

A Study of the Antifungal Effects of *Trichoderma* Strains on Four Root and Crown Pathogens of Cowpea

Sadigheh Khodadi-pourarpanaei

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, azin.khodadadipoor@gmail.com

Mehdi Mehrabi-Koushki*

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran; Biotechnology and Bioscience Research Center, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, mhdmhbrb@scu.ac.ir

Reza Farokhinejad

Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, farokhi_reza@yahoo.com

Abstract

Introduction: This research was conducted with the aim of isolating and identifying cowpea root and crown pathogens in Khuzestan province. In addition, the antifungal effectiveness of nine selected strains of five *Trichoderma* species was surveyed on four root and crown pathogens of cowpea.

Materials and Methods: Out of twenty strains obtained, four of them were selected for further investigation including pathogenicity test and siderophore assay. The relative amount of the siderophore produced by nine selected strains from five *Trichoderma* species and pathogens was assayed by the chrome Azurol S method (CAS). The radial growth of the pathogen's colonies in front of the *Trichoderma* strains was analyzed using a completely randomized design, with three replicates. The pathogenic strains of ITS region were amplified and sequenced. The obtained sequences were compared with the reference strains using BLASTn search and the maximum likelihood (ML) phylogenetic analysis.

Results: In the present study, the following pathogens were identified: *Rhizoctonia solani*, *Fusarium chlamydosporum*, *F. falciforme*, and *Macrophomina phaseolina*. In CAS assay, all of the *Trichoderma* strains and pathogens produced the siderophore into growth media under iron starvation. Strains of *T. koningiopsis* SCUA-Arak-96 and *T. pleuroticola* SCUA-Isf-15 produced the minimum and maximum siderophore with 31% and 85%, respectively. In the dual culture test, most *Trichoderma* strains significantly reduced the growth of pathogenic fungi. The most antifungal effect was observed in *T. virens* SCUA-Ham-65 strain on *F. chlamydosporum* and *F. falciforme* pathogens, with 30% and 29% growth inhibitory, respectively.

Discussion and conclusion: The results of the present study showed that *R. solani*, *F. chlamydosporum*, *F. falciforme*, and *M. phaseolina* were the most important pathogens of the cowpea causing root and crown rot in Khuzestan province. *Trichoderma* strains produced the siderophore which chelates minimal iron of environment. In addition, they inhibit the growth of the plant pathogens *in vitro*.

Key words: Cowpea, Root and Crown Rot, Siderophore, *Trichoderma*

* Corresponding author

Received: January 10, 2021 / **Accepted:** September 12, 2015

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها (نوع مقاله پژوهشی)

سال دهم، شماره ۳۹، پاییز ۱۴۰۰، صفحه ۶۳ - ۵۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۰ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۱

Doi: [10.22108/BJM.2021.125835.1349](https://doi.org/10.22108/BJM.2021.125835.1349)

بررسی اثرات ضدقارچی چند سویه *Trichoderma* علیه چهار بیمارگر ریشه و طوقه لوبیا چشم‌بلبلی

صدیقه خدادادی پورارپایی: دانشجوی کارشناسی ارشد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، azin.khodadadipoor@gmail.com

مهدی مهربانی کوشکی*: دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران؛ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی و علوم زیستی، دانشگاه شهید چمران

اهواز، اهواز، ایران، mhdmhbrb@scu.ac.ir

رضا فرخی‌نژاد: استاد گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، farokhi_reza@yahoo.com

چکیده

مقدمه: این تحقیق برای جداسازی و شناسایی بیمارگرهای طوقه و ریشه لوبیا چشم‌بلبلی در استان خوزستان انجام شد. علاوه بر این، اثرات ضدقارچی نه سویه انتخاب‌شده از پنج گونه *Trichoderma* روی چهار بیمارگر طوقه و ریشه لوبیا چشم‌بلبلی بررسی شدند.

مواد و روش‌ها: از بیست سویه به‌دست‌آمده، چهار سویه برای مطالعه بیشتر، شامل آزمون بیماری‌زایی و سنجش سیدروفور انتخاب شدند. میزان نسبی تولید سیدروفور توسط نه سویه انتخاب‌شده از پنج گونه *Trichoderma* و بیمارگرها با استفاده از روش CAS سنجش شد. رشد شعاعی پرگنه‌های بیمارگر در مقابل سویه‌های *Trichoderma* در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد. ناحیه ITS سویه‌های بیمارگر تکثیر و توالی‌یابی شدند. توالی‌های به‌دست‌آمده با سویه‌های شناخته‌شده با استفاده از جستجوی بلاست و تجزیه و تحلیل تبارزایی با الگوریتم درست‌نمایی بیشینه (ML) مقایسه شدند.

