فصلنامه تحقیقات بیماری های گیاهی
سال اول، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۲
صص ۱۵-۱

بررسی توانایی آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت ریشه و گونه‌های تریکودرما برروی قارچ *Macrophomina phaseolina* در شرایط آزمایشگاهی

فریبا عباس زاده[۱]، ابراهیم محمدی گل تپه*[۱] ، ابراهیم پورجم [۱]، امیر خراسانی[۱]، یونس رضایی دانش[۲]، آجت ورما [۳]
تاریخ دریافت: ۹۲/۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۲/۸/۲۲

چکیده

در این تحقیق، از دو قارچ اندوفیت ریشه (*Piriformospora indica* و *Sebacina vermifera*) و دو گونه تریکودرما (*Trichoderma harzianum* (T-100) و *T. viride*) علیه قارچ *Macrophomina phaseolina* استفاده گردید. توانایی آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت ریشه و گونه های تریکودرما از طریق آزمایش‌های درون شیشه‌ای و به کمک روش کشت متقابل، کلنیزاسیون و تولید متابولیت های فرار مورد ارزیابی قرار گرفت. مساحت پرگنه *M. phaseolina* هر روز اندازه‌گیری و درصد کاهش رشد هر روز در مقایسه با تیمار شاهد محاسبه شد. در کشت متقابل، تیماری که شامل هر دو گروه قارچ‌های اندوفیت و گونه های تریکودرما بود، بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی رشد میسلیومی *M. phaseolina* داشت. بررسی قدرت کلنیزاسیون نشان داد که قارچ های آنتاگونیست قادرند پرگنه *M. phaseolina* را در برگرفته و آن را تجزیه نمایند. نتایج آزمون متابولیت‌های فرار نیز مشخص نمود که قارچ های اندوفیت بر خلاف گونه‌های تریکودرما قادر به تولید متابولیت‌های فرار نمی‌باشند.

واژه های کلیدی: کنترل بیولوژیکی، *Piriformospora indica*، *Sebacina vermifera*، *Trichoderma* spp. و *Macrophomina phaseolina*.

۱- گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران ایران.
۲- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه، ارومیه ایران.
۳- گروه مطالعاتی گیاهان داروئی و میکروبی، دانشگاه آمیتی نویدا ایالت اترپرادش، هندوستان.
*نویسنده مسئول مقاله: emgoltapeh@yahoo.com or emgoltapeh@modares.ac.ir.

مقدمه:

قارچ *Macrophomina* یک بیمارگر خاک برد، متعلق به زیر شاخه دئوترومیکوتینا (Deutromycotina) و رده سلومیست (Coelomycetes) و خانواده Botryosphaeriaceae بوده که فقط دارای یک گونه *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid می‌باشد. فرم جنسی این گونه هنوز مشخص نشده است (Crous *et al*., 2006). از گونه‌های همنام مختلف نسبت داده شده به *M. phaseolina* می توان به *M. conjani*، *M. conchoci* و *Rhizoctonia bataticola* اشاره نمود (Mihail, 1992).

این گونه در فاز ساپروفیتی (*R. bataticola*) تولید میکرواسکلروت و در فاز بیمارگری (*M. phaseolina*) تولید پیکنید می‌کند (Fernandez, 2006). پیکنیدیوسپورها بیضوی تا گرد بوده و (۲۳-) ۲۴-۲۰ (-۱۶) (۱۱-) ۹-۷ (-۶) میکرومتر اندازه دارند (Ndiage, 2007). در طی تشکیل میکرواسکلروت، ۵۰ تا ۲۰۰ سلول منفرد هیفی در هم تنیده و اجسام پرسلولی را به وجود می آورند. میکرواسکلروت ها سیاه بوده و بسته به مواد غذایی در دسترس در سوبسترا، هر زادمایه ۵۰ تا ۱۵۰ میکرومتر اندازه دارد (Short and Wyllie, 1978).

قارچ های اندوفیت *Piriformospora indica* Varma (Varma *et al*., 1998) اولین بار از خاک های صحرایی هند و *Sebacina vermifera* Warcup (Warcup, 1988) نیز از نوعی ارکید در استرالیا جدا شدند. این قارچها جزء قارچهای شبه میکوریز بوده اما برخلاف آنها به آسانی بر روی محیط‌های مصنوعی قابل کشت می باشند (Varma *et al*., 2001; Peskan-Berghofer *et al*., 2004). این دو گونه قارچی از اعضای خانواده Sebacinaceae بوده و به راسته Sebacinales تعلق دارند (Weiss *et al*., 2004). تحقیقات مختلف حاکی از توانایی قارچ های اندوفیت در کنترل بیولوژیکی بسیاری از بیمارگرهای گیاهی می باشد. وارما و همکاران (Varma *et al.,*2000) و فام و همکاران (Pham *et al*., 2004a)، نشان دادند که گونه *P.indica* تاثیر قابل توجهی بر کنترل بیمارگر *Gaeumannomyces graminis* در گندم دارد به طوری که وقتی ریشه و بذور گندم با این گونه مایه زنی شدند، گیاه در برابر بیمارگر مقاوم شده و از رشد خوبی نیز برخوردار شد. در این مطالعه گونه *P.indica*، توانست تحت شرایط آزمایشگاهی رشد سایر قارچ های خاک برد نظیر *Macrophomina phaseolina*، *Alternaria* sp.، *Rhizoctorina* sp. و *Fusarium* sp. را نیز کاهش دهد. گونه‌های تریکودرما از قارچ های آزادزی بوده و در محیط ریشه، خاک و اندام های هوایی گیاه در حالت تعامل با میکروارگانیسم های مختلف دیگر به سر می برند. گونه های این قارچ دامنه وسیعی از مواد آنتی بیوتیکی را تولید کرده و به عنوان انگل سایر قارچ ها فعالیت می‌کنند (Papavizas, 1985; Samuels, 1996; Zimand *et al*., 1996; De Meyer *et al*., 1998; Sivasithamparam and Ghisalberti, 1998). همچنین قادرند با دیگر میکروارگانیسم ها رقابت نمایند. گونه های این قارچ قادرند ترشحات ناشی از بذور که سبب تحریک جوانه‌زنی پروپاگول قارچ های بیمارگر می‌گردند را سریعا جذب و از دسترس بیمارگرها خارج سازند (Howell, 2002). از طرفی برای کسب مواد غذایی و فضا در خاک با دیگر میکروارگانیسم ها رقابت می‌کنند (Elad, 1996). از گونه‌های آنتاگونیست بسیار معروف این جنس می توان به گونه های *Trichoderma viride* Fr. و *T. harzianum* Rifai اشاره نمود که علیه قارچ های مختلفی چون *Sclerotium rolfsii*، *Rhizoctonia solani* و *Pythium* spp. و غیره موثر می باشند. از سایر گونه ها می توان *T. virens* Von Arx را نام برد (Miller *et al*., 1975). گونه های تریکودرما سبب کاهش و یا تجزیه پکتینازها و دیگر آنزیم هایی می‌شوند که برای توسعه و نفوذ قارچ های بیمارگری چون *Botrytis cinerea* به بافت برگ ضروری می باشند (Zimand *et al.,* 1996). هدف از انجام این مطالعه، بررسی توانایی آنتاگونیستی قارچ های اندوفیت ریشه (*P. indica* و *S. vermifera*) و گونه‌های تریکودرما (*Trichoderma harzianum* (T-100) و *T. viride*) علیه قارچ خاکزاد *M. phaseolina* می‌باشد.

