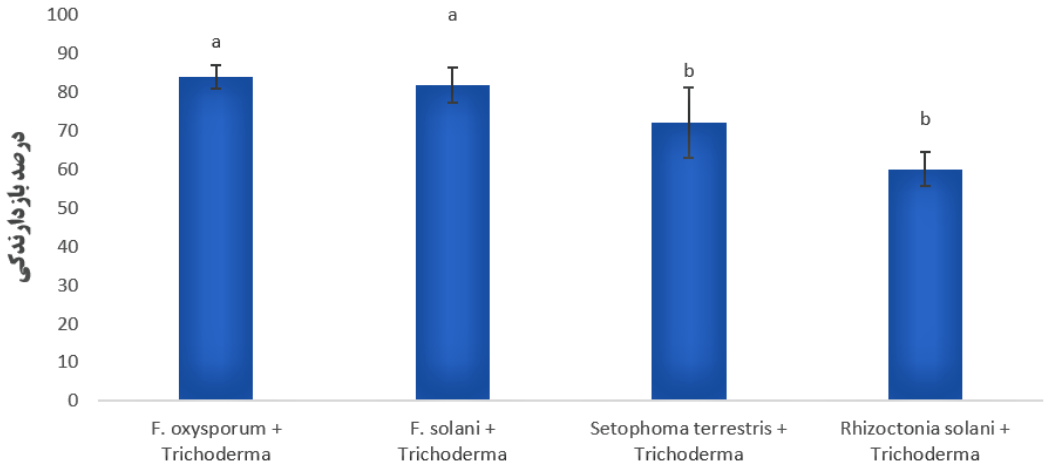
Setophoma terrestris	*Rhizoctonia solani*	*Fusarium solani*	*Fusarium oxysporum*	
72	60	81.7	83.7	**Inhibition percentage by *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268**
b	b	a	a	**Statistical group**
4.409586	9.006171	4.621474	3.002057	**LSD (0.05)**

- *اعداد با حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ می‌باشند.

بازدارندگی استرین‌های مختلف گونه‌های مختلف *Trichoderma* علیه بیمارگرهای گیاهی و همچنین حشرات زیان آور گیاهان توسط محققین مختلف گزارش شده است. Peyghami (2002) در طی پژوهشی عملکرد مطلوب دو گونه مختلف شامل *T. harzianum* و *T. tomentosum* در بازدارندگی رشد بیمارگر ریشه گندم *Fusarium semitectum* را به اثبات رساند. Ordentlich و همکاران (1999) با بررسی اثر بازدارندگی سه سویه مختلف *Trichoderma* علیه دو بیمارگر *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* و *F. oxysporum* f. sp. *vasinfectum* به روش کشت متقابل متوجه شدند بین استرین‌های مختلف تفاوت معنی‌دار وجود دارد. به طوری که استرین‌های T-68 و Gh-2 موفق به پارازیته کردن و پوشاندن سطح پرگنه هر دو

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

بیماگر فوق شدند. در صورتی که استرین T-35 در پارازیته کردن بیمارگرهای ذکر شده موفق نبود. در آزمایشات گلخانه‌ای نیز هر سه استرین *Trichoderma* در کنترل پژمردگی فوزاریومی پنبه موثر بودند، ولی فقط استرین T-35 قادر به کاهش موثر بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه ناشی از *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* بود.



شکل ۷- مقایسه بازدارندگی رشد چهار بیمارگر قارچی *Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum*، *Fusarium solani* و *Setophoma terrestris*. توسط *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 در آزمون کشت متقابل روی محیط غذایی PDA - * اعداد با حروف مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵٪ می‌باشند.

Fig. 7. Comparison of growth inhibition of four fungal pathogens *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* and *Setophoma terrestris* by *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 in dual-culture assay on PDA medium-.* Numbers with similar letters in each column indicate the absence of statistically significant differences at the 5% level.