نتایج: بیمارگرهای ذیل شناسایی شدند: *Rhizoctonia solani*، *Fusarium chlamydosporum*، *F. falciforme* و *Macrophomina phaseolina*. تمام سویه‌های *Trichoderma* و بیمارگرها در محیط کشت با فقر آهن، سیدروفور تولید کردند. سویه‌های T. koningiopsis SCUA-Arak-96 و T. pleuroticola SCUA-Isf-15 به‌ترتیب حداقل (۳۱ درصد) و حداکثر (۸۵ درصد) تولید سیدروفور را داشتند. در آزمون کشت دو گانه، بیشتر سویه‌های *Trichoderma* رشد قارچ‌های بیمارگر را در سطح معنی‌داری کاهش دادند. بیشترین اثر ضدقارچی برای سویه T. virens SCUA-Ham-65 با ۳۰ و ۲۹ درصد بازدارندگی روی بیمارگرهای *F. chlamydosporum* و *F. falciforme* مشاهده شد.

بحث و نتیجه‌گیری: *R. solani*، *F. chlamydosporum*، *F. falciforme* و *M. phaseolina* مهم‌ترین بیمارگرهای ایجادکننده پوسیدگی طوقه و ریشه لوبیا چشم‌بلبلی در استان خوزستان‌اند. سویه‌های *Trichoderma* سیدروفور تولید کردند که باعث کلاته‌شدن آهن حداقلی محیط می‌شود. علاوه بر این، آنها رشد بیمارگرهای گیاهی را در محیط آزمایش کاهش می‌دهند.

واژه‌های کلیدی: لوبیا چشم‌بلبلی، پوسیدگی طوقه و ریشه، سیدروفور، *Trichoderma*

* نویسنده مسئول مکاتبات

Copyright©2021, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

مقدمه

لوبیا از مهم‌ترین گونه‌های خانواده لگومینه و اصلی‌ترین محصول حبوبات در دنیاست و در ایران به‌طور متوسط حدود ۶۸۰ هزار هکتار از اراضی در هر سال زراعی به حبوبات اختصاص داده می‌شوند (۱). ازجمله بیماری‌های قارچی لوبیا چشم‌بلبلی، به پوسیدگی طوقه و ریشه ناشی از قارچ‌های *Rhizoctonia solani*، *Macrophomina phaseolina* و گونه‌های *Fusarium* می‌توان اشاره کرد (۲). بیمارگر *M. phaseolina* بیشتر به ریشه گیاه میزبان حمله می‌کند و موجب ایجاد لکه‌های بافت‌مرده و پوسیدگی زغالی روی آن می‌شود (۳). ایجاد بیماری پوسیدگی زغالی، به مرحله رشدی و شرایط محیطی بستگی دارد؛ در آب‌وهوای گرم و خشک دیده می‌شود و شوری خاک می‌تواند آن را افزایش دهد (۴). گیاهانی که مورد حمله گونه‌های *Fusarium* قرار می‌گیرند، علائم پژمردگی نظیر رنگ‌پریدگی برگ‌ها و کاسبرگ، زردشدن و افتادن برگ‌ها و تغییر رنگ آوند چوبی را نشان می‌دهند و درنهایت، بخش‌های هوایی از بین خواهند رفت (۵). پوسیدگی ریزوکتونیایی ریشه لوبیا از مهم‌ترین بیماری‌های ریشه و هیوکتیل لوبیا است (۶). میزان خسارت واردشده توسط این قارچ بین مزارع یک منطقه و نیز در محصول لوبیا در سال‌های متفاوت متغیر است و دلیل آن تأثیر شرایط آب‌وهوایی و خاک از زمان کشت تا برداشت است (۷).