مواد و روش ها:

کشت و نگهداری قارچ ها

قارچ های مورد آزمایش در تحقیق حاضر، از کلکسیون قارچ شناسی گروه بیماری شناسی دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس تهیه و مورد استفاده قرار گرفتند. برای کشت قارچ های اندوفیت ریشه از محیط کشت کیفر (Kaefer, 1977) استفاده گردید. این قارچ ها در تشتک های محتوی محیط کیفر کشت و سپس تحت شرایط تاریکی و دمای ۲± ۳۰ °C برای مدت یک هفته نگهداری شدند (Varma *et al*., 1998; Peskan-Berghofer *et al*., 2004). جهت تهیه محیط مایع کیفر، قبل از اضافه کردن محلول ویتامین، اسیدیته محیط با استفاده از دو محلول KOH و HCl روی ۶/۵ تنظیم گردید. بعد از ضد عفونی محیط در اتوکلاو و کاهش دما به حدود ۵۰- ۴۰ درجه سانتیگراد، مقدار یک میلی‌لیتر از محلول ویتامین به محیط اضافه گردید. محلول ویتامین محتوی ۵ گرم/لیتر بیوتین (Biotin)، ۵۰ گرم/لیتر نیکوتینامید (Nicotinamide)، ۱۰ گرم/لیتر پیریدوکسال فسفات (Pyridoxal phosphate)، ۱۰ گرم/لیتر آمینوبنزوئیک اسید (Aminobenzoic acid) و ۲۵ گرم/لیتر ریبوفلاوین (Riboflavin) می‌باشد. در مرحله بعد، تعداد ۵- ۴ عدد دیسک از محیط پرگنه قارچی به ظروف محتوی محیط مایع منتقل و بر روی شیکر با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه و دمای ۲±۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. هر یک از گونه‌های تریکودرما و بیمارگر نیز بر روی محیط PDA کشت و در دمای ۲± ۲۸ درجه سانتیگراد نگهداری شدند.

بررسی ویژگی های مرفولوژیک قارچ های اندوفیت

به منظور بررسی و مطالعه ویژگی های مرفولوژیک نظیر رنگ میسلیوم، وضعیت میسلیوم ها در کشت های مسن تر، وجود یا عدم وجود دیواره در هیف، نوع اسپور و محل تشکیل آنها بر روی هیف، منفرد یا مجتمع بودن اسپورهای تشکیل یافته، شکل اسپور، رنگ اسپور و وضعیت سیتوپلاسم در قارچ های مورد مطالعه، نمونه اسلاید از کشت تازه ۱۰- ۷ روزه قارچ تهیه و زیر میکروسکپ نوری مطالعه گردید (Varma *et al.,* 1998; Singh *et al.,* 2003).

تعیین دمای بهینه برای رشد قارچ های اندوفیت

پس از تهیه محیط کشت کیفر، قطعه ای از قارچ در مرکز تشتک نه سانتی متری کشت گردید. تشتک ها پس از تلقیح تحت دماهای مختلف ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. نتایج پس از گذشت ۱۲- ۱۰ روز اندازه گیری و ثبت گردید (Varma et al., 1998; Hill and Kaefer, 2001; Singh et al., 2003; Malla et al., 2004; Oelmuller et al., 2004; Pham et al., 2004b; Waller et al., 2005).

تعیین pH مناسب برای کشت قارچ های اندوفیت

جهت بررسی و تعیین pH های مختلف بر روی رشد میسلیوم و قدرت اسپورزایی قارچ های اندوفیت، ابتدا محیط مایع کیفر تهیه و به مقدار ۱۰۰ میلی لیتر در داخل ظروفی به حجم۳۰۰ میلی لیتر ریخته شد. در این آزمایش میزان رشد قارچ‌های اندوفیت تحت pH های مختلف (۵، ۵/۵، ۶/۰، ۶/۵، ۷/۰، ۷/۵ و ۸/۰) در ۳ تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این منظور پس از آماده کردن محیط کشت مایع و ریختن آن در داخل ظروف، pH هر کدام از ظروف به ترتیب فوق تنظیم و سپس ظروف به مدت ۲۵ دقیقه اتوکلاو شده و پس از کاهش دما به ۵۰- ۴۵ درجه سانتیگراد، محلول ویتامین به محیط ها اضافه گردید. در مرحله بعد، به منظور کشت قارچ های اندوفیت در داخل محیط مایع، پنج قطعه از پرگنه فعال قارچ از محیط کشت هفت روزه آن جدا و سپس به داخل ظروف رها شدند.

ظروف پس از کشت بر روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه تحت دمای ۲±۳۰ درجه سانتیگراد به مدت دو هفته نگهداری شدند. پس از گذشت دو هفته از زمان کشت، میسلیوم موجود در هر یک از ظروف بعد از ۳ بار شستشو با آب مقطر، از محیط مایع جدا شده و سپس با استفاده از دستگاه پمپ خلا عمل آبگیری انجام گرفت. سپس به طور مجزا هر میسلیوم خشک شده داخل یک کاغذ صافی سترون قرار داده شد. وزن هر کدام از کاغذ های صافی برای pH موردنظر قبل از اتوکلاو مشخص شد. برای تعیین pH مناسب جهت رشد بهتر قارچ های اندوفیت وزن میسلیوم خشک بر حسب گرم محاسبه و متعاقب آن pH

مناسب برای رشد قارچ های اندوفیت تعیین گردید (Varma *et al*., 1998; Hill and Kaefer, 2001; Singh *et al*., 2003; Malla *et al*., 2004; Oelmuller *et al*., 2004; Pham *et al*., 2004b; Waller *et al*., 2005).

تعیین دمای بهینه برای رشد قارچ بیمارگر (*Macrophomina phaseolina*)

برای این منظور محیط کشت PDA تهیه و تحت شرایط سترون به داخل تشتک ها ریخته شد. سپس قطعه ای از حاشیه پرگنه فعال قارچ در مرکز تشتک ها کشت و سپس تحت دماهای ۲± ۲۵، ۲±۳۰، ۲±۳۵ و ۲±۴۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند (Dhingra and Sinclair, 1973).

تشتک ها پس از گذشت ۵- ۳ روز از زمان کشت، جهت ارزیابی میزان رشد میسلیوم بیمارگر مورد بررسی قرار گرفتند به طوری که میزان رشد میسلیوم قارچ به دقت با استفاده از خط کش و از پشت تشتک ها اندازه گیری شد.

بررسی قدرت بازدارندگی قارچ های اندوفیت و گونه های تریکودرما از رشد قارچ بیمارگر

تشتک های محتوی ۲۰ میلی لیتر محیط کشت با قطعات ۵ میلی متری از پرگنه فعال قارچ های آنتاگونیست و بیمارگر مایه‌زنی شدند (Morton and Stroulde, 1995; Kucuk and Kivanc, 2003).

کشت متقابل

در این آزمون، ابتدا قطعه پنج میلی متری از حاشیه پرگنه فعال قارچ اندوفیت در یک سمت تشتک کشت و سپس در دمای ۲۷ درجه سانتیگراد نگهداری شد. بعد از گذشت چهار روز که اندوفیت رشد نمود، در سمت مقابل همان تشتک بنا بر نوع تیمار قطعه پنج میلی متری از حاشیه پرگنه فعال بیمارگر به تنهایی و یا به همراه جدایه های تریکودرما کشت شدند. آزمون کشت متقابل در ۱۱ تیمار و سه تکرار انجام شد. نتایج بعد از گذشت سه روز از زمان کشت، مورد بررسی قرار گرفت و میزان رشد بیمارگر ارزیابی شد. تیمارهای مورد آزمایش در این آزمون شامل موارد ذیل بود:

۱-تیمار شاهد شامل کشت قطعه ای از پرگنه فعال بیمارگر در مرکز تشتک.

۲-کشت قطعه ای از حاشیه پرگنه فعال *Trichoderma viride* در یک سمت تشتک و کشت بیمارگر در سمت مقابل آن.

۳-کشت گونه *Trichoderma harzianum*(T-100) در یک سمت تشتک و کشت بیمارگر در سمت مقابل آن.

۴-کشت دو قطعه از حاشیه پرگنه *T.harzianum* (T-100) در دو قطب مقابل و کشت دو قطعه از حاشیه پرگنه *T. viride* در دو قطب عمود بر آن و کشت بیمارگر در مرکز تشتک.

۵-کشت قطعه ای از حاشیه پرگنه فعال *Piriformospora indica* در یک سمت تشتک برای مدت چهار روز و کشت بیمارگر در سمت مقابل آن.

۶-کشت قطعه ای از حاشیه پرگنه فعال *Sebacina vermifera* در یک سمت تشتک برای مدت چهار روز و کشت بیمارگر در سمت مقابل آن.

۷-کشت دو قطعه از پرگنه *P. indica* در دو قطب مقابل تشتک و کشت دو قطعه از پرگنه *S. vermifera* در دو قطب مقابل آن برای مدت چهار روز و کشت بیمارگر در مرکز تشتک.

۸-کشت دو قطعه از حاشیه پرگنه فعال *Piriformospora indica* در دو قطب مقابل تشتک برای مدت چهار روز و کشت دو قطعه از پرگنه *T. viride* در دو قطب مقابل آن و کشت بیمارگر در مرکز تشتک.

۹-کشت دو قطعه از حاشیه پرگنه فعال *Piriformospora indica* در دو قطب مقابل تشتک برای مدت چهار روز و کشت دو قطعه از پرگنه *T. harzianum* (T-100) در دو قطب مقابل آن و کشت بیمارگر در مرکز تشتک.

۱۰-کشت دو قطعه از پرگنه *S.vermifera* در دو قطب مقابل تشتک برای مدت چهار روز و کشت دو قطعه از پرگنه *T. viride* در دو قطب مقابل آن و کشت بیمارگر در مرکز تشتک.

۱۱-کشت دو قطعه از حاشیه پرگنه فعال *S. vermifera* در دو قطب مقابل تشتک برای مدت چهار روز و کشت دو قطعه از پرگنه *T. harzianum* (T-100) در دو قطب مقابل آن و کشت بیمارگر در مرکز تشتک.

بررسی قدرت کلنیزاسیون قارچ های اندوفیت ریشه بر روی قارچ بیمارگر

برای این منظور محیط کشت کیفر تهیه و در داخل تشتک ها ریخته شد. این آزمون با چهار تیمار به شرح ذیل صورت پذیرفت (Dennis and Webster, 1971; Goyal *et al*., 1994):

۱-کشت قطعه ای از پرگنه فعال بیمارگر در سطح کشت هفت روزه اندوفیت.

۲-کشت قطعه ای از حاشیه پرگنه اندوفیت در سطح کشت یک روزه بیمارگر.

۳-کشت قطعه ای از اندوفیت در سطح قطعه ای از پرگنه فعال بیمارگر به طور همزمان.

۴-تیمار شاهد شامل کشت قطعه ای از محیط کشت فاقد قارچ در سطح قطعه ای از حاشیه پرگنه بیمارگر.

تشتک ها در دمای ۲± ۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۵- ۴ روز نگهداری شدند. پس از طی این مدت، تشتک ها به منظور بررسی تعامل بین دو قارچ بیمارگر و اندوفیت مورد ارزیابی قرار گرفتند.

بررسی پدیده های دخیل در کنترل قارچ بیمارگر

برای این منظور قبل از ریختن محیط کیفر در داخل تشتک ها، یک لام سترون در مرکز هر تشتک قرار گرفت. سپس محیط کشت به داخل تشتک ها طوری ریخته شد که لایه ای از آن سطح لام را پوشاند. بعد از این مرحله در یک سمت لام قطعه پنج میلی متری از حاشیه پرگنه فعال قارچ های اندوفیت کشت و پس از نگهداری در دمای ۲±۳۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳- ۲ روز، قطعه پنج میلی متری از بیمارگر در سمت مقابل آن قرار داده شد. بعد از سپری شدن ۱۰- ۷ روز و رسیدن میسلیوم قارچ های اندوفیت بر روی لام و سطح بیمارگر، لام ها به دقت برداشته شده و جهت بررسی پدیده های به وقوع پیوسته و مکانیسم های دخیل در بازدارندگی از رشد مورد بررسی و مطالعه میکروسکوپی قرار گرفتند.

بررسی تاثیر متابولیت های فرار گازی قارچ های اندوفیت **بر رشد قارچ بیمارگر**

بدین منظور، ابتدا محیط کشت کیفر تهیه و داخل تشتک ها ریخته شد. این مطالعه در دو حالت مورد بررسی قرار گرفت (Dennis and Webster, 1971; Goyal *et al*., 1994). در حالت اول قطعات پنج میلی متری از حاشیه کشت هفت روزه قارچ اندوفیت در مرکز تشتک های محتوی محیط کشت اختصاصی مایه زنی گردید. چهار روز بعد، تعدادی دیگر از تشتک ها توسط قطعه ای از بیمارگر به همان صورت کشت شدند. سپس به آرامی در کنار شعله و تحت شرایط کاملا سترون، با دقت درب هر دو تشتک را برداشته و دهانه دو تشتک شامل اندوفیت و بیمارگر به طوری که کاملا بر هم منطبق باشند روی یکدیگر قرار داده شدند. تشتک حاوی بیمارگر در زیر و تشتک حاوی اندوفیت در روی آن به طور وارونه قرار گرفت. به منظور جلوگیری از خروج هر گونه ترکیب فرار از درون تشتک ها، دور تا دور دهانه تشتک ها با پارافیلم مسدود و سپس تشتک ها در دمای۲±۳۰ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. تعدادی از تشتک ها به عنوان شاهد در نظر گرفته شدند به طوری که تشتک های حاوی بیمارگر روی تشتک های خالی و حاوی محیط کشت مایه زنی نشده قرار داده شدند.

در حالت دوم به منظور بررسی تاثیر ترکیبات فرار بر تولید بافت رویشی بیمارگر، کشت همزمان دو قارچ اندوفیت و بیمارگر در تشتک های جداگانه روی همدیگر به طور منطبق قرار گرفت. در کلیه حالات در صد بازدارندگی از رشد طبق فرمول (Vincent, 1947) به شرح ذیل محاسبه گردید:

$$\text{درصد بازدارندگی از رشد} = \frac{\text{قطر پرگنه قارچ در شاهد} - \text{قطر پرگنه قارچ در تیمار مورد نظر}}{\text{قطر پرگنه قارچ در تیمار شاهد}} \times ۱۰۰$$

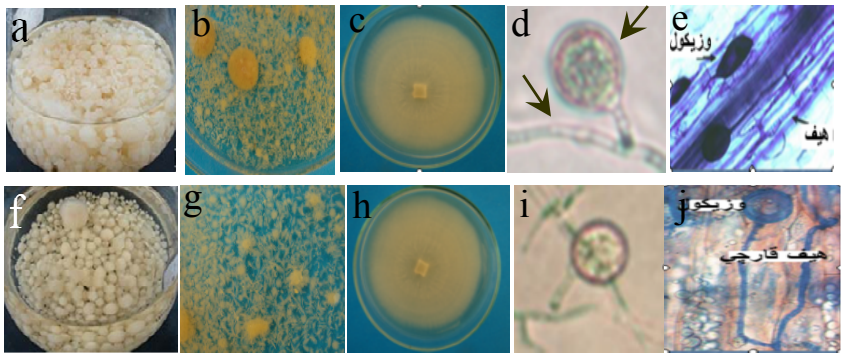
نتایج

کشت، نگهداری و بررسی ویژگی های مرفولوژیک قارچ های اندوفیت

مطالعات آزمایشگاهی به عمل آمده در مورد بررسی خصوصیات مرفولوژیک قارچ های اندوفیت نشان داد که میسلیوم‌های جوان، سفید و اغلب براق بوده و در هم فرو رفته‌اند. هیف‌ها اغلب دیواره نازکی دارند. در کشت های مسن، هیف ها اغلب به

طور نامنظم متورم شده و گره‌های مرجانی شکل تشکیل می‌دهند و گرانوله به نظر می‌رسند. هیف ها گاهی اوقات به طور نامنظم دیواره‌دار می‌شوند (شکل ۱: d و i). به همین خاطر تعداد زیادی از سلول ها بیش از یک هسته دارند. کلامیدوسپورها با دیواره نازک در نوک هیف ها تشکیل می‌شوند که ممکن است به صورت منفرد یا خوشه‌ای قرار گیرند و ظاهری گرد تا گلابی‌شکل داشته باشند (شکل ۱: d و i). بسیاری از اسپورهای جوان، دیواره ای نازک و به رنگ روشن دارند. در انواع بالغ، دیواره اسپورها ظاهری دو لایه دارد. دیواره‌ها صاف و به رنگ زرد روشن دیده می شوند (شکل ۱: d و i). سیتوپلاسم کلامیدوسپورها انبوه و آکنده از مواد گرانوله‌ای بوده و هر اسپور معمولاً حاوی ۲۵- ۸ عدد هسته می‌باشد (شکل ۱: d و i).

خصوصیات مرفولوژیک قارچ های *P. indica* و *S. vermifera* از نظر تمامی موارد ذکر شده در بالا یکسان و مشابه بوده و تنها تفاوت آنها در دو مورد مشهود است. یکی شکل کلامیدوسپور آنهاست که در *P.indica* گلابی شکل (شکل ۱: d و e) و در *S. vermifera* گرد تا بیضوی است (شکل ۱: i و j) و دیگری نحوه رشد پرگنه قارچ ها در محیط کشت کیفر می باشد که در *P.indica* رشد به طور یکنواخت و همگن و به شکل دوایر متحدالمرکز بوده (شکل ۱: a و b و c) و اما در قارچ *S.vermifera* به صورت کاملا خشن و مرجانی شکل و نقاط فرورفته می باشد (شکل ۱: f و g و h).



شکل ۱- مشخصات ماکروسکوپی و میکروسکوپی قارچ های اندوفیت *Piriformospora indica* و *Sebacina vermifera*

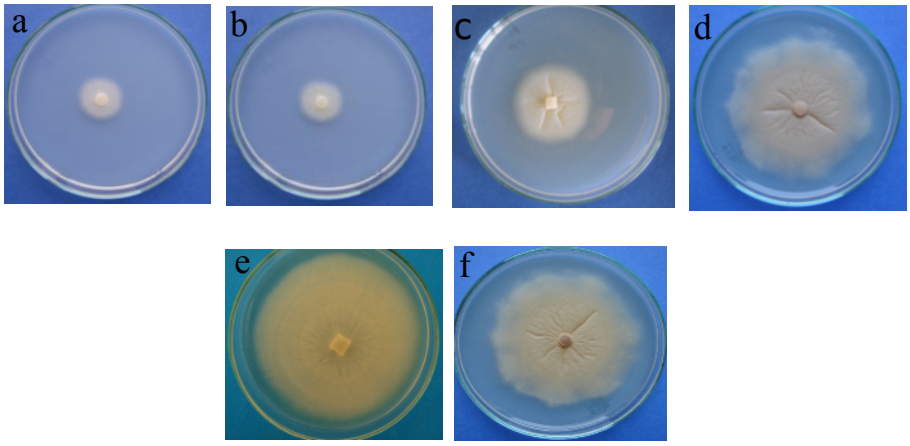
a و b: الگوی رشدی قارچ *P. indica* در محیط مایع کیفر (Kafer)، c: نمایی از رشد پرگنه قارچ *P. indica* در محیط جامد کیفر، d: هیف دیواره‌دار و کلامیدوسپور گلابی شکل با دیواره دو لایه ای *P. indica*، e: استقرار کلامیدوسپور های گلابی شکل *P. indica* در داخل ریشه، f و g: الگوی رشدی قارچ *S. vermifera* در محیط مایع کیفر (Kafer)، h: نمایی از رشد پرگنه قارچ *S. vermifera* در محیط جامد کیفر، i: هیف دیواره‌دار و کلامیدوسپور گرد با دیواره دو لایه ای *S. vermifera* و j: استقرار کلامیدوسپور های گرد *S. vermifera* در داخل ریشه

تعیین دمای بهینه برای رشد قارچ‌های اندوفیت

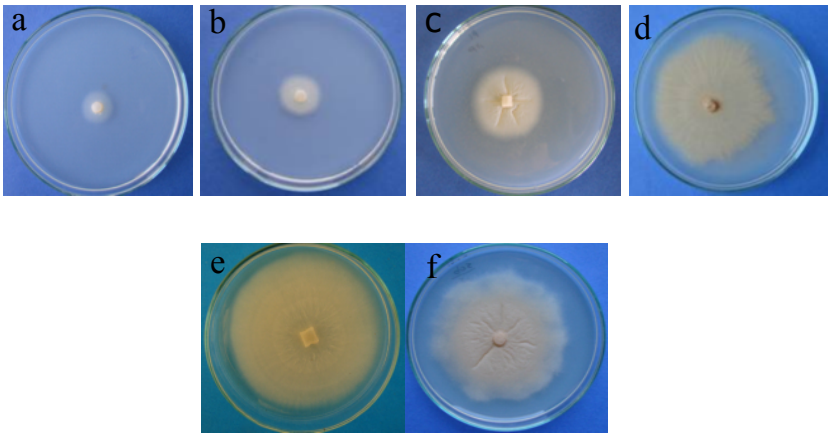
نتایج حاصل از بررسی میزان رشد پرگنه پس از گذشت ۱۲- ۱۰ روز در دماهای مختلف ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ درجه سانتیگراد در مورد قارچ های *P. indica* و *S. vermifera* به شرح ذیل بود (جدول ۱ و اشکال ۲ و ۳).

جدول ۱- میزان رشد پرگنه قارچ های اندوفیت در دماهای مختلف بر حسب سانتی متر

دما (°C) / قارچ های اندوفیت	۱۰	۱۵	۲۰	۲۵	۳۰	۳۵
S. vermifera	۱	۲/۶	۴	۶/۴	۸/۶	۸/۲
P. indica	۱/۲	۳/۲	۴/۶	۶/۸	۸/۴	۸/۴



شکل ۲- میزان رشد پرگنه قارچ *Piriformospora indica* در محیط جامد کیفر تحت دماهای مختلف a: دمای ۱۰ °C، b: دمای ۱۵ °C، c: دمای ۲۰ °C، d: دمای ۲۵ °C، e: دمای ۳۰ °C و f: دمای ۳۵ °C



شکل ۳- میزان رشد پرگنه قارچ Sebacina vermifera در محیط جامد کیفر تحت دماهای مختلف a: دمای ۱۰ °C، b: دمای ۱۵ °C، c: دمای ۲۰ °C، d: دمای ۲۵ °C، e: دمای ۳۰ °C و f: دمای ۳۵ °C

تعیین pH مناسب برای کشت قارچ های اندوفیت در شرایط آزمایشگاهی

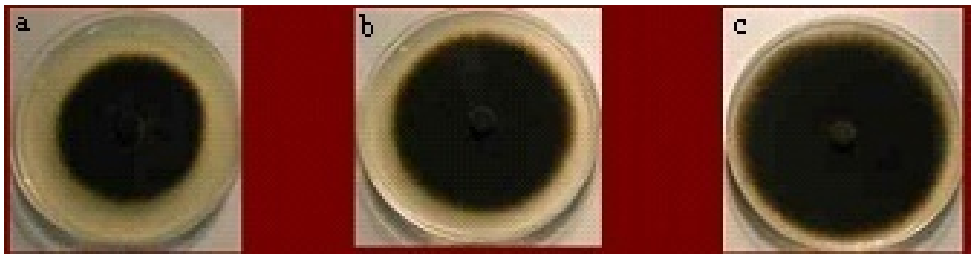
نتایج حاصل از این آزمایش (جدول ۲) حاکی از آن بود که قارچ های اندوفیت در pH های مختلف، رشد متفاوتی ازخود نشان دادند. در این آزمون، وزن خشک پرگنه قارچ به عنوان معیاری از میزان رشد در pH مورد نظر بر حسب گرم مورد اندازه گیری قرار گرفت. در این بین، pH= ۶/۵ بیشترین تاثیر را بر روی رشد میسلیوم قارچ های اندوفیت نشان داد. اگر چه بهترین رشد برای قارچ های اندوفیت در pH= ۶/۵ اتفاق افتاد، اما هریک از گونه های قارچی در سایر pH ها رشد متفاوتی را نسبت به یکدیگر نشان دادند. بدین ترتیب که گونه *S. vermifera* در pH خنثی (pH= ۷) و یا نزدیک به خنثی (pH= ۶)، رشد بیشتری نسبت به قارچ *P. indica* داشت در حالیکه گونه *P. indica* در دیگر pH ها، بالاترین میزان رشد را به خود اختصاص داده بود.