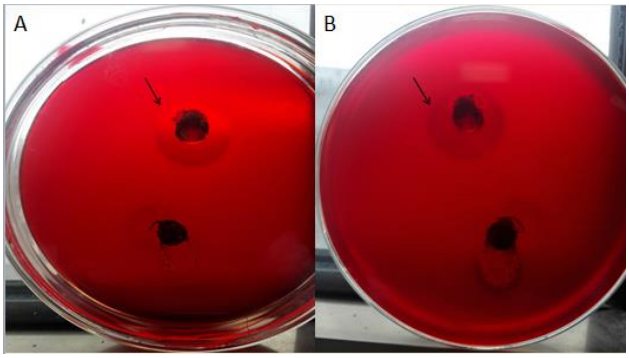
عبداله زاده و همکاران (Abdollahzadeh et al. 2006) با بررسی تعدادی از جدایه‌های *Trichoderma* پی بردند دو استرین مربوط به گونه‌های *T. viridae* و *T. harzianum strain* J6 از نظر قدرت رقابت ساپروفیتی موفق‌تر از سایر جدایه‌های عمل می‌کنند. این محققین مشاهده نمودند دو استرین ذکر شده به‌ترتیب پس از پنج و شش روز قادر به پوشاندن سطح پرگنه *Sclerotinia sclerotiorum* بوده و از تشکیل اسکلروت در آن جلوگیری می‌نمایند. Thangavelu و همکاران (Thangavelu et al. 2004) نیز مشاهده نمودند استرین *T. harzianum* Th-10 نسبت به سایر استرین‌ها از قدرت بیشتری در ممانعت از رشد جدایه‌های *Fusarium* sp. برخوردار است. Akrami و همکاران (Akrami et al. 2009) با ارزیابی قدرت بیوکنترلی گونه‌های مختلف *Trichoderma* در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی لوبیا پی بردند کاربرد هم‌زمان استرین‌های متعلق به گونه‌های مختلف، بازدارندگی بیشتری نسبت به کاربرد جداگانه هر کدام از این آنتاگونیست‌ها دارد. Khodaei و همکاران (Khodaei et al. 2015) با بررسی اثر بازدارندگی سه گونه مختلف از *Trichoderma* شامل *T. longibrachiatum*، *T. harzianum* و *T. tomentosum* روی رشد سه گونه متفاوت از *Fusarium* شامل *F. semitectum*، *F. moniliforme* و *F. solani* با دو روش کشت متقابل آنتاگونیست و قارچ بیمارگر و همچنین تأثیر مواد فرار عوامل آنتاگونیست روی محیط غذایی در شرایط آزمایشگاهی پی بردند برهمکنش‌های گونه‌های مختلف *Trichoderma* با گونه‌های مختلف *Fusarium* متفاوت است. به‌طوری‌که در آزمون کشت متقابل بیشترین اثر بازدارندگی توسط *T. harzianum* روی *F. moniliforme* و کمترین اثر بازدارندگی توسط *T. tomentosum* روی *F. solani* مشاهده شد. نتایج آزمون اثر ترکیبات فرار نیز نشان داد بیشترین بازدارندگی مربوط به اثر *T. tomentosum* روی *F. solani* و کمترین بازدارندگی مربوط به *T. tomentosum* روی *T. semitectum* می‌باشد. عظیمی و همکاران (Azimi et al. 2021) نشان دادند، تیمار گیاهان باقلا با قارچ *Trichoderma* می‌تواند در کاهش جمعیت شته سیاه باقلا موثر واقع شود. نتایج پژوهش حاضر نیز نشان داد استرین *T. longibrachiatum* ASh268 دارای قدرت بازدارندگی متفاوتی در برابر بیمارگرهای

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

مختلف می‌باشد. استرین‌های *Trichoderma* از موفق‌ترین آنتاگونیست‌های تجاری‌سازی شده می‌باشند که به طور گسترده در سطح جهانی علیه بیمارگرهای گیاهی در سطح گلخانه و مزرعه مورد استفاده قرار می‌گیرند. با توجه به نتایج پژوهش حاضر و پژوهش‌های پیشین، انجام آزمون‌های اختصاصی علیه هر کدام از بیمارگرهای گیاهی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه حائز اهمیت است.

آزمون تولید آنزیم سلولاز توسط جدایه اندوفیت منتخب

آزمون ارزیابی توانایی تولید آنزیم سلولاز توسط استرین اندوفیت *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 که به پیروی از روش Pachauri و همکاران (Pachauri et al. 2017) روی محیط غذایی کربوکسی متیل سلولز (CMC) انجام شد نشان داد این استرین قارچی توانایی تولید آنزیم سلولاز را در محیط کربوکسی متیل سلولز (CMC) دارا می‌باشد. به طوری‌که قطر هاله‌ای که نشان‌دهنده تولید آنزیم سلولاز بود، به‌اندازه ۲۰ میلی‌متر روی این محیط کشت تشکیل شد (شکل ۸).



شکل ۸- آزمون تولید سلولاز توسط قارچ اندوفیت *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268. هاله تشکیل شده روی محیط CMC. A) سطح رویی محیط کشت. B) سطح پشتی محیط کشت.

Fig. 8. Cellulase production assay by the endophytic fungus *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 on CMC medium. A) The upper surface of the culture medium. B) Back surface of culture medium.

قارچ‌ها به دلیل تولید مقادیر زیاد از آنزیم‌های سلولیتیک همواره در صنعت مورد توجه بوده‌اند. آنزیم‌های با خاصیت سلولیتیکی از جمله سلولازها از مهم‌ترین آنزیم‌ها می‌باشند که در بیوکنترل عوامل بیمارگر توسط میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست ایفای نقش می‌نمایند. انواع مختلفی از قارچ‌ها از جمله گونه‌هایی از *Aspergillus*، *Fusarium*، *Neurospora*، *Thermomonospora*، *Penicillium*، *Trichoderma* و تعدادی دیگر قادر به تولید این گروه از آنزیم‌ها می‌باشند، ولی تولید این آنزیم‌ها توسط گونه‌های جنس *Trichoderma* بدلیل توانایی بالای آن‌ها در بیوکنترل عوامل بیمارگر گیاهی پراهمیت‌تر می‌باشد (Cherkupally et al. 2017). گونه‌های *Trichoderma viride* و *T. reesei* مهم‌ترین گونه‌های شناخته شده برای تولید صنعتی آنزیم‌های سلولاز هستند (Goyal et al. 1991; Schuster et al. 2010). جستجو برای یافتن استرین-های با توانایی تولید سلولاز بیشتر، با هدف دستیابی به استرین‌های با قابلیت بیشتر بیوکنترلی، همواره مورد توجه بوده است (Imran et al 2016). تحقیقات پیشین نیز نشان می‌دهد قارچ‌های اندوفیت گیاهی از توانایی زیادی در تولید متابولیت‌های قارچی و توانایی بیوکنترل عوامل بیمارگر گیاهی برخوردار می‌باشند (Latz et al. 2018). در این پژوهش، تولید آنزیم سلولاز توسط استرین اندوفیت *Trichoderma longibrachiatum* strain ASh268 به اثبات رسید. همچنین نتایج نشان داد این استرین از توانایی بالایی در بازدارندگی از رشد چهار بیمارگر قارچی روی محیط کشت برخوردار است. اگرچه سایر مکانیسم‌های بیوکنترلی نظیر آنتی‌بیوز، تولید آنزیم‌های کیتیناز، توانایی بالا در رشد و رقابت برای محل و غیره نیز به‌عنوان مکانیسم‌های دخیل در بیوکنترل بیمارگرها توسط گونه‌های *Trichoderma* برشمرده شده‌اند، با این حال بخشی از بازدارندگی رشد چهار بیمارگر در این مطالعه را می‌توان به توانایی تولید آنزیم سلولاز و برخی ترکیبات بازدارنده توسط استرین اندوفیت *T. longibrachiatum* strain ASh268 ارتباط داد. تحقیقات بیشتر به‌منظور ارزیابی شایستگی این استرین در شرایط گلخانه و سپس فرمانتاسیون با هدف بکارگیری در راهبرد کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی، ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از جناب آقای دکتر وحید فلاح زاده ممقانی، دانشیار گروه گیاهپزشکی دانشگاه شهید مدنی آذربایجان به دلیل مساعدت در انجام آنالیزهای آماری و پیشنهادات ارزنده‌شان در روند انجام پروژه تشکر و قدردانی می‌نمایند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

منابع

Abdollahzadeh, J., & Goltapeh, E. M. (2006). Biological control of Sclerotinia stem rot (S. minor) of sunflower using Trichoderma species. *Plant Pathology Journal*, 79: 43-56. doi: 10.3923/ppj.2006.228.232

Akbarzadeh, S., Alizadeh, A., Ahmadpour, A., & Shirzad, A. (2023). Genetic diversity of Colletotrichum fructicola isolates using ISSR molecular marker and efficiency of this technique in differentiating this species from several Colletotrichum species. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, *11*(4), 43-61. doi. 10.22034/arpp.2022.15600

Akrami, M., Golzary, H., & Ahmadzadeh, M. (2011). Evaluation of different combinations of Trichoderma species for controlling Fusarium rot of lentil. *African Journal of Biotechnology*, *10*(14), 2653-2658. doi: 10.5897/AJB10.1274

Alizadeh, A., Akbarzadeh, S., & Shirzad, A. (2021). Cephalotrichum asperulum and C. gorgonifer, two synnematous species from pistachio in Iran. *Mycologia Iranica*, *8*(1), 1-9. doi: 10.22034/IJPP.2020.241966

Alizadeh, A., Javan-Nikkhah, M., Nourmohammadi Nazarian, R., Liu, F., Zare, R., Fotouhifar, K. B., ... & Damm, U. (2022). New species of Colletotrichum from wild Poaceae and Cyperaceae plants in Iran. *Mycologia*, *114*(1), 89-113. doi: 10.1080/00275514.2021.2008765

Alizadeh, A., Javan-Nikkhah, M., Salehi Jozani, G. R., Fotouhifar, K., Roodbar Shojaei, T., Rahjoo, V., & Taherkhani, K. (2017). AFLP, pathogenicity and mating type analysis of Iranian Fusarium proliferatum isolates recovered from maize, rice, sugarcane and onion. *Mycologia Iranica*, *4*(1), 13-28. doi: 10.22043/mi.2017.115180

Alizadeh, A., Javan-Nikkhah, M., Zare, R., Fotouhifar, K. B., Damm, U., & Stukenbrock, E. H. (2015). New records of Colletotrichum species for the mycobiota of Iran. *Mycologia Iranica*, *2*(2), 95-109. doi: 10.22043/mi.2015.19967

Aly, A. H., Debbab, A., & Proksch, P. (2011). Fungal endophytes: unique plant inhabitants with great promises. *Applied microbiology and biotechnology*, *90*, 1829-1845. doi: 10.1007/s00253-011-3270-y

Atghia, O., Alizadeh, A., Fotouhifar, K. B., Damm, U., Stukenbrock, E. H., & Javan-Nikkhah, M. (2015). First report of Colletotrichum fructicola as the causal agent of anthracnose on common bean and cowpea. *Mycologia Iranica*, *2*(2), 139-140. doi: 10.22043/mi.2015.19966

Attri, B. L., Narayan, R., Ahmed, N., Mer, M. S., & Kumar, A. (2015). Evaluation of Onion (Alium Cepa L.) Genotypes For Growth, Yield and Quality Under Mukteshwar Conditions. *Progressive Agriculture*, *15*(2), 272-276. doi: 10.5958/0976-4615.2015.00017.4

Azimi, S., Shahin, S., & Alizadeh, A. (2021). Evaluation of bean plant treatment with Trichoderma harzianum TR6 on the biology of bean aphid Aphis fabae. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, *10*(1), 1-16. doi: 10.22034/ARPP.2021.12443

Behnia, M., JAVAN, N. M., Aminian, H., Razavi, M., & Alizadeh, A. (2016). Population structure and sexual fertility of Colletotrichum gloeosporioides sensu lato from citrus in Northern Iran.

Cherkupally, R., Amballa, H., & Reddy, B. N. (2017). In vitro screening for enzymatic activity of Trichoderma species for biocontrol potential. *Ann. Plant Sci*, *6*, 1784-1789. doi: 10.21746/aps.2017.6.11.11

Dabire, T. G., Neya, B. F., Somda, I., & Legreve, A. (2021). Pathogenicity study of some seed-borne fungi of onion (Allium cepa L.) from Burkina Faso. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, *15*(3), 1062-1072. doi: 10.4314/ijbcs.v15i3.17

Dennis, C., & Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, *57*(1), 25-IN3. doi: 10.1016/S0007-1536(71)80077-3

Ershad, D. (2009). Fungi of Iran. 3rd ed. Agricultural Research, Education and Extension Organization Publishing, Iran (In Farsi with English abstract).

Farr, D. F., & Rossman, A. Y. 2021. Fungal databases US National fungus collections ARS USDA [Retrieved August 3 2021] Available online at https://ntars-gringov/ fungaldatabases/.

Ghasemi Esfahlan, S., Arzanluou, M., & Babaei Ahari, A. (2017). Identification of endophytic Trichoderma species from oak trees in Arasbaran forests using morphological and molecular characteristics. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, *6*(3), 53-66.

Goyal, A., Ghosh, B., & Eveleigh, D. (1991). Characteristics of fungal cellulases. *Bioresource Technology*, *36*(1), 37-50. doi. 10.1016/0960-8524(91)90098-5

Houbraken, J., Due, M., Varga, J., Meijer, M., Frisvad, J. C., & Samson, R. A. (2007). Polyphasic taxonomy of Aspergillus section Usti. *Studies in Mycology*, *59*(1), 107-128. doi: 10.3114/sim.2007.59.12

Imran, M., Anwar, Z., Irshad, M., Asad, M. J., & Ashfaq, H. (2016). Cellulase production from species of fungi and bacteria from agricultural wastes and its utilization in industry: a review. *Advances in Enzyme Research* 4: 44-55. doi: 10.4236/aer.2016.42005

Jahedi, A., Safaie, N., & Goltapeh, E. M. (2019). Fusarium avenaceum and Fusarium crookwellens cause onion basal rot in Iran. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, *52*(9-10), 953-968. doi: 10.1080/03235408.2019.1672913

Kermajany, Z., Jamali Zavareh, A., & Fadaei Tehrani, A. (2017). In vitro inhibitory effects of five strains of Trichoderma on the growth of Fusarium oxysporum f. sp. dianthi. *Biological control of Pests and Plant Diseases*, *6*(1), 121-125. doi: 10.22059/jbioc.2017.63360

Khodaei, A., Arzanlou, M., & Babai Ahari, A. (2015). Inhibitory effects of three Trichoderma species against three species of

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]

Fusarium in laboratory conditions. *Journal of Agricultural Science and Sustainable production*, *22*(4.1), 105-115.

Klich, M. A. (2002). Identification of common Aspergillus species. CBS, Utrecht, Netherlands 116pp.

Latz, M. A., Jensen, B., Collinge, D. B., & Jørgensen, H. J. (2018). Endophytic fungi as biocontrol agents: elucidating mechanisms in disease suppression. *Plant Ecology & Diversity*, *11*(5-6), 555-567. doi: 10.1080/17550874.2018.1534146

Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2008). *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons.

Marasas, W. F. O., Nelson, P. E., & Toussoun, T. A. (1984). *Toxigenic Fusarium species. Identity and mycotoxicology*. Pennsylvania State University. doi: 10.1080/00275514.2018.1519773

Nazari, S., Javan-Nikkhah, M., Fotouhifar, K. B., Khosravi, V., & Alizadeh, A. (2015). Bipolaris species associated with rice plant: pathogenicity and genetic diversity of Bipolaris oryzae using rep-PCR in Mazandaran province of Iran. *Journal of Crop Protection*, *4*(4), 497-508.

Pachauri, P., V, A., More, S., Sullia, S. B., & Deshmukh, S. (2020). Purification and characterization of cellulase from a novel isolate of Trichoderma longibrachiatum. *Biofuels*, *11*(1), 85-91. doi: 10.1080/17597269.2017.1345357

Rabiei-Motlagh, E., Falahati-Rastegar, M., Rouhani, H., Jafarpour, B., & Jahanbakhsh, V. (2010). Root diseases of onion caused by some root colonizing fungi in northeast of Iran. *American-Eurasian Journal of Agricultural and Environmental Science*, *7*(4), 484-491.

Salimi, F., Alizadeh, A., Mirzadi Gohari, A., & Javan-Nikkhah, M. (2019a). Endophytic fungus, Radulidium subulatum from Phragmites australis in Iran. *Mycologia Iranica*, *6*(1), 41-47. doi: 10.22043/MI.2020.120790

Salimi, F., Javan-Nikkhah, M., Padasht Dehkayi, F., Alizadeh, A., Soltanlu, H., & Yousefirad, S. (2019b). Dynamic of Pyricularia oryzae at the two stages, leaf, and panicle neck blast based on the assessment of population structure at leaf, tiller, and field levels. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, *49*(2). doi: 10.22059/ijpps.2018.214616.1006733

Samuel, O., & Ifeanyi, O. (2015). Fungi associated with the deterioration of post-harvest onion bulbs sold in some markets in Awka, Nigeria. *Bioeng Biosci*, *3*, 90-94. doi: 10.13189/bb.2015.030503

Schulz, B., & Boyle, C. (2005). The endophytic continuum. *Mycological research*, *109*(6), 661-686. doi: 10.1017/s095375620500273x

Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of Trichoderma. *Applied microbiology and biotechnology*, *87*, 787-799. doi: 10.1007/s00253-010-2632-1

Schwartz, H. F., & Mohan, S. K. (2007). Compendium of onion and garlic diseases and pests. *Compendium of onion and garlic diseases and pests.*, APS Press, St. Paul, MN, USA, 54 pp. doi: 10.1094/9780890545003

Shedeed, S. I., El-Sayed, S. A. A., & Bash, D. A. (2014). Effectiveness of bio-fertilizers with organic matter on the growth, yield and nutrient content of onion (Allium cepa L.) plants. *European International Journal of Science and Technology*, *3*(9), 115-122.

Simmons, E. G. (2007). Alternaria: An Indentification Manual. CBS Fungal Biodiversity Center, Utrecht, Netherland.

Sivanesan, A. (1987). *Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their teleomorphs*. CAB International, London, England.

Sobhy, I. I., AH, A. E. K., & Abdel-Rahim, I. R. (2013). Effect of certain plant extracts to control purple blotch disease of onion plants (Allium cepa L.). Upas. *J Plant Physiol Pathol 1*, *4*, 2. doi: 10.4172/2329-955X.1000111

Sohi, H. S., & Puttoo, B. L. (1972). Studies on the fungal flora of onion (Allium cepa L.) seeds. *Indian Journal of Horticulture*, *29*(2), 231-234.

Sun, B. D., Houbraken, J., Frisvad, J. C., Jiang, X. Z., Chen, A. J., & Samson, R. A. (2020). New species in Aspergillus section Usti and an overview of Aspergillus section Cavernicolarum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *70*(10), 5401-5416. doi: 10.1099/ijsem.0.004425

Swati, D., Damayanti, G., & Potdukhe, S. R. (2011). Survey of seed borne fungi of onion (Allium cepa L.) from various locations of Maharashtra. *Journal of Soils and Crops*, *21*(2), 221-224.

Thangavelu, R., Palaniswami, A., & Velazhahan, R. (2004). Mass production of Trichoderma harzianum for managing fusarium wilt of banana. *Agriculture, ecosystems & environment*, *103*(1), 259-263. doi: 10.1016/j.agee.2003.09.026

Vélez-Rodríguez, L., & Rivera-Vargas, L. I. (2007). Recent studies of fungal pathogens of onion in Puerto Rico. *Journal of Agriculture-University of Puerto Rico*, *91*(1/2), 31. doi: 10.46429/jaupr.v91i1-2.2651

Waqas, M., Khan, A. L., Hamayun, M., Shahzad, R., Kang, S. M., Kim, J. G., & Lee, I. J. (2015). Endophytic fungi promote plant growth and mitigate the adverse effects of stem rot: an example of Penicillium citrinum and Aspergillus terreus. *Journal of plant interactions*, *10*(1), 280-287. doi: 10.1080/17429145.2015.1079743

White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, *18*(1), 315-322. doi: 10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1

Zhang, S., Gan, Y., & Xu, B. (2015). Biocontrol potential of a native species of Trichoderma longibrachiatum against Meloidogyne incognita. *Applied Soil Ecology*, *94*, 21-29. doi: 10.1016/j.apsoil.2015.04.010

Zhong, S., & Steffenson, B. J. (2001). Virulence and molecular diversity in Cochliobolus sativus. *Phytopathology*, *91*(5), 469-476. doi: 10.1094/PHYTO.2001.91.5.469

Zohri, A. A., Sabah, A. M., & Abdel-Gawad, K. M. (1992). Fungal flora and mycotoxins associated with onion (Allium cepa L.) in Egypt. *The Korean Journal of Mycology*, *20*(4), 302-308.

[Downloaded from gebsj.ir on 2025-08-16]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1402.12.1.5.9]