با توجه به خطرات زیست‌محیطی کاربرد سموم شیمیایی، روش‌هایی مانند استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک برای کنترل بیماری‌های گیاهی اهمیت زیادی می‌یابند؛ ازجمله عوامل کنترل بیولوژیک برای مدیریت بیماری‌های پوسیدگی طوقه و ریشه لوبیا، گونه‌های *Trichoderma* هستند. گونه‌های *Trichoderma*، برخی

بیماری‌های خاک‌زاد را از طریق مکانیسم‌های مختلف همچون میکوپارازیتسم کنترل می‌کنند (۸). در بررسی واکنش‌های بین *T. harzianum* با *Rhizoctonia* و گونه‌های *Pythium*، رشد مستقیم میکوپارازیت به طرف میزبان و پیچ‌خوردگی ریشه‌ای اطراف ریشه‌ها مشاهده شده است (۹). سیدروفورها یک گروه ناهمگن شیمیایی از متابولیت‌های ثانویه‌اند که با محدود کردن عناصر غذایی مصرفی عوامل بیماری‌زا (همچون آهن)، علیه میکروارگانیسم‌های دیگر به کار گرفته می‌شوند (۱۰). اهمیت تولید سیدروفور به‌عنوان مکانیسم کنترل بیولوژیک، برای نخستین بار با استفاده از چندین سویه *Pseudomonas fluorescens* علیه بیمارگر باکتریایی *Erwinia carotovora* مشخص شد (۱۱). قارچ‌هایی مانند *Trichoderma* و باکتری‌های تولیدکننده سیدروفور، قدرت رقابت بیشتری برای جذب آهن دارند و سیدروفور بیشتری تولید می‌کنند؛ بنابراین می‌توانند در شرایط کمبود آهن، آن را از دسترس بیمارگرها خارج کنند و باعث سرکوب بیمارگر شوند (۱۲). حضور و نقش سیدروفورها در قارچ‌های بیمارگر در جوانه‌زنی میسلیوم و اسپور قارچ (۱۳)، ذخیره آهن در کنیدیوم و جوانه‌زنی آن (۱۲) و حمل و نقل آن در میتوکنندری قارچ‌ها به اثبات رسیده است (۱۴).

در این تحقیق، بیمارگرهای قارچی طوقه و ریشه لوبیا از مناطق مهم کشت لوبیا در استان خوزستان، جداسازی و براساس روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی شدند. سپس، اثر ضدقارچی چند سویه انتخابی *Trichoderma* روی آنها در محیط آزمایشگاه بررسی شد. همچنین ردیابی و سنجش میزان تولید سیدروفورها در سویه‌های انتخابی بیمارگر و سویه‌های *Trichoderma* انجام شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی بیمارگرها: در بازدید انجام‌شده در مهرماه سال ۱۳۹۵ از مزارع لوبیاکاری شهرستان‌های شوش و اندیمشک در استان خوزستان، ده گیاه لوبیا چشم‌بلبلی با علائم پوسیدگی طوقه و ریشه، جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شدند. برای جداسازی بیمارگرها، قطعاتی به اندازه ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیه بین بافت آلوده و سالم، تهیه و بعد از ضدعفونی سطحی با استفاده از هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت دو دقیقه و سه بار شستشو با آب مقطر استریل، روی محیط غذایی سیب-زمینی - دکستروز - آگار (PDA) قرار داده شدند (۱۵). پنج تا ده روز پس از نگهداری تشتک‌های پتری در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تاریکی مطلق، پرگنه‌های ظاهرشده قارچی روی محیط کشت به محیط تازه PDA منتقل شدند. این جدایه‌ها به روش تک‌اسپور کردن (*Fusarium*) و نوک‌ریسه (*Rhizoctonia* و *Macrophomina*) خالص‌سازی شدند.

اثبات بیماری‌زایی: برای انتخاب یک سویه با توانایی ایجاد بیماری از هر گونه شناسایی‌شده، اثبات بیماری‌زایی انجام شد. برای تهیه مایه سویه‌های قارچی، پس از سترون کردن مخلوط آرد ذرت، ماسه و دانه‌های ارزن، دیسک‌هایی از کشت درحال رشد به آنها، اضافه و به مدت ۱۵ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شدند (۱۶). پس از سترون کردن مخلوط خاک، ماسه و خاک برگ (با نسبت مساوی)، حدود نیمی از عمق گلدان‌ها با آن پر شد. گلدان‌ها در عمق بعدی با مخلوط خاک استفاده‌شده و مایه سویه‌های قارچی به میزان دو درصد وزنی پر شدند. سپس در یک سانتی‌متر عمق بعدی، مخلوط خاک سترون اضافه شد و

چهار بذر ضدعفونی سطحی شده روی آن قرار گرفتند. یک سانتی‌متر بعدی روی بذور با خاک مخلوط سترون پوشش داده شد و پس از آبیاری، گلدان‌ها در شرایط رطوبت نسبی ۵۰ درصد، دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد و تناوب نوری ۱۲ ساعته درