دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
بوم‌شناسی جنگل‌های ایران

"مقاله پژوهشی"

نقش قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از سرخدار بومی ایران (*Taxus baccata*) در کنترل زیستی قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum*

محبوبه آشناور[۱]، عظیم قاسم‌نژاد[۲]، کامران رهنما[۳] و مصطفی خوشحال سرمست[۴]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران (نویسنده مسوول: ghasemnezhad@gau.ac.ir)
۳- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
۴- استادیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۹/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۱
صفحه: ۱ تا ۱۰

چکیده مبسوط

مقدمه: درخت سرخدار از سوزنی‌برگان بومی ایران است. این گیاه منبع اصلی داروی ضد سرطان تاکسول می‌باشد. تحقیقات نشان داده که سرخدار با قارچ‌های درون‌زی همزیستی دارد. این اندوفیت‌ها با تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که در اختیار میزبان خود قرار می‌دهند سبب افزایش دسترسی مواد غذایی، مقاومت به آفات، بیماری‌ها و تنش‌های محیطی می‌شوند. جداسازی و توصیف این نوع از ریزجانداران می‌تواند در جهت کشف گونه‌های جدیدی با پتانسیل تولید ترکیبات ضدمیکروبی مهم باشد. بنابراین، پژوهش حاضر به منظور بررسی تأثیر قارچ‌کش‌های سیستمیک و اثرات آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از سرخدار علیه قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* صورت پذیرفت.

مواد و روش‌ها: این پژوهش در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام شد. برای جداسازی اندوفیت‌ها از دو گروه از گیاهان استفاده شد که شامل گیاهان تیمار شده با قارچکش سیستمیک (رورال-TS و فوزتیل آلومینیوم) و شاهد بود. اعمال تیمارها به صورت محلول‌پاشی برگی و در سه دوره به فاصله هفت روز انجام گردید. پس از اتمام محلول‌پاشی، از بخش‌های ریشه، ساقه و برگ گیاهان آزمایشی جهت جداسازی اندوفیت استفاده شد. از اندوفیت‌های جداسازی شده منتخب نیز جهت تعیین درصد بازدارندگی علیه بیمارگر *F. oxysporum* استفاده شد. در نهایت شناسایی مولکولی سویه‌های منتخب و تأثیرگذار از قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده انجام شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که تمامی قارچ‌های اندوفیت جداشده از گیاهان سرخدار دارای قدرت مهار رشد بیمارگر بودند. بر اساس بررسی‌های مولکولی، پنج سویه از قارچ‌های اندوفیت شناسایی شده متعلق به جنس‌های *Fusarium*، *Phomopsis* و *Colletotrichum* بودند. قارچ‌های شناسایی شده از نمونه‌های گیاهی که با قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم تیمار شدند، بیشترین تأثیر بازدارندگی را نشان دادند. از بین قارچ‌های شناسایی شده، قارچ *Fusarium solani* با ۷۱/۸۱ درصد مهارکنندگی، بالاترین قدرت بازدارندگی را داشت که از سرخدار تیمار شده با قارچ‌کش سیستمیک رورال-TS به‌دست آمد. کمترین میزان بازدارندگی با درصد بازداری ۱۲/۹۷ در قارچ اندوفیت *Phomopsis sp.* جداسازی شده از گیاهان شاهد حاصل شد.

نتیجه‌گیری: با استناد به نتایج، قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از سرخدار بومی ایران، توانایی بالایی برای مقابله بیولوژیک علیه بیمارگر *F. oxysporum* را دارند. علاوه بر این، به نظر می‌رسد قارچ‌کش‌های سیستمیک مورد آزمایش به‌صورت غیرمستقیم با همراهی قارچ‌های درون‌زی، از گیاه در برابر بیمارگرها محافظت می‌نمایند.

واژه‌های کلیدی: رورال-TS، سرخدار، فوزتیل آلومینیوم، قارچ‌های اندوفیت، *Fusarium solani*

مقدمه

سرخدار (*Taxus baccata* L.) گیاهی بازدانه، متعلق به تیره *Taxaceae* و از معدود سوزنی‌برگان بومی ایران است. این گیاه همیشه سبز و کند رشد است. تمامی اندام‌های گیاه بجز میوه تازه آن (که به آن اصطلاحاً آریل گفته می‌شود) حاوی ترکیبی از آلکالوئیدها، دی‌ترپنوئیدها، لیگان‌ها، تانن‌ها و رزین‌ها می‌باشند که آنها را به شدت سمی می‌سازد (۲۵). این گیاه منبع اولیه تولید داروی ضدسرطان پاکلی‌تاکسل (تاکسول) می‌باشد. تاکسول، داروی ضدسرطان با اثر ویژه در درمان سرطان‌های سینه، رحم، ریه و مثانه است (۳۷). این ماده یک آلکالوئید دی‌ترپنوئید طبیعی است که اولین بار توسط Wani و همکاران از پوست درخت *Taxus brevifolia* جدا شد (۴۲).

محققان دریافتند که درخت سرخدار با میکروارگانیسم‌هایی همزیستی دارد که برخی از آنها توانایی تولید تاکسول را دارند. تحقیقات در این زمینه منجر به کشف قارچ‌های تولیدکننده تاکسول شد (۱۵). قارچ‌های اندوفیت تمام و یا بخشی از چرخه زندگی خود را درون سلول و یا بین سلول در بافت زنده گیاه میزبان به سر می‌برند بدون این‌که باعث ایجاد بیماری و یا آلودگی در گیاه میزبان شوند (۳۲). این میکروارگانیسم‌ها با تولید متابولیت‌های ثانویه‌ای که در اختیار میزبان خود قرار می‌دهند سبب افزایش دسترسی مواد غذایی، مقاومت به آفات، بیماری‌ها، تنش‌های محیطی از قبیل شوری، اسیدیته و خشکی می‌شوند (۲۹،۴۱). تعداد زیادی از قارچ‌های اندوفیت سرخدار از سراسر جهان جداسازی شده و تولید تاکسول توسط آنها اثبات گردیده است. از آن جمله می‌توان به قارچ‌های *Pestalotiopsis microspore* جدا شده از *Taxus wallachiana* (۳۹)، قارچ *Fusarium solani* جدا شده از *Taxus celebica* (۷) و *Taxomyces andreanae* استخراج شده از گیاه *Taxus brevifolia* (۶) اشاره کرد. علاوه بر خواصی که برای قارچ‌های اندوفیت ذکر شد، این قارچ‌ها توان قابل توجهی برای کنترل عوامل بیماری‌زا دارند. بنابراین، جداسازی و توصیف این نوع از میکروارگانیسم‌ها می‌تواند در جهت کشف گونه‌های جدیدی با توانایی تولید ترکیبات ضدمیکروبی مهم باشد (۴۰).

قارچ‌های جنس فوزاریوم از مهمترین قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی هستند که باعث پژمردگی و از بین رفتن گیاهان می‌شوند (۲۰، ۳۰ و ۳۴). در اغلب کشورها، بیماری پژمردگی

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2025-07-05]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1401.10.20.10.7]
[DOI: 10.52547/ifej.10.20.1]

فوزاریومی با عامل *Fusarium oxysporum* از عوامل اصلی محدودکننده تولید گیاهان زراعی و باغی بوده و این قارچ در ردیف ۱۰ قارچ مهم بیمارگرهای گیاهی قرار دارد (۱۱). امروزه عوامل بیماری‌زای تکامل یافته *F. oxysporum* می‌توانند منجر به خسارات ویران کننده و جبران ناپذیری در محصولات باغی و زراعی شوند (۳۱).

در حال حاضر برای کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی راهبردهای مختلفی در کشاورزی به‌کار گرفته شده است. یکی از این موارد ضدعفونی شیمیایی خاک است که قبل از کشت با طیف وسیعی از سموم مانند: متیل بروماید، بنومیل و کاربندازیم انجام می‌گیرد. لیکن در سال‌های اخیر در بسیاری از کشورها، استفاده از برخی سموم تدخینی مانند متیل بروماید و قارچ‌کش‌هایی نظیر بنومیل به دلیل خطرات زیست محیطی گسترده، کاملاً منسوخ شده است (۲۶). قارچ‌کش‌های سیستمیک به صورت جذب فعال در شیره گیاهی و کوتیکول نفوذ کرده و در گیاه توزیع می‌شوند. کاربرد قارچ‌کش‌های سیستمیک در کنترل بیماری‌های گیاهی مزایایی از جمله: درمان شیمیایی بیماری، توزیع قارچ‌کش در تمام قسمت‌های گیاه و دوام بیشتر اثر آن دارد (۱۸). این قارچ‌کش‌ها همچنین می‌توانند وارد فضای سیتوزول شده و موجب مرگ سلول قارچ گردند (۳۸). یکی از عوامل حساسیت قارچ‌ها به این قارچ‌کش‌ها وجود ارگواسترول در غشای سلولی می‌باشد (۱۰). همچنین برخی قارچ‌کش‌های سیستمیک موجب بازدارندگی از سنتز میکروتوبول‌ها شده و تقسیم سلول را مختل می‌نماید. باید توجه داشت که عامل اصلی تفاوت در اثربخشی قارچ‌کش‌ها این است هر گروه قارچ‌کشی، مسیر بیوسنتز ارگواسترول را در مراحل متفاوتی مختل می‌کند (۱۴). از معایب استفاده از این ترکیبات این است که این مواد شیمیایی می‌توانند از القای بیماری جلوگیری کنند اما گیاه را پس از آلوده شدن، درمان نمی‌کنند. همچنین ممکن است این ترکیبات روی میکروارگانیسم‌های مفید خاک تأثیر بگذارند یا اینکه برخی از آنها در زنجیره غذایی تجمع می‌یابند. گندزدایی حرارتی خاک بر برخی از این معایب غلبه می‌کند اما این عیب را دارد که غیرانتخابی است و می‌تواند اثرات نامطلوبی بر کیفیت خاک داشته باشد (۲۶). استفاده از انواع گیاهان مقاوم، به عنوان مثال گیاهان حامل ژن‌های مقاومت، در حال حاضر از نظر اقتصادی، اکولوژیکی و کنترل بیماری جزو روش‌های مؤثر است. با این حال، این نوع مقاومت به ندرت پایدار بوده و دیر یا زود نژادهای جدیدی ظاهر می‌شوند که بر مقاومت گیاه در برابر بیمارگر غلبه می‌کنند (۱۰).

محدودیت رویکردهای کنونی بیماری پژمردگی فوزاریومی، نیاز به توسعه روش‌های جایگزین را تشدید می‌کند. یک استراتژی جایگزین مناسب، استفاده از قارچ‌های اندوفیت بخصوص گونه‌های مفید جنس فوزاریوم مانند *Fusarium solani* می‌باشد. قارچ‌های اندوفیت به دلیل توانایی در حفاظت از گیاهان، به‌طور فزاینده‌ای در حال مطالعه هستند (۱۷). همزیستی طولانی مدت اندوفیت‌ها و گیاهان میزبان، روابط آنها را پیچیده می‌کند، به‌طوری‌که اندوفیت‌ها می‌توانند متابولیت‌های ثانویه فعال مشابه گیاهان میزبان را تولید کنند (۴۰). پژوهش‌ها نشان داده که بسیاری از جمعیت‌های اندوفیتی موجب تحریک رشد گیاهان شده و همچنین با تولید هورمون‌های گیاهی و عوامل ضدقارچی و ضدباکتریایی سبب مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی می‌شوند (۵). اثر اندوفیت‌ها به عنوان عوامل مهارکننده زیستی تابع عوامل مختلفی از جمله ویژگی‌های میزبان، الگوی کلونیزاسیون میزبان، توانایی القای مقاومت سیستمیک و توانایی حرکت به درون میزبان می‌باشند (۴).

در بررسی رقابت جدایه‌های مختلف قارچ *Trichoderma harzianum* با قارچ *Fusarium oxysporum* مشخص شد که جدایه‌های قارچ تریکودرما مانع رشد و توسعه بیمارگر شدند (۱۹). علاوه بر این، القای قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* در گیاه موز (*Musa spp.*) سبب ایجاد مقاومت در برابر *F. oxysporum* از طریق افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد (۸). توجه به این نکته ضروری است که برخی از قارچ‌ها که برای بعضی از گونه‌های گیاهی اندوفیت هستند، ممکن است برای گونه‌های دیگر بیماری‌زا باشند (۲)، زیرا وجود ژن‌های بیماری‌زایی و یا ویرولانس، تعیین کننده پدیده بیمارگری در گیاهان است (۱). برخی از گونه‌های *F. oxysporum* نیز برای میزبان مفید هستند و می‌توانند از گیاه در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت کنند. این قارچ به عنوان یک اندوفیت ریشه می‌تواند بیماری ناشی از عوامل بیماری‌زای آوندی مانند *Verticillium Dahlia* و گونه‌های بیماری‌زای *F. oxysporum* را کاهش دهد. در چند سال اخیر بررسی شده است که قارچ درون‌رست *F. oxysorum*، ریشه را در برابر عوامل بیمارگری مانند *Pythium ultimum* نیز محافظت می‌کند (۱۰).

با شواهد موجود، اندوفیت‌ها به دلیل توانایی خود در حفاظت از میزبان در برابر عوامل بیماری‌زا، به عنوان عوامل کنترل‌کننده زیستی شناخته شده‌اند. بنابراین جداسازی اندوفیت‌های جدید از گیاهان و یا مقاوم‌سازی آنها با روش‌های مختلف می‌تواند سبب تولید ترکیباتی با فعالیت ضدمیکروبی بالا گردد. در پژوهش حاضر، تغییرات میزان و قدرت آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت در گیاه سرخدار پس از اعمال تیمارهای قارچ‌کش بررسی شده و به تجزیه و تحلیل اثرات غیرمستقیم قارچ‌کش‌های سیستمیک از منظر تغییرات اندوفیتی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

این پژوهش به منظور بررسی تأثیر قارچ‌کش‌های سیستمیک و اثرات آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت جدا شده از نهال‌های سرخدار تیمارشده با قارچ‌کش‌های سیستمیک علیه قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* در دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان و در سه بخش انجام شد. بخش اول، اعمال تیمارهای قارچ‌کش بر نهال‌های سرخدار بود. این بخش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو تیمار قارچ‌کش سیستمیک رورال-TS (۱ ppm) و فوزتیل آلومینیوم (۲ ppm) و شاهد (آب مقطر) در سه تکرار اجرا گردید. اعمال تیمارها به صورت محلول‌پاشی برگی و در سه دوره به فاصله هفت روز انجام شد. بخش دوم آزمایش شامل جداسازی قارچ‌های اندوفیت از اندام‌های گیاهان تیمارشده و تعیین درصد بازدارندگی از رشد این قارچ‌ها علیه بیمارگر *F. oxysporum* با

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2025-07-05]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1401.10.20.10.7]
[DOI: 10.52547/ifej.10.20.1]

روش کشت متقابل در شرایط آزمایشگاهی بود. بخش سوم آزمایش نیز شناسایی مولکولی پنج سویه از قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده بود.

تیمار نهال‌های سرخدار با قارچ‌کش‌های سیستمیک

به‌منظور انجام آزمایش ابتدا تعدادی نهال سرخدار یکساله بومی منطقه گرگان (*Taxus baccata*) و یکسان از نظر اندازه در اسفندماه در شرایط آب و هوایی گرگان در زمین اصلی کشت شد. پس از استقرار کامل گیاهان و ظهور اولین نشانه‌های رشد، گیاهان مذکور با قارچ‌کش‌های سیستمیک تیمار شدند. این آزمایش در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با دو تیمار قارچکش (رورال TS خریداری شده از شرکت آریا شیمی با غلظت ۱ پی‌پی‌ام و فوزتیل آلومینیوم وارداتی شرکت مهان با غلظت ۲ پی‌پی‌ام و شاهد آب مقطر) در سه تکرار اجرا شد. استفاده از قارچ‌کش‌ها به صورت محلول‌پاشی برگی در تاریخ ۱۵ اردیبهشت آغاز و در سه دوره و به فاصله هر ۷ روز صورت گرفت. ۷ روز پس از اعمال آخرین مرحله تیمارها، از ساقه و برگ نهال‌های سرخدار نمونه تهیه شد.

کشت نمونه‌های گیاهی و جداسازی قارچ‌های اندوفیت از آنها

پس از اعمال تیمارهای آزمایشی، نمونه‌های گیاهی سرخدار از برگ و ساقه نهال‌های کشت شده در مزرعه جمع‌آوری شد. نمونه‌گیری از اندام‌های سالم و بدون بیماری نیز صورت گرفت. پس از تهیه نمونه‌هایی به اندازه پنج سانتی‌متر، به منظور جدا شدن خاک و سایر ذرات خارجی، نمونه‌های به مدت ۳۰ دقیقه با آب جاری شستشو داده شد. عمل ضدعفونی سطحی نمونه‌ها در شرایط هود لامینار و با استفاده از الکل ۷۰ درصد به مدت سه دقیقه و وایتکس تجاری ۱۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت و سپس نمونه‌ها با آب مقطر استریل سه مرتبه شستشو داده شد. به منظور تأیید ضدعفونی سطحی، ۱۰ میلی‌لیتر از آب مرحله آخر شستشو به مدت یک دقیقه تکان داده شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از مایع شناور رویی آن بر روی محیط کشت PDA قرار داده شد تا در صورت عدم آلوده شدن، فرایند سترون‌سازی نمونه‌ها تأیید گردد (۳۶). نمونه‌های گیاهی سترون شده در پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت شدند. تمامی کشت‌ها در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

قارچ‌هایی که دو هفته پس از کشت از اندام‌های گیاه خارج شدند به عنوان قارچ اندوفیت تلقی شده و سپس به محیط کشت PDA جدید انتقال یافته و به روش نوک هیف خالص‌سازی شدند. به منظور اطمینان از خالص بودن کلونی‌ها، عمل خالص‌سازی سه مرتبه تکرار شده و تمام ایزوله‌ها نیز شماره‌گذاری شدند.

بررسی آزمایشگاهی فعالیت ضدقارچی اندوفیت‌های جداسازی شده در برابر بیمارگر *Fusarium oxysporum*

برای بررسی اثر آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت بر بیمارگر *F. oxysporum* در شرایط آزمایشگاهی از روش کشت متقابل (Dual culture) استفاده شد (۱۲). بدین منظور در یک طرف پتری حاوی محیط کشت PDA به فاصله یک سانتی‌متر از حاشیه ظرف پتری با استفاده از لوپ، قرصی از آگار به قطر ۵ میلی‌متر حاوی میسلیوم بیمارگر و در طرف مقابل آن با فاصله هشت سانتی‌متر، جدایه‌ای از قارچ اندوفیت قرار داده شد. در تیمار شاهد، در یک سمت پتری قارچ بیمارگر و در سمت دیگر محیط کشت بدون میسلیوم قرار داده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار در آزمایشگاه اجرا گردید. سپس تمامی پتری‌ها با پارافیلم مسدود شد. پتری‌ها تا زمان رشد ریسه‌ها روی سطح محیط کشت از پرگنه قارچ بیمارگر در نمونه شاهد، در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در انتها درصد بازداری از رشد میسلیوم با اندازه‌گیری قطر آخرین رشد پرگنه قارچ در هر تیمار و با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

۱۰۰×[شعاع رشد میسلیوم در پتری شاهد/(شعاع رشد میسلیوم در حضور قارچ اندوفیت–شعاع رشد میسلیوم در پتری شاهد)]

شناسایی مولکولی قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از سرخدار کشت قارچ‌های اندوفیت در محیط PDB: پنج نمونه از قارچ‌های اندوفیت استخراج شده از سرخدار جهت انجام آزمایش‌های مربوط به شناسایی مولکولی انتخاب شدند. این نمونه‌ها به اختصار، TB03، TR21، TR23، TF38 و TR41 نامیده شدند. کلونی‌های خالص شده برای تهیه سوسپانسیون مورد استفاده قرار گرفتند. برای تهیه سوسپانسیون از قارچ‌های اندوفیت، دو قطعه دایره‌ای شکل به ابعاد ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متر از ایزوله‌های قارچی جدا شده و به ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB (Potato Dextrose Broth) انتقال داده شد. کشت‌ها روی شیکر با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تاریکی به مدت ۲۱ روز نگهداری شدند. پس از گذشت این زمان، قارچ‌های رشد یافته در محیط PDB با استفاده از سه لایه کاغذ صافی خشک شده و با ازت مایع کوبیده شد تا برای آزمایش‌های مولکولی مورد استفاده قرار گیرد.

استخراج DNA ژنومی و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR): استخراج DNA ژنومی به روش CTAB انجام گرفت (۲۸). جهت بررسی حضور ژن ITS در قارچ‌ها از آغازگرهای اختصاصی ITS5 (Forward: GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) و ITS4 (Revers: TCCTCCGCTTATTGATATGC) استفاده گردید. پس از رقیق‌سازی پرایمر مورد نظر به همراه Master Red amplicon mix (شرکت Ampliqon، کشور دانمارک) و DNA ژنومی و آب مقطر در دستگاه PCR در حجم نهایی ۲۵ مایکرولیتر قرار گرفت (۳۳). مخلوط PCR به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و سپس ۳۵ سیکل در دمای ۹۴ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، ۵۹ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه به مدت ۳۰ ثانیه و در نهایت یک چرخه دمای ۷۲ درجه به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه انجام شد. آنالیز محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه الکتروفورز (Bio Rad) در بافر TBE با ولتاژ ۸۵ صورت گرفت (۴۵).

محصولات به‌دست آمده از PCR برای انجام توالی‌یابی به شرکت زیست فناوری پیشگام ارسال، خالص‌سازی و سپس توالی‌یابی گردید. توالی‌های ارسالی توسط شرکت با سایر

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2025-07-05]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1401.10.20.10.7]
[DOI: 10.52547/ifej.10.20.1]

توالی‌های موجود در پایگاه NCBI در قسمت Neucleotide BLAST، بلاست شده و میزان تشابه با سایر توالی‌های موجود در بانک جهانی بررسی گردید. تعیین توالی‌ها و حذف خطاهای احتمالی با نرم‌افزار Chromas صورت گرفت.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ تجزیه و تحلیل شده و میانگین داده‌ها با آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵٪ مقایسه گردید. نمودارها نیز توسط نرم‌افزار Excel رسم شد.

نتایج و بحث

مؤثر بودن روش ضدعفونی سطحی بافت‌های گیاهی

آزمایش بررسی گندزدایی سطح بافت‌های گیاهی نشان داد که اغلب یا تمام میکروارگانیسم‌های ساپروفیت در طول این روش ضدعفونی حذف شدند. پس از ضدعفونی اندام‌های گیاه سرخدار، هیچگونه رشد میکروارگانیسمی روی محیط کشت PDA پس از دو هفته نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس مشاهده نشد، که این امر نشان‌دهنده این است که باکتری‌های و قارچ‌های اپی‌فیت و ساپروفیت نمی‌توانند پس از ضدعفونی رشد کنند. بنابراین با اطمینان بیشتری می‌توان نتیجه گرفت که قارچ‌های استخراج شده از اندام‌های این گیاه، قارچ‌های اندوفیت یا درون‌رست می‌باشند.

بررسی‌های آزمایشگاهی فعالیت ضدقارچی اندوفیت‌های جداسازی شده از سرخدار در برابر بیمارگر *F.oxysporum*

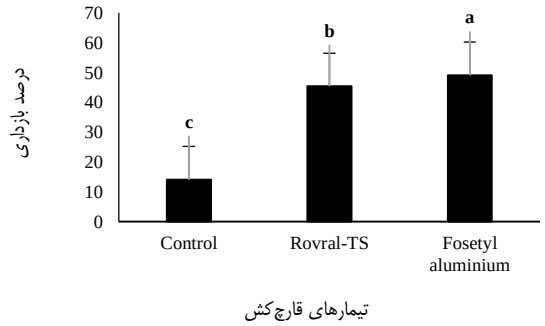
به‌طور کلی ۲۸ جدایه قارچ اندوفیت از ساقه و برگ گیاهان سالم سرخدار جدا شده و توان بازدارندگی آنها بر رشد میسلیومی قارچ *F. oxysporum* در شرایط آزمایشگاهی سنجیده شد. بر اساس نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، تمام قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده پس از تیمار نهال‌های سرخدار با قارچ‌کش‌های سیستمیک، به‌طور معنی‌داری از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر فوزاریوم روی محیط PDA در روش کشت متقابل جلوگیری کردند. نتایج حاصل از نمودار مقایسه میانگین (شکل ۱) نشان داد که بین تیمارهای قارچ‌کش در بازدارندگی از رشد میسلیوم بیمارگر، اختلاف معنی‌داری وجود داشت. به‌طوری‌که بیشترین درصد بازدارندگی در قارچ‌های اندوفیتی که گیاه میزبان باقارچ‌کش سیستمیک فوزتیل آلومینیوم تیمار شدند، مشاهده شد. پس از آن نیز قارچ‌های اندوفیت حاصل از نهال‌های تیمار شده با قارچ‌کش سیستمیک رورال-TS بالاترین درصد بازداری از رشد بیمارگر را به خود اختصاص دادند. در نهایت نیز کمترین میزان ممانعت از رشد قارچ بیمارگر فوزاریوم در تیمارهای شاهد که گیاهان با آب مقطر اسپری شدند، مشاهده گردید. این نتایج نشان داد که استفاده از قارچ‌کش‌های سیستمیک در تولید قارچ‌های اندوفیت قوی‌تر یا تقویت قارچ‌های اندوفیت در جهت مبارزه با بیمارگرها عمل کرده است. به‌طوری‌که بازدارنده‌ترین قارچ‌ها در برابر بیمارگر، پس از جداسازی از گیاهان با اعمال تیمارهای قارچ‌کش حاصل شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر قارچکش بر درصد بازداری قارچ‌های اندوفیت سرخدار در برابر قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum*

Table 1. Analysis of variance of fungicide effect on inhibitory percentage of yew endophytic fungi against *Fusarium oxysporum*

منابع تغییرات	درجه آزادی	درصد بازداری
تیمارهای قارچ‌کش	۲	۳۷۰۷/۷۰**
خطا	۲۷	۱۵/۶۴
ضریب تغییرات (٪)	-	۱۰/۹۳

**: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

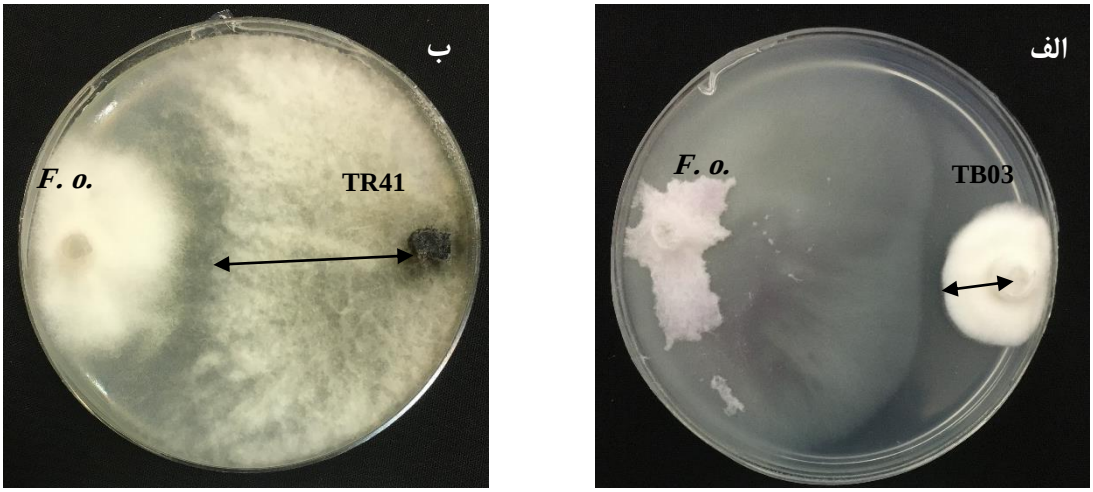


شکل ۱- مقایسه میانگین تأثیر قارچ‌کش‌های سیستمیک بر درصد بازداری از رشد قارچ *Fusarium oxysporum*
(میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح ۵٪ آزمون LSD با هم اختلاف معنی‌داری ندارند)

Figure 1. Comparison of the mean effect of systemic fungicides on the growth inhibition of *Fusarium oxysporum*
(Means with at least one common letter were not significantly different at the 5% level of the LSD)

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2025-07-05]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1401.10.20.10.7]
[DOI: 10.52547/ifej.10.20.1]

قارچ‌کش‌های سیستمیک قادرند بصورت جذب فعال در شیره گیاهی و کوتیکول نفوذ کرده و در گیاه توزیع گردند (۳۸). یکی از عوامل حساسیت قارچ‌ها به این قارچ‌کش‌ها، وجود ارگواسترول در غشای سلولی می‌باشد. عامل اصلی تفاوت در اثربخشی قارچ‌کش‌ها این است که هر گروه قارچ‌کشی، مسیر بیوسنتز ارگواسترول را در مراحل متفاوتی (بازدارندگی از اسکوالن اپوکسیداز یا بازدارندگی از لانوسترول ان-دمتیلاز) مختل می‌کند (۱۴). در مطالعاتی بطور مستقیم به نقش قارچ‌کش‌ها در کاهش بیماری‌های قارچی در گیاهان اشاره شده است. از آن جمله می‌توان به کاهش میزان پوسیدگی سیاه ریشه نخود (قارچ بیمارگر *Fusarium solani*) با استفاده از قارچ‌کش‌های بنومیل و رورال اشاره کرد (۲۱). همچنین گزارش شده است که قارچ‌کش سیستمیک متالاکسیل در کنترل قارچ‌های بیماری‌زای درون‌زی نظیر *Pythium* مؤثر هستند (۴۳). فلوتانیل نیز که جزو قارچ‌کش‌های سیستمیک محسوب می‌شود، در مقابله با قارچ‌های گونه رایزوکتونیا بسیار موفق می‌باشد (۴۶). مطالعات بسیاری به نقش مستقیم قارچ‌کش‌ها در کاهش بیماری‌های گیاهی پرداختند. همان‌گونه که ذکر شد در مطالعه حاضر به نقش قارچ‌کش‌ها از منظر تغییر قدرت بیولوژیکی قارچ‌های اندوفیت پرداخته شده است. به‌طوری‌که استفاده از قارچ‌کش‌های سیتمیک ماهیت و توان قارچ‌های اندوفیت را تغییر داده و اثر مهارکنندگی آنها را بر روی قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی افزایش داده است.



شکل ۲- اثر قارچ‌های اندوفیت الف) TB03 و ب) TR41 جدا شده از سرخدار در بازداری از رشد قارچ بیمارگر *F. oxysporum* پس از هفت روز بر روی محیط کشت PDA

Figure 2. Effect of endophytic fungi a) TB03 and b) TR41 isolated from yew on growth inhibition of *F. oxysporum* after 7 days on PDA

در بررسی تمام قارچ‌های اندوفیت استخراج شده از نهال‌های تیمار شده با قارچ‌کش‌های سیستمیک مشخص شد که بین قارچ‌های اندوفیت نیز در میزان مهار رشد قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum* اختلاف معنی‌داری وجود دارد. نتایج جدول مقایسه میانگین (جدول ۲) نشان می‌دهد که بالاترین درصد مهار رشد بیمارگر در قارچ اندوفیت TR41 به دست آمد که دارای اختلاف معنی‌داری با سایر قارچ‌های اندوفیت بود. این قارچ از نهال سرخدار تیمار شده با قارچ‌کش سیستمیک رورال-TS جدا گردید. پس از آن نیز قارچ TF38 دارای بیشترین درصد بازدارندگی رشد بیمارگر بود. این قارچ نیز پس از تیمار نهال سرخدار با قارچکش سیستمیک فوزتیل آلومینیوم حاصل شد. کمترین میزان درصد مهار رشد میسلیوم قارچ فوزاریوم در شرایط آزمایشگاهی مربوط به قارچ TB03 بود که از نهال‌های سرخدار گروه شاهد (بدون استفاده از قارچ‌کش‌های سیستمیک) به دست آمد. بنابراین استفاده از قارچ‌کش‌های سیستمیک علاوه بر اثر مستقیم بر بیمارگرهای گیاهی، به‌صورت غیرمستقیم نیز سبب افزایش قدرت قارچ‌های درون‌زی برای مقابله با مهاجم خواهند شد.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2025-07-05]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1401.10.20.10.7]
[DOI: 10.52547/ifej.10.20.1]

جدول۲- مقایسه میانگین (± اشتباه معیار) تأثیر قارچ‌های اندوفیت بر درصد بازداری از رشد قارچ بیمارگر *Fusarium oxysporum*

Table 2. Comparison of the mean (±SE) effect of endophytic fungi on the percentage of growth inhibition of *Fusarium oxysporum*

تیمارهای قارچ‌کش	قارچ‌های اندوفیت سرخدار	درصد بازداری از رشد میسلیوم بیمارگر
T0 (آب مقطر)	TB93	۱۳/۴۸±۰/۵۳^{lm}
	TB02	۳۵/۶۹±۶/۳۳^{ij}
	TB10	۳۲/۰۷±۱/۸۹^{j}
	TB03	۱۲/۹۷±۰/۸۷^{m}
	TB21	۱۵/۸۳±۲/۴۷^{lm}
	TB22	۲۲/۰۳±۰/۵۵^{k}
	TB31	۱۸/۹۶±۳/۴۴^{kl}
	TB17	۲۲/۱۶±۳/۳۸^{k}
T1 (قارچ‌کش رورال-TS)	TR32	۴۴/۳۵±۰/۲۴^{gh}
	TR11	۴۶/۱۷±۱/۴۵$^{e-h}$
	TR13	۴۶/۳۶±۳/۵۵$^{e-h}$
	TR23	۴۶/۳۴±۱/۰۶$^{e-h}$
	TR14	۴۷/۱۰±۳/۳۲$^{e-h}$
	TR44	۴۴/۹۵±۱/۴۱^{gh}
	TR31	۴۴/۷۲±۰/۹۳^{gh}
	TR21	۵۲/۱۲±۰/۸۶^{cde}
	TR54	۴۱/۵۶±۰/۰۵^{hi}
	TR41	**۷۱/۸۲±۰/۸۶^{a}**
T2 (قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم)	TF51	۵۳/۵۵±۱/۷۹^{bcd}
	TF53	۱۳/۴۹±۰/۷۵^{lm}
	TF32	۱۹/۱۱±۱/۲۲^{kl}
	TF63	۵۰/۸۸±۱/۱۶$^{c-f}$
	TF67	۵۵/۰۴±۱/۵۷^{bc}
	TF83	۱۲/۹۱±۰/۷۷^{m}
	TF16	۱۶/۳۸±۰/۳۳^{klm}
	TF26	۴۸/۱۴±۱/۰۱$^{d-g}$
	TF65	۴۳/۴۴±۱/۲۲^{gh}
	TF38	۵۸/۶۵±۲/۶۳^{b}

میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح ۵٪ آزمون LSD با هم اختلاف معنی‌داری ندارند.

استفاده از باکتری‌ها و یا قارچ‌های اندوفیت می‌تواند سبب کنترل عوامل بیماری‌زا گردد (۵). اثر اندوفیت‌ها به عنوان مهارکننده زیستی، تابع عوامل مختلفی از جمله ویژگی‌های میزبان، الگوی مکانیزاسیون میزبان، توانایی القای مقاومت سیستمیک و توانایی حرکت به درون میزبان می‌باشد (۴). قارچ‌های اندوفیت به دلیل توانایی در کمک به سلامت گیاهان به‌طور فزاینده‌ای در حال مطالعه هستند. به‌طور مثال قارچ اندوفیت *Piriformospora indica* قادر به ایجاد مقاومت در *Musa spp.* در برابر *F. oxysporum* به وسیله افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی است (۸). از سوی دیگر قارچ اندوفیت *F. oxysporum* سویه EF119 به عنوان یک عامل کنترل‌کننده زیستی برای گیاهان گوجه فرنگی در برابر اوومایست‌ها مانند *Phytophthora infestans* عمل می‌کند (۲۳). در پژوهشی دیگر مشخش شد که قارچ *F. oxysporum* به عنوان یک اندوفیت ریشه می‌تواند بیماری ناشی از عوامل بیماری‌زای آوندی مانند *Verticillium Dahlia* و سویه‌های بیماری‌زای *F. oxysporum* را کاهش دهد. قارچ اندوفیت *F. oxysorum* همچنین ریشه را در برابر بیمارگرهایی مانند *Pythium ultimum* نیز محافظت می‌کند (۱۰).

در بررسی رقابت جدایه‌های مختلف تریکودرما با قارچ *Fusarium oxysporum* مشخص شد که جدایه‌های قارچ تریکودرما مانع رشد و توسعه بیمارگر شدند. مقایسه درصد بازدارندگی نشان داد که جدایه *Trichoderma harzianum* از بیشترین میزان بازدارندگی برخوردار بود (۱۹).

شناسایی مولکولی قارچ‌های اندوفیت

آنالیز توالی‌یابی حاصل از محصول PCR آشکار ساخت که از ۵ جدایه قارچ مورد بررسی، ۳ جدایه مربوط به جنس *Fusarium* و ۲ جدایه دیگر متعلق به جنس‌های *Phomopsis* و *Colletotrichum* بودند.

جدول ۳- شناسایی مولکولی قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از سرخدار

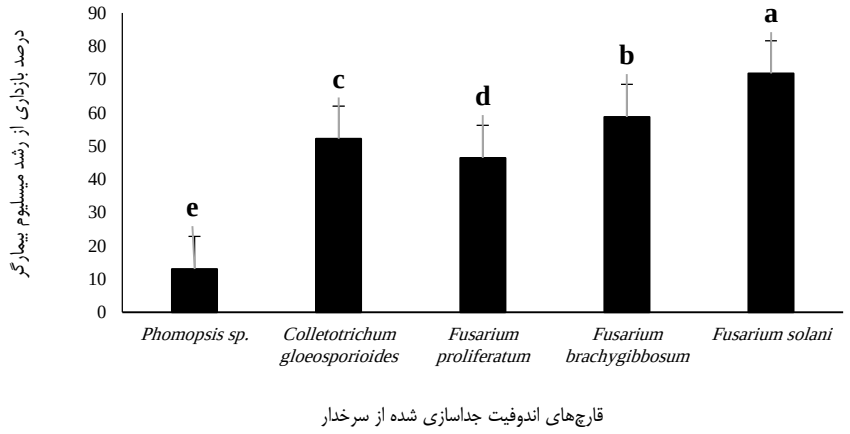
Table 3. Molecular identification of endophytic fungi isolated from yew

کد	قارچ اندوفیت شناسایی‌شده	درصد شباهت	کد ثبت شده در NCBI
TR41	*Fusarium solani*	۱۰۰	MT446060
TF38	*Fusarium brachygibbosum*	۱۰۰	MN452141
TB03	*Phomopsis sp.*	۹۸/۵	AB640842
TR21	*Colletotrichum gloeosporioides*	۹۸/۹	MH168336
TR23	*Fusarium proliferatum*	۱۰۰	MT560216

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2025-07-05]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1401.10.20.10.7]
[DOI: 10.52547/ifej.10.20.1]

مقایسه قدرت آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت شناسایی شده

تمامی قارچ‌های اندوفیت استخراج شده از سرخدار در نهال‌های تیمارشده و شاهد، اثر معنی‌داری بر مهار رشد میسلیوم قارچ بیمارگر *F. oxusporum* داشتند. بر اساس نمودار مقایسه میانگین (شکل ۳) بیشترین درصد مهارکنندگی از رشد میسلیوم بیمارگر مربوط به قارچ *Fusarium solani* بود که دارای ۷۱/۸۱ درصد مهار رشد بیمارگر بود. این قارچ از سرخدارهای تیمار شده با قارچ‌کش سیستمیک رورال–TS حاصل شد. پس از آن نیز قارچ‌های *Fusarium brachygibbosum*، *Colletotrichum gloeosporioides*، *Fusarium proliferatum* و *Phomopsis sp.* در رده‌های بعدی قرار داشتند. همانطور که مشاهده می‌کنید کمترین میزان بازدارندگی مربوط به قارچ *Phomopsis sp.* با ۱۲/۹۷ درصد مهارکنندگی بود. این قارچ اندوفیت از نهال سرخدار در تیمار شاهد (آب مقطر) استخراج شد.



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر قارچ‌های اندوفیت استخراج شده از سرخدار بر درصد بازداری از رشد قارچ *Fusarium oxysporum*
(میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، در سطح ۵٪ آزمون LSD با هم اختلاف معنی‌داری ندارند)
Figure 3. Comparison of the mean effect of endophytic fungi extracted from yew on the percentage of growth inhibition of *Fusarium oxysporum*
(Means with at least one common letter were not significantly different at the 5% level of the LSD)

گیاهان محیطی را در داخل خود برای تنوع بالای قارچ‌های اندوفیت ایجاد می‌کنند. این میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در برگ‌ها، شاخه‌ها و ریشه‌های میزبان زندگی کنند بدون اینکه صدمه‌ای به میزبان خود وارد کنند. این قارچ‌ها به‌طور سیستمیک در آپوپلاست، بافت‌های آوندی و در برخی موارد در داخل سلول گیاه ساکن هستند (۳). به عنوان مثال در کاکائویی (*Theobroma cacao L.*) که در برزیل رشد می‌کند، مشاهده شد که گیاهان دارای قارچ‌های اندوفیتی متعلق به چندین گروه مانند *Acremonium spp.*، *Colletotrichum gloeosporioides*، *Fusarium spp.*، *Gliocladium*، *Lasiodiplodia theobromae*، *Pestalotiopsis spp.*، *Trichoderma spp.* و *Verticillium spp.* هستند (۳۵). تنوع اندوفیت‌های گیاهی *Paeonia spp.* به تازگی مورد بررسی قرار گرفت و جنس‌های مختلف قارچ شناسایی شد که فراوان‌ترین آنها شامل *Fusarium*، *Phoma*، *Alternaria* و *Pestalotiopsis* بود (۴۴).

همزیستی طولانی‌مدت اندوفیت‌ها و گیاهان میزبان، روابط آنها را پیچیده می‌کند. به‌طوری‌که اندوفیت‌ها می‌توانند متابولیت‌های ثانویه فعال مشابه گیاهان میزبان خود تولید کنند (۴۰). این امر نیز می‌تواند یکی از دلایل محافظت گیاه در برابر بیمارگرها توسط قارچ‌های اندوفیت تلقی گردد. قارچ اندوفیت *Taxomyces andreanae* جدا شده از *Taxus brevifolia* ترکیب فعال تاکسول را تولید می‌کند (۲۷). همچنین در تحقیقی دیگر قارچ‌های اندوفیت *Acremonium*، *Colletotrichum* و *Fusarium spp.* جدا شده از *Taxus baccata* نیز توانایی تولید تاکسول و محافظت از گیاه در برابر بیمارگر را دارا بودند (۱۳). به‌طورکلی شایع‌ترین اندوفیت‌های جدا شده از گیاهان متعلق به جنس‌های *Colletotrichum*، *Cladosporium*، *Fusarium* و *Xylaria* بودند (۲۴).

توجه به این نکته ضروری است که برخی از قارچ‌ها که برای گونه‌های گیاهی اندوفیت محسوب می‌شوند، ممکن است برای گونه‌های دیگر بیماری‌زا باشند (۲). گروه دیگری از اندوفیت‌های برجسته، سویه‌های غیربیماری‌زای عوامل بیماری‌زا می‌باشند. از جمله این قارچ‌ها می‌توان به قارچ‌های جنس *Fusarium* اشاره کرد. به عنوان مثال *F. oxysporum* می‌تواند به عنوان عامل بیماری‌زا در گیاهان سبب پوسیدگی یا پژمردگی ریشه شود. با این حال برخی از سویه‌های *F. oxysporum* می‌توانند به عنوان اندوفیت در گیاه زندگی کرده و از گیاه در برابر بیماری‌های خاک‌زی مانند محافظت کنند (۱۰). قارچ اندوفیت *F. oxysporum* همچنین می‌تواند در تغذیه با عوامل بیماری‌زا رقابت کند. با این حال سازوکارهای دیگری نیز توسط این قارچ برای کنترل بیمارگر در گوجه‌فرنگی از طریق مقاومت ناشی از تولید جاسمونیک اسید، سالیسیلیک اسید و اتیلن وجود دارد (۹ و ۱۶). در بررسی دیگری مشخص شد که قارچ *F. solani* جدا شده از *Solanum*

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2025-07-05]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1401.10.20.10.7]
[DOI: 10.52547/ifej.10.20.1]

lycopersicum سبب محافظت گیاه در برابر قارچ بیمارگر *F. oxysporum* شد (۲۲).

نتیجه‌گیری

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تمامی قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاه سرخدار دارای قدرت بازداری از رشد میسلیوم بیمارگر *F. oxysporum* بودند. از بین قارچ‌های اندوفیت شناسایی شده، قارچ *F. solani* از بیشترین درصد مهارکنندگی برخوردار بود. همچنین استفاده از قارچ‌کش‌های سیستمیک نه تنها به‌طور مستقیم سبب مهار رشد قارچ‌های بیمارگر می‌شود بلکه به‌طور غیرمستقیم نیز با همراهی قارچ‌های اندوفیت، از گیاه در برابر بیمارگرها محافظت می‌کند.

منابع

1. Agrios, G.N. 2005. Plant Pathology. 5th edites. New York: Academic Press, 922 pp.
2. Araujo, W.L., P.T. Lacava, J. Marcon, A.O.S. Lima, J.K. Sobral, A.A. Pizzirani-Kleiner and G. Pratico. 2010. Isolation and characterization of endophytic microorganisms; Copiadora “Luiz de Queiroz; Copiadora “Luiz de Queiroz”: Piracicaba, Brazil.
3. Azevedo, J.L., W. Maccheroni Junior and W.L. Araujo. 2003. Importation of endophytic microorganisms in agriculture. In RAPP: annual revision of plant pathology, Luz, W.C., Ed.; Brazilian Phytopathological Society: Passo Fundo, Brazil, 11: 333-371.
4. Backman, P.A. and R.A. Sikora. 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control. Biological Control, 46: 1-3.
5. Bhattacharyya, P.N. and D.K. Jha. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 28(4): 1327-50.
6. Caruso, M., A.L. Colombo, L. Fedeli, A. Pavesi, S. Quaroni and M. Saracchi. 2000. Isolation of endophytic fungi and actinomycetes taxane producers. Annals Microbiology, 50: 3-13.
7. Chakravarthi, B.V., P. Das, K. Surendranath, A.A. Karande and C. Jayabaskaran. 2008. Production of paclitaxel by *Fusarium solani* isolated from *Taxus celebica*. Journal of Biosciences, 33: 259-267.
8. Cheng, C., D. Li, Q. Qi, X. Sun, M.R. Anue, B.M. David, Y. Zhang, X. Hao, Z. Zhang and Z. Lai. 2020. The root endophytic fungus *Serendipita indica* improves resistance of Banana to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical Race 4. European Journal of Plant Pathology, 156: 87-100.
9. Constantin, M.E., F.J. de Lamo, B.V. Vlieger, M. Rep and F.L.W. Takken. 2019. Endophyte-mediated resistance in Tomato to *Fusarium oxysporum* is independent of ET, JA, and SA. Frontiers in Plant Science, 10, 979.
10. De Lamo, F.J. and F.L.W. Takken. 2020. Biocontrol by *Fusarium oxysporum* using endophyte-mediated resistance. Frontiers in Plant Science, 11, 37.
11. Dean, R., J.A.L. Van Kan, Z.A. Pretorius, K.E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro and P.D. Spanu. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 13(4): 414-430.
12. Dennis, C. and J. Webester. 1971. Antagonist properties of species group of *Trichoderma* 111. Hyphal Interaction Transaction of the British Mycological Society, 57: 363-369.
13. El-Bialy, H.A. and H.S. El-Bastawisy. 2020. Elicitors stimulate paclitaxel production by endophytic fungi isolated from ecologically altered *Taxus baccata*. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 13: 79-87.
14. Elewski, B.E. 1993. Mechanisms of action of systemic antifungal agents. Journal of the American Academy of Dermatology, 28(5): 28-34.
15. El-Sayed, A.S., M.T. El-Sayed, A. Rady, N. Zein, G. Enan, A. Shindia, S. El-Hefnawy, M. Sitohy and B. Sitohy. 2020. Exploiting the biosynthetic potency of Taxol from fungal endophytes of conifers plants; Genome mining and metabolic manipulation. Molecules, 25(13): 3000.
16. Fadiji, A.E. and O.O. Babalola. 2020. Elucidating mechanisms of endophytes used in plant protection and other bioactivities with multifunctional prospects. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 8, 467.
17. Fontana, D.C., S. de Paula, A.G. Torres, V.H.M. de Souza, S.F. Pascholati, D. Schmidt and D. Dourado Neto. 2021. Endophytic fungi: Biological control and induced resistance to phytopathogens and abiotic stresses. Pathogens, 10, 570.
18. Hahn, M. 2014. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: Botrytis as a case study. Journal of chemical biology, 7(4): 133-141.
19. Jalali, S., N. Panjeke, M. Darvishnia, M. Salari and A. Salehi. 2014. Biological effect of Trichoderma and biological toxin of Trichomix-H against Fusarium wilt on tomato in vitro and greenhouse conditions. 1st National Conference on Agriculture Contaminations and Food Safety, Challenges and Solutions, Varamin, Iran, (In Persian).
20. Joseph, B., M. Ahmad Dar and V. Kumar. 2008. Bioefficacy of plant extracts to control *Fusarium solani* F. Sp. Melongenae Incitant of Brinjal Wilt. Global Journal of Biotechnology and Biochemistry Research (GJBBR), 3(2): 56-9.
21. Karampour, F., M. Okhovat and A. Sharifi-Tehrani. 1996. Effect of benomyl and Iprodione-Carbendazime on *Fusarium solani* fungus of Chickpea black root rot. Iranian Journal of Agricultural Science, 27(4): 87-94 (In Persian).
22. Kavroulakis, N., S. Ntougias, G.I. Zervakis, C. Ehaliotis, K. Haralampidis and K.K. Papadopoulou. 2007. Role of ethylene in the protection of tomato plants against soil-borne fungal pathogens conferred by an endophytic *Fusarium solani* Strain. Journal of Experimental Botany, 58: 3853-3864.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2025-07-05]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1401.10.20.10.7]
[DOI: 10.52547/ifej.10.20.1]