جدول ۲- وزن خشک میسلیوم قارچ های اندوفیت بر حسب گرم در اسیدیته های مختلف

قارچ های اندوفیت	pH های مختلف و وزن خشک قارچ بر حسب گرم						
	۵	۵/۵	۶	۶/۵	۷	۷/۵	۸
P. indica	۰/۱۵۹	۰/۱۷۳	۰/۱۵۳	۰/۱۸۰	۰/۱۴۷	۰/۱۵۲	۰/۱۳۶
S. vermifera	۰/۱۵۴	۰/۱۷۰	۰/۱۵۸	۰/۱۷۶	۰/۱۴۹	۰/۱۴۴	۰/۱۳۵

تعیین دمای بهینه برای رشد قارچ بیمارگر

در بین دماهای مورد آزمایش، مناسب‌ترین دما برای رشد قارچ *M. phaseolina* دمای بین ۳۷- ۳۵ درجه سانتیگراد گزارش گردید. تحت این دما و پس از گذشت ۷۲ ساعت قطر پرگنه در داخل تشتک معادل ۹ سانتی متری تخمین زده شد (شکل 4c). اندازه قطر پرگنه در دمای بین ۲۷- ۲۵ درجه سانتیگراد در مدت ۷۲ ساعت معادل ۵- ۳ سانتی متر بر آورد شد (شکل 4a). در دمای بین ۳۲- ۳۰ درجه سانتیگراد نیز میزان رشد قارچ حدود ۶/۵ تا ۸/۰ سانتی متر بود (شکل 4b). در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد و در همین مدت زمان، رشد قارچ در مقایسه با دیگر دماهای مورد آزمایش به صورت کاملا مشهود کاهش و قطر پرگنه حدود دو سانتی متر تنزل یافت. لذا تحت این دما و همچنین در دماهای پایین تر از ۲۵ درجه سانتیگراد، سرعت رشد بسیار کاهش یافت به طوری که گاه رشد قارچ متوقف گردید.



شکل ۴- میزان رشد پرگنه قارچ *Macrophomina phaseolina* در محیط PDA تحت دماهای مختلف:
a: دمای ۲۷ °C-۲۵، b: دمای ۳۲ °C-۳۰ و c: دمای ۳۷ °C-۳۵

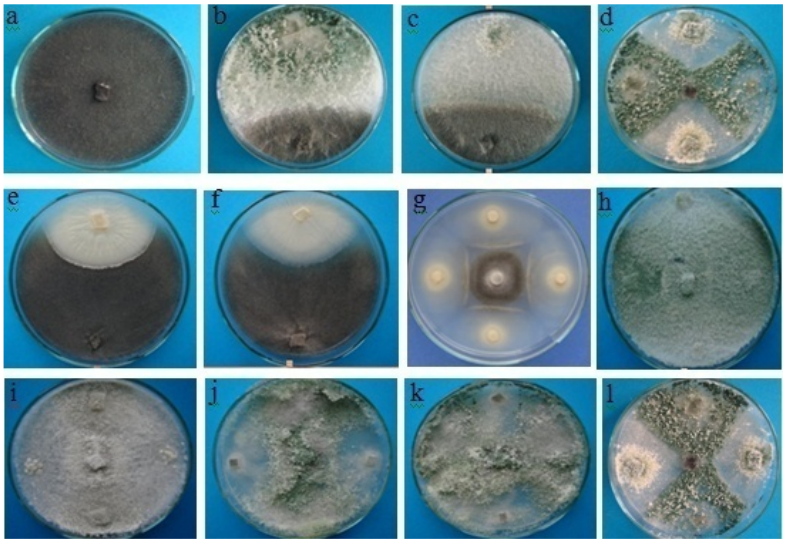
بررسی قدرت بازدارندگی از رشد بیمارگر توسط قارچ‌های اندوفیت ریشه وگونه های تریکودرما در آزمون کشت متقابل

نتایج حاصل از این آزمایش (جدول ۳) نشان داد که تمامی قارچ های اندوفیت ریشه و گونه های تریکودرما اثر معنی داری در کاهش رشد میسلیوم قارچ داشتند و بین تیمارها اختلاف معنی داری در سطح ۱٪ وجود داشت. در این آزمون، اثر هر یک از قارچ های آنتاگونیست در کاهش رشد بیمارگر مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه میانگین داده ها توسط آزمون LSD (جدول ۴) نشان داد که بین عوامل کنترل بیولوژیک از نظر کاهش رشد میسلیوم اختلاف معنی داری وجود دارد. درصد کاهش رشد بیمارگر در تیمارهای مختلف متفاوت و تیمار یازدهم با ۹۶/۷۴ درصد کاهش رشد بیشترین (شکل 5l) و تیمار پنجم با ۴۱/۸۶ درصد کاهش رشد کمترین تاثیر را در کاهش رشد بیمارگر داشتند (شکل 5f). لازم به ذکر است که قطر پرگنه بیمارگر به عنوان شاهد حدود ۸/۶ سانتی متر بود (شکل 4a). نتایج حاکی از آن است که در مجموع، در تیمارهای مرکب (قارچهای اندوفیت و گونه‌های تریکودرما) نسبت به دیگر تیمارها بیشترین اثر بازدارندگی بر روی رشد بیمارگر مشاهده شد (جدول ۴ و اشکال 5 h،i ،j،k،l).

جدول ۳- تجزیه واریانس داده های مربوط به تاثیر قارچ های آنتاگونیست بر روی رشد قارچ بیمارگر در محیط کشت اختصاصی

منابع تغییرات	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F شاخص
آنتاگونیست	۱۰	۱۰۵۹۲/۵۷۸	۱۰۵۹/۲۵۸	۶۴/۲۵۴**
خطای آزمایش	۲۱	۳۴۶/۱۹۳	۱۶/۴۸۵	-
کل	۳۱	۱۰۹۳۸/۷۷۱	-	-
ضریب تغییرات (cv)	٪۵/۰۶	-	-	-

** اختلاف در سطح ۱٪ معنی دار است.



شکل ۵- تاثیر قارچ های اندوفیت *Piriformospora indica* و *Sebacina vermifera* و گونه های تریکودرما *Trichoderma viride* و *T. harzianum* (T-100) در کاهش رشد *Macrophomina phaseolina* در آزمون کشت متقابل.

a: Pa (بیمارگر)، b: TV، c: T100 و d: TV و T100، e: Pi، f: S، g: Pi و S، h: S و T100، i: Pi و T100، j: Pi و TV، k: S و TV و l: Pi، S، TV و T100. حروف اختصاری: Pi: *Piriformospora indica*، S: *Sebacina vermifera*، TV: *Trichoderma viride*، T100: *Trichoderma harzianum*، Pa: Pathogen

جدول ۴- مقایسه میانگین مربوط به تاثیر قارچ های آنتاگونیست بر روی قارچ بیمارگر

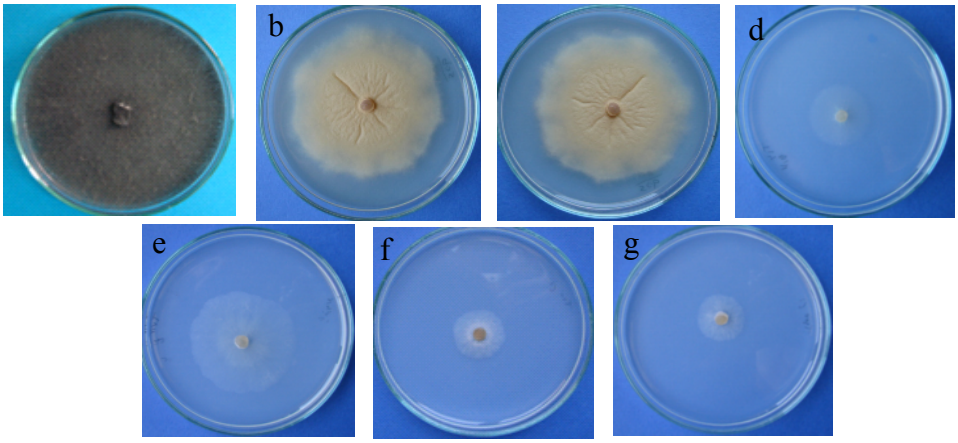
شماره تیمار	تیمار گونه های آنتاگویست	درصد کاهش رشد
۰	Pa	۰ h
۱	Pa+ TV	۸۱/۴۰d
۲	Pa+ T100	۶۲/۷۹ e
۳	Pa +TV+T100	۹۵/۳۵ a
۴	Pa+Pi	۵۳/۴۸ f
۵	Pa+ S	۴۱/۸۶ g
۶	Pa+Pi+S	۸۶/۰۵ cd
۷	Pa+Pi+ TV	۹۰/۷۰ abc
۸	Pa+Pi+ T100	۸۸/۳۷ bc
۹	Pa+ S+TV	۹۳/۰۲ ab
۱۰	Pa +S +T100	۹۳/۰۲ ab
۱۱	Pa+Pi+S+TV+T100	۹۶/۷۴ a

Pi: *Piriformospora indica*، S: *Sebacina vermifera*، TV: *Trichoderma viride*، T100: *Trichodermaharzianum*، Pa: Pathogen

بررسی قدرت کلنیزاسیون قارچ های اندوفیت بر رشد قارچ بیمارگر

در بررسی قدرت بازدارندگی گونه های اندوفیت ریشه بر رشد بیمارگر، پس از کشت پرگنه بیمارگر بر روی کشت هفت روزه قارچ‌های اندوفیت، هیچ گونه رشدی در پرگنه بیمارگر مشاهده نشد (اشکال c و ۶b). حال آن که میزان رشد بیمارگر (شاهد)، ۸/۵ سانتی متر بود (شکل ۶a). در تیماری که در آن *P.indica* بر روی کشت یک روزه بیمارگر قرار داده شد، بیمارگر رشدی معادل دو سانتی متر داشت و لذا میزان کنترل رشد بیمارگر و یا به عبارتی قدرت کلنیزاسیون توسط اندوفیت در حدود ۷۵ درصد برآورد گردید (شکل ۶d). در همین تیمار که به جای *P. indica*، گونه *S. vermifera* بر روی کشت یک روزه بیمارگر قرار داده شد، میزان رشد بیمارگر حدود سه سانتی متر و قدرت بازدارندگی اندوفیت از رشد بیمارگر معادل ۶۲/۵۰ درصد

تخمین زده شد (شکل ۶e). در تیمار آخر که در آن قطعه ای از پرگنه اندوفیت و بیمارگر بـه طـور همزمـان، و بـه نحـوی کـه اندوفیت درست روی بیمارگر قرار گیرد، کشت شده بودند، پرگنه بیمارگر رشد چندانی از خود نشان نداد و در این تیمار قـدرت بازدارندگی در هر کدام از قارچ های اندوفیت ۸۸ درصد برآورد شد (اشکال g و ۶f).

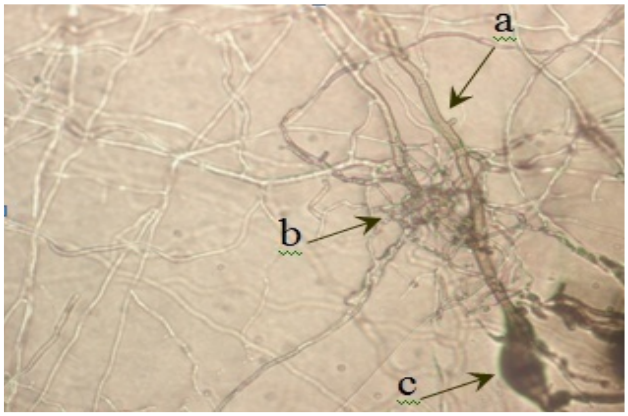


شکل ۶- تاثیر قارچ های اندوفیت *Piriformospora indica* و *Sebacina vermifera* در کاهش رشد *Macrophomina phaseolina* در آزمون بررسی قدرت کلنیزاسیون قارچ های اندوفیت بر روی بیمارگر

a: Pa (شاهد)، b: کشت پرگنه بیمارگر بر روی کشت هفت روزه Pi، c: کشت پرگنه بیمارگر بر روی کشت هفت روزه S، d: کشت Pi روی کشت یک روزه بیمارگر، e: کشت S روی کشت یک روزه بیمارگر، f: کشت همزمان پرگنه Pi و بیمارگر به صورت منطبق با یکدیگر و g: کشت همزمان پرگنه S و بیمارگر به صورت منطبق با یکدیگر. حروف اختصاری: Pi: *Piriformospora indica*، S: *Sebacina vermifera*، TV: *Trichoderma viride*، T100: *Trichoderma harzianum*، Pa: Pathogen

بررسی سازوکارهای دخیل در کنترل بیمارگر توسط قارچ های اندوفیت

با توجه به رشد و حرکت سریع قارچ های اندوفیت به سمت هیف ها و میکرواسـکلروت هـای بیمـارگر، بـه تـدریج کـل سـطح میسلیوم و میکرواسکلروت های بیمارگر توسط هیف های اندوفیت پوشیده شده و میسلیوم قارچ های اندوفیت اقدام به پـیچش به دور میسلیوم های بیمارگر نمود و سپس میکرواسکلروت های بیمارگر را کاملا منهدم ساخت. پدیـده پـیچش و کلنیزاسـیون سطح میسلیوم بیمارگر توسط میکروسکپ نوری مشاهده گردید. به دنبال پیچش به دور هیف هـای بیمـارگر توسـط میسـلیوم قارچ‌های انـدوفیت و پـس از کلنیزاسـیون کامـل، انـدوفیت اقـدام بـه تولیـد کلامیدوسـپور در سـطح وسـیع بـر روی هیـف و میکرواسکلروت های بیمارگر نمود (شکل ۷).



شکل ۷- پدیده پارازیتیسم هیف ها و میکرواسکلروت های بیمارگر توسط میسلیوم قارچ اندوفیت

a: هیف بیمارگر b: پدیده پارازیتیسم هیف بیمارگر توسط اندوفیت c: میکرواسکلرت بیمارگر

بررسی تاثیر متابولیت های فرار قارچ های اندوفیت بر رشد قارچ بیمارگر

در این آزمون میزان رشد پرگنه بیمارگر در تیمارهای محتوی قارچ های اندوفیت با میزان رشد پرگنه قارچ در تیمار شاهد تقریبا یکسان بود و بنابراین می توان نتیجه گرفت که قارچ های اندوفیت فاقد ترکیبات فرار گازی بوده و در نتیجه از این بابت هیچ تاثیری بر روی رشد بیمارگر نداشتند.

بحث

در این تحقیق دما و pH بهینه برای رشد مناسب قارچ های اندوفیت دمای ۲۵ ±۲ °C و pH= ۶/۵ تعیین گردید که با بسیاری از مطالعات مشابه (Varma *et al*., 1998; Hill and Kaefer, 2001; Singh *et al*., 2003; Malla *et al*., 2004; Oelmuller *et al*., 2004; Pham *et al*., 2004b; Waller *et al*., 2005) مطابقت دارد. هم چنین دمای مناسب برای رشد بهینه بیمارگر دمای ۲۵ ±۲ درجه سانتیگراد تشخیص داده شد که با نتیجه آزمایشات *دینگرا و سینکلر* (Dhingra and Sinclair, 1973) مشابه است.

لازم به ذکر است که این بخش از تحقیق (تعیین دما و pH مطلوب برای رشد مناسب قارچ های اندوفیت)، با وجود اینکه قبلا توسط محققان دیگر مطالعه شده است ولی به دلیل وجود نوسانات در تنظیم شرایط آزمایشگاهی و یا به دلیل ایجاد تغییرات احتمالی در شرایط زیستی قارچهای اندوفیت، تکرار این آزمایش‌ها الزامی به نظر می‌رسید. در آزمون کشت متقابل، تمامی قارچهای اندوفیت و گونه های تریکودرما سبب کاهش رشد میسلیوم بیمارگر شدند. مخصوصا تیمارهای مرکب شامل ترکیبی از قارچ های اندوفیت و تریکودرما در مقایسه با تیمارهایی که در آنها از این عوامل به تنهایی استفاده شده بود، بیشترین تاثیر را از نظر بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر دارا بودند. نتایج حاصل از این آزمون با مطالعات سایر محققین (Datnoff *et al.,* 1995; Nemec *et al.,* 1996; Woo, 2002) که در آن اثرات همسوی ترکیبی از قارچ های میکوریز و گونه *T. harzianum* (T- 22) در کنترل *Alternaria solani* عامل بیماری برگی در گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفته بود، کاملا مطابقت داشت.

نتایج حاصل از آزمایش های درون شیشه ای نشان داد که قارچ های اندوفیت (*P. indica* و *S. vermifera*) از توان کنترل بیولوژیکی بالایی بر روی قارچ *Macrophomina phaseolina* برخوردار بودند و این نتیجه گیری با نتایج حاصل از تحقیقات *فام و همکاران* و *وارما و همکاران* (Varma *et al.,* 2000; Pham *et al.,* 2004a) مشابهت داشت. در تحقیقات مذکور، قارچ اندوفیت *P. indica* در شرایط آزمایشگاهی توانست رشد برخی از بیمارگرهای خاک برد نظیر *Macrophomina phaseolina*، *Rhizoctorina* sp. و *Fusarium* sp. را کاهش دهد. نتایج نشان می دهد که قارچ *P. indica* می تواند به عنوان یک عامل بالقوه برای کنترل بیولوژیک بیماری های ریشه فعالیت نماید. نتایج حاصل از آزمون متابولیت های فرارحاکی از آن بود که قارچ های اندوفیت قادر به تولید متابولیت های فرار نیستند و لذا احتمال می رود که این قارچ ها از مکانیسم های دیگری نظیر رقابت یا پارازیتیسم بهره می گیرند. در حالیکه طبق مطالعات مختلف موجود، مشخص شده است که گونه‌های تریکودرما با تولید متابولیت های فرار، رشد بیمارگرها را مختل می نمایند (Dubey and Pated, 2001).

بررسی قدرت کلنیزاسیون قارچهای اندوفیت ریشه در بازدارندگی از رشد میسلیومی بیمارگر، نشان داد که این قارچها با قدرت بیشتری میسلیوم‌های بیمارگر را کلنیزه می‌کنند. طبق تحقیقات انجام شده توسط محققین، قارچ های میکوریز آربوسکولار با ایجاد تغییراتی در رشد ریشه و فعالیت های فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی بافت گیاه، رقابت در اشغال مناطق ویژه کلنیزاسیون و کسب مواد غذایی و خارج کردن آن از دسترس بیمارگرها، ایجاد تغییرات در جمعیت میکروبی ریزوسفر و القای مکانیسم‌های دفاعی رابطه همزیستی مناسبی با ریشه گیاهان ایجاد نموده و آنها را در برابر بیمارگرها و یا بیماری‌های گوناگون محافظت می‌کنند و لذا سبب تقویت گیاه نیز می‌شوند (Dehne *et al*., 1978; Azcon-Aguilar and Barea, 1996; Cordier *et al*., 1998). در تمامی مطالعات آزمایشگاهی مورد نظر، نتایج حاکی از آن بود که گونه های تریکودرما از توان آنتاگونیستی بالایی در جهت مهار رشد میسلیوم و تشکیل میکرواسکلروت‌های *M. phaseolina* برخوردار بودند. این نتایج با مطالعات محققان دیگر مطابقت داشت. برای مثال *علی و همکاران* (Aly *et al*., 2001) در بررسی توان آنتاگونیستی گونه‌های

Trichoderma، *Penicillium* و *Aspergillus* علیه *Macrophomina phaseolina* تحت شرایط آزمایشگاهی به نتایج مشابهی دست پیدا کردند. در مطالعه دیگر، گونه های *T. koningii* و *T. harzianum* به طور قابل توجهی در آزمایش‌های درون شیشه‌ای، سبب کنترل موثر *M. phaseolina* شدند (Adekunle *et al*., 2006). همچنین در تحقیق *کارتیکیان و همکاران*، بر روی اثرات آنتاگونیستی دو گونه *Trichoderma viride* و*T. harzianum* در بازدارندگی از رشد میسلیومی *M. phaseolina*، مشخص شد که هر دو گونه به ویژه گونه *T.viride* در کاهش رشد میسلیوم و انهدام میکرواسکلروت قارچ نقش بسزایی دارند (Karthikeyan *et al*., 2006). به دنبال اثبات تاثیرات آنتاگونیستی قارچ تریکودرما بر روی بیمارگرهای گیاهی مطالعات بسیار وسیع و گسترده‌ای در زمینه بررسی مکانیسم‌های دخیل در کنترل بیولوژیک انجام گرفته است. همچنین کارآیی و نحوه عمل و تاثیر گونه *T. viride* بر روی برخی از قارچ های بیماریزا به وفور مورد مطالعه قرار گرفته است (Domsch *et al*., 1980; Papavizas, 1985).

در ایران نیز اخیرا از جدایه های تریکودرما نظیر *T. harzianum* (T39)، *T. virens*، *T. viride*، *T. harzianum* (M) و محصول تجاری تریکودرمین (*T. harzianum* Bi) برای کنترل بیولوژیکی بیماری ساق سیاه خربزه با عامل قارچی *Macrophomina phaseolina* استفاده شده است. در این تحقیق، مواد مترشحه از گونه های تریکودرما به طور کامل از رشد بیمارگر در آزمایشگاه جلوگیری نمود به طوریکه قارچ *T. viride* رشد بیمارگر را به میزان ۳۴/۹ تا ۷۱ درصد کاهش داد (Etebarian, 2006). در مطالعه دیگری قابلیت آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت ریشه (*Piriformospora indica* و *Sebacina vermifera*) و گونه‌های تریکودرما (*T. viride* و (T-100) *T. harzianum*) علیه برخی بیمارگرهای خاکزاد نظیر دو جدایه از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum*، دو جدایه از قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *lentis* و دو گونه از قارچ *Rizoctonia* شامل *R. solani* و *R. zeae* مورد بررسی قرار گرفت.

در این تحقیق از روش کشت متقابل، متابولیت های فرار و کلنیزاسیون استفاده شد. در کشت متقابل، گونه *Trichoderma harzianum* (T-100) بیشترین اثر بازدارندگی را روی رشد دو جدایه *Sclerotinia sclerotiorum* از خود نشان داد. مطالعه متابولیت های فرار نشان داد که *R. solani* حساس ترین گونه نسبت به متابولیت های فرار تولید شده توسط *Trichoderma harzianum* (T-100) می‌باشد. همچنین مطالعه کلنیزاسیون نیز ثابت نمود که قارچ های آنتاگونیست قادرند میسلیوم بیمارگرهای خاکزاد مورد آزمایش را مورد حمله قرار داده و تجزیه نمایند (Dolatabadi *et al*., 2011). با استناد به نتایج حاصل از این تحقیق و دیگر مطالعات انجام گرفته در رابطه با نقش عوامل کنترل بیولوژیک می توان دریافت که این عوامل قادرند به طور موفقیت آمیزی رشد بیمارگر را مهار نموده و لذا می توان از آن‌ها در آزمایشات گلخانه ای و مزرعه ای به منظور کنترل پوسیدگی ذغالی سویا استفاده نمود.

References:

1. Adekunle, A.T., Ikotun, T., Florini, D.A., Cardwell, K.F. (2006). Field evaluation of selected formulations of *Trichoderma* species as seed treatment to control damping-off of cowpea caused by *Macrophomina phaseolina*. African Journal of Biotechnology 5: 419–424.
2. Aly, A.A., El-Shazly, A.M.M., Youssef, R.M., Omar, M.R. (2001). Chemical and biological control of charcoal rot of cotton caused by *Macrophomina phaseolina*. Journal of Agricultural Science Mansoura University 26: 7661–7674.
3. Azcon-Aguilar, C. and Barea, J.M. (1996). Arbuscular mycorrhizas and biological control of soilborne plan pathogens an overview of the mechanisms involved. Mycorrhiza 6: 457-464.
4. Cordier, C., Pozo, M. J., Gianinazzi, S. and Gianinazzi-Pearson, V. (1998). Cell defence responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by arbuscular mycorrhizal fungus. Mol. Plant Microbe Interc. 11: 1017-1028.
5. Crous, P. W., Slipper, B., Wingfield. M. J., Rheeder, J., Marasas, W. F. O., Philips, A. J. L., Alves, A., Burgress, T., Barber, P. and Groenewald, J. Z. (2006). Phylogenic lineage in the Botryosphaeriaceae. Studies in Mycology 55: 235-253.
6. Datnoff, L. E., Nemec, S. and Pernezny, K. (1995). Biological control of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida using *Trichoderma harzianum* and *Glomus intraradices*. Biol. Control 5: 427–431.
7. Dehne, H. W., Schonbeck, F. and Baltruschat, H. (1978). Untersuchungen zum einfluss der endotrophen Mycorrhiza auf Pflanzenkrankheiten: 3 Chitinase-aktivitat und ornithinzyklus (The influence of endotrophic mycorrhiza on plant disease: 3 chitinase-activity and ornithinecycle). J. Plant Dis. Protec. 85: 666-678.
8. De Meyer, G., Bigirimana, J., Elad, Y. and Hofte, M. (1998). Induced systemic resistance in *Trichodermq harzianum* (T-39) biocontrol of *Botrytis cinerea*. Eur. J. Plant pathol. 104: 279-286.
9. Dennis, C., Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III. Hyphal Interaction. Trans. British Mycological Society 57: 363-369.
10. Dhingra, O. D. and Sinclair, J. B. (1973). Location of *Macrophomina phaseoli* on soybean plants related to culture characteristics and virulence. Phytopathol. 63: 934-936.
11. Dolatabadi, K.H., Goltapeh, E.M., Varma, A., and Rohani, N. (2011). In vitro evaluation of arbuscular mycorrhizal-like fungi and *Trichoderma* species against soilborne pathogens. J. Agriculture Technology. 7(1): 73-74.
12. Domsch K H, Gams W and Anderson T H. 1980. Compendium of Soil fungi. Vol.1. New York: Academic Press.
13. Dubey, S. C. and Patel, B. (2001). Evaluation of fungal antagonist against *Thanatephorus cucumeris* causing web blight urd and mung bean. Indian Phytopath. 54: 206-209.
14. Elad, Y. (1996). Mechanisms involved in the biological control of *Botrytis cinerea* incited diseases. Eur. J. Plant Pathol. 102: 719–732.
15. Etebarian, H. R. (2006). Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of charcoal stem rot in melon caused by *Macrophomina phaseolina*. J. Agric. Sci. Technol. 8: 243-250.
16. Fernandez, R. B., De-Santiago, A., Hernandez-Delgado, S. and Mayek-Perez, N. (2006). Characterization of Mexican and isolates of *Macrophomina phasolina* based

on morphological characteristics, pathogenicity on bean seeds endoglocans genes. Plant Pathology. 88: 53-60.
17. Goidanich G. 1947. A revision of the genus *Macrophomina phaseolina* petrak type species: *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Macrophomina phaseolina* (Maubl.) Ashby. Annals of Sper. Agriculture 1: 449-461.
18. Goyal, S. P., Jandaik, C. L. and Sharma, V. P. (1994). Effect of weed fungi metabolites on the mycelia growth of *Agaricus bisporus* (Lang.) Imbach. Mushroom Research. 3: 69-74.
19. Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* (T-22). Plant Dis. 84: 377–393.
20. Hill, T. W. and Kaefer, E. (2001). Improved protocols for *Aspergillus* medium: trace elements and minimum medium salt stock solutions. Fungal Genet News Letter. 48: 20-21.
21. Howell, C. R. (2002). Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Pythium* spp. and its biological control with *Trichoderma* spp. Phytopathol. 92: 177–180.
22. Kaefer, E. (1977). Meiotic and mitotic recombination in *Aspergillus* and its chromosomal aberrations. Advances Genetic. 19: 33-131.
23. Karthikeyan, V., Sankaralingam, A., Nakkeeran, S. (2006). Management of groundnut root rot with biocontrol agents and organic amendments. Arch. Phytopatol. Plant Prot. 39: 215–223.
24. Kucuk, C., Kivanc, M. (2003). Isolation of *Trichoderma* spp. and their antifungal, biochemical and physiological features. Turk J. Bio., 127: 247-253.
25. Malla, R., Prasad, R., Kumari, R., Giang, P. H., Pokharel, U., Oelmuller, R., and Varma, A. (2004). Phosphorus solubilizing symbiotic fungus: *Piriformospora indica*. Endocytob. Cell Res. 15: 579-600.
26. Mihail, J. D. 1992. Macrophomina pp. 134-136, *In* LL Singleton, JD Mihail and CM Rush (eds). Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. ST. Paul, MN: American Phytopathological Society.
27. Miller, J. H., Giddens, J. E. and Foster, A. A. (1975). A survey of the fungi of forest and cultivated soils of Georgia. Mycologia. 49: 779-808.
28. Morton, D. T., and Stroube, N. H., (1955). Antagonistic and stimulatory effects of microorganism upon *Sclerotium rolfsii*. Phtopathology, 45: 419-420.
29. Ndiago M. 2007. Ecology and management of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on cowpea in the Sahel. [PhD]. [the Netherland]: Wagening en University.
30. Nemec, S., Datnoff, L. E. and Strandberg, J. (1996). Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. Crop Protect. 15: 735-742.
31. Oelmuller, R., Shahollari, B., Peskan-Berghofer, T., Trebicka, A., Giong, P. H., Sherameti, I., Oudhoff, M., Venus, Y., Altschmied, L. and Varma, A. (2004). Molecular analyses of the interaction between *Arabidopsis* roots and the grwoth – promoting fungus *Piriformospora indica*. Endocytob. Cell Res. 15(2): 504-517.
32. Papavizas, G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium*: biology and potential for biological control. Ann. Rev. Phytopathol. 23: 23-54.
33. Peskan-Berghofer, T., Shahollari, B., Giang, PH., Hehl, S., Markert, C., Blanke, V., Kost, G., Varma, A., Oelmuller, R., (2004). Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe

interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmatic reticulum and at the plasma membrane. Physiol. Plant. 122: 465-477.
34. Pham, G. H., Kumari, R., Singh, A. N., Malla, R., Prasad, R., Sachdev, M., Kaldorf, M., Buscot, F., Oelmuller, R., Hampp, R., Saxena, A. K., Rexer, K-H., Kost, G., and Varma, A. (2004). Axenic cultures of *Piriformospora indica*. Plant Surface Microbiology. Springer-Verlag. 593-613 pp.
35. Samuels, G. J. (1996). *Trichoderma*: a review of biology and systematics of the genus. Mycol. Res. 100: 923-935.
36. Short, G. E., and Wyllie, T. D. (1978). Inoculum potential of *Macrophomina phaseolina*. Phytopathology. 68: 742-746.
37. Singh A N, Singh A R, Kumari M, Kumar S, Rai M K, Sharma A P and Varma A. 2003. AMF-like-fungus: *Piriformospora indica* – a boon for plant industry. pp. 101-124, *In* BN Prasad (ed). Biotechnology in Sustainable Biodiversity and Food Security. India: Oxford & IBH Publishing Co.
38. Sivasithamparam, K. and Ghisalberti, E. L. (1998). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. 1: 139-191.
39. Varma A, Rai M K, Sudha Sahay N. 2000. Microbial-biotechnology: New paradigms and role in sustainable agriculture. pp. 22-37, *In* RC Rajak (ed). Microbial Biotechnology for Sustainable Development and Productivity. India: Scientific Publishers.
40. Varma A, Singh A, Sudha Sahay N S, Sharma J, Roy A, Kumari M, Rana D, Thakran S, Deka D, Bharti K, Hurek T, Blechert O, Rexer K-H, Kost G, Hahn A, Maier W, Walter M, Strack D and Kranner I. 2001. *Piriformospora indica*: an axenically culturable mycorrhiza-like endosymbiotic fungus. pp. 125-150, *In* B Hock (ed). The Mycota IX. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
41. Waller, F., Achatz, B., Baltruschat, H., Fodor, J., Becker, K., Fischer, M., Heier, T., Huckelhoven, R., Neumann, C., Wettstein, D., Franken, P. and Kogel, K-H. (2005). The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barely to salt-tolerance, disease resistance, and higher yield. PANS. 102(38): 13386-13391.
42. Warcup, J. H. (1988). The mycorrhizal relationsphips of Australian orchids. New Phytol. 87: 371-381.
43. Weiss, M., Selosse, M. A., Rexer, K. H., Urban, A. and Oberwinkler, F. (2004). Sebacinales: a hitherto overlooked cosm of heterobasidiomycetes with abroad mycorrhizal potential. Mycological Res. 108: 1003-1010.
44. Woo S L. 2002. Mycoparasitic *Trichoderma* strains are activated by host-derived molecules. Paper presented at: 6th European Conference on Fungal Genetics; 6–9 April; Pisa, Italy.
45. Zimand, G., Elad, Y. and Chet, I. (1996). Effect of *Trichoderma harzianum* on *Botrytis cinerea* pathogenicity. Phytopathol. 86: 1255–1260.