23. Kim, H.Y., G.J. Choi, H.B. Lee, S.W. Lee, H.K. Lim, K.S. Jang, S.W. Son, S.O. Lee, K.Y. Cho and N.D. Sung. 2007. Some fungal endophytes from vegetable crops and their anti-oomycete activities against Tomato late blight. Letters in Applied Microbiology, 44: 332-337.
24. Kohl, J., R. Kolnaar and W.J. Ravensberg. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. Frontiers in Plant Science, 10, 845.
25. Labossiere, A.W. and D.F. Thompson. 2018. Clinical toxicology of Yew poisoning. Annals of Pharmacotherapy, 52(6): 591-599.
26. Lopez-Aranda, J.M., P. Dominguez, L. Miranda, B. de los Santos, M. Talavera and O. Daugovish. 2016. Fumigant use fors Strawberry production in Europe: the current landscape and solutions. International Journal of Fruit Science, 16: 1-15.
27. Manganyi, M. and C. Ateba. 2020. Untapped potential of endophytic fungi: A review of novel bioactive compounds with biological application. Microorganisms, 8: 1934.
28. Murray, M. and W. Thompson. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research, 8(19): 4321-4325.
29. Naik, B.S. 2019. Developments in taxol production through endophytic fungal biotechnology: a review. Oriental Pharmacy and Experimental Medicine, 19(1): 1-13.
30. Narisawa, K., H. Kawamata, R.S. Currah and T. Hashiba. 2002. Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. European Journal of Plant Pathology, 108(1): 103-109.
31. Ordonez, L.N., F. Garcia-Bastidas, H.B. Laghari, M.Y. Akkary, E.N. Harfouche and B.N. Awar. 2016. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense tropical race 4 causing panama disease in Cavendish bananas in Pakistan and Lebanon. Plant Disease, 100(1): 209-210.
32. Porras-Alfaro, A. and P. Bayman. 2011. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. Annual Review of Phytopathology, 49: 291-315.
33. Raja, A., N. Miller, J. Pearce and H. Oberlies. 2017. Fungal identification using molecular tools: A primer for the natural products research community. Journal of Natural Products, 80: 756-770.
34. Ramamoorthy, V., T. Raguchander and R. Samiyappan. 2002. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici. Plant and Soil, 239(1): 55-68.
35. Rubini, M.R., R.T. Silva-Ribeiro, A.W.V. Pomella, C.S. Maki, W.L. Araújo, D.R. Dos Santos and J.L. Azevedo. 2005. Diversity of endophytic fungal community of Cacao (*Theobroma cacao* L.) and biological control of *Crinipellis perniciosa*, causal agent of Witches' Broom Disease. International Journal of Biological Sciences, 1: 24-33.
36. Schulz, B., U. Wanke and S. Draeger. 1993. Endophytes from herbaceous and shrubs: effectiveness of surface sterilization method. Mycological Research, 97: 1447-1450.
37. Sekhon, A., J.Y. Wang, J.C. Tan, S.P. Holland and S.N. Yeung. 2020. Limbal stem cell deficiency secondary to systemic paclitaxel (Taxol) for breast cancer: a case report. BMC ophthalmology, 20(1): 1-4.
38. Staniszewska, M., A. Sobiepanek, G. Małgorzata, E. Pena-Cabrera, I.J. Arroyo-Cordoba, K. Michalina, L. Kuryk, M. Wieczorek, M. Koronkiewicz, T. Kobiela and Z. Ochal. 2020. Sulfone derivatives enter the cytoplasm of *Candida albicans* sessile cells. European Journal of Medicinal Chemistry, 191: 112-139.
39. Strobel, G., X. Yang, J. Sears, R. Kramer, R.S. Sidhu and W.M. Hess. 1996. Taxol from *Pestalotiopsis microspora*, an endophytic fungus of *Taxus wallichiana*. Microbiology, 142(2): 435-440.
40. Tejesvi, M.V. and A.M. Pirttila. 2018. Endophytic fungi, occurrence, and metabolites. Physiology and Genetics, 15: 213-230.
41. Wang, C.J., Y.Z. Wang, Z.H. Chu, P.S. Wang, B.Y. Liu, B.Y. Li, X.L. Yu and B.H. Luan. 2020. Endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* YTB1407 elicits resistance against two fungal pathogens in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.). Journal of Plant Physiology, 253: 153260.
42. Wani, M.C., H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon and A.T. McPhail. 1971. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. Journal of the American Chemical Society, 93(9): 2325-2327.
43. White, D.J., W. Chen and K.L. Schroeder. 2019. Assessing the contribution of ethaboxam in seed treatment cocktails for the management of metalaxyl-resistant *Pythium ultimum* var. ultimum in Pacific Northwest spring wheat production. Crop Protection, 115: 7-12.
44. Yang, G., P. Li, L. Meng, K. Xv, F. Dong, Y. Qiu, L. He and L. Lin. 2018. Diversity and communities of culturable endophytic fungi from different tree peonies (geoherbs and non-geoherbs) and their biosynthetic potential analysis. Brazilian Journal of Microbiology, 49: 47-58.
45. Zhang, P., P.P. Zhou and L.J. Yu. 2009. An Endophytic taxol-producing fungus from *Taxus media*, *Cladosporium cladosporioides* MD2. Current Microbiology, 59(3): 227-232.
46. Zhao, C., X. Zhang, H. Hua, C. Han and X. Wu. 2019. Sensitivity of *Rhizoctonia* spp. to flutolanil and characterization of the point mutation in succinate dehydrogenase conferring fungicide resistance. European Journal of Plant Pathology, 155(1): 13-23.

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2025-07-05]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1401.10.20.10.7]
[DOI: 10.52547/ifej.10.20.1]

The Role of Endophytic Fungi Isolated from Native Iranian Yew (*Taxus baccata*) in Biological Control of *Fusarium Oxysporum*

Mahboubeh Ashnavar[1], Azim Ghasemnezhad[2], Kamran Rahnama[3] and Mostafa Khoshhal Sarmast[4]

1- Ph.D. Student, Department of Horticultural Sciences, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
2- Associate Professor, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran. (Corresponding author: ghasemnezhad@gau.ac.ir)
3- Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
4- Assistant Professor, Department of Horticulture Sciences, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
Received: 7 December, 2021 Accepted: 11 January, 2022

Extended Abstract

Introduction and Objective: The yew tree is a native conifer of Iran. This plant is the main source of the anti-cancer drug Taxol. Research has shown that yew coexisted with endogenous fungi. These endophytes increase food availability, resistance to pests, diseases, and environmental stresses by producing secondary metabolites that they provide to their hosts. Isolation and characterization of this type of microorganism can be important to discover new species with the potential to produce antimicrobial compounds. Therefore, this study was performed to investigate the effect of systemic fungicides and antagonistic effects of endophytic fungi isolated from yew against the pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*.

Materials and Methods: This research was conducted in Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. To isolate the endophytes, two groups of plants were used, including plants treated with systemic fungicides (Rovral-TS and Fosetyl aluminum) and control. Treatments were applied by foliar application in three periods with an interval of seven days. After foliar application, the root, stem, and leaf of experimental plants were used to isolate endophytes. Selected isolated endophytes were used to determine the percentage of inhibition against *F. oxysporum*. Finally, molecular identification of selected and effective strains from isolated endophytic fungi was performed.

Results: The research results showed that all the endophytic fungi isolated from yew could inhibit pathogen growth. Based on molecular studies, five strains of identified endophytic fungi belonged to the genera *Fusarium*, *Phomopsis*, and *Colletotrichum*. Fungi which were identified from fosetyl aluminum-treated organs showed the most growth inhibitory effect. Among the identified fungi, *Fusarium solani* had the highest inhibitory power with 71.81% inhibition, which was obtained from yew seedlings treated with rovral-TS systemic fungicide. The least inhibitory effect was related to *Phomopsis sp*. with 12.97% inhibition. This fungus was isolated from yew seedlings in the control treatment.

Conclusion: In general, the results showed that endophytic fungi isolated from native Iranian yew seedlings have a high ability to biologically control the pathogen *F. oxysporum*. In addition, the application of systemic fungicides not only directly inhibits pathogens, but strengthening endophytic fungi can protect the plant against pathogens as well.

Keywords: Endophytic fungi, Fosetyl aluminum, *Fusarium solani*, Rovral-TS, Yew

[Downloaded from ifej.sanru.ac.ir on 2025-07-05]
[DOR: 20.1001.1.24237140.1401.10.20.10.7]
[DOI: 10.52547/ifej.10.20.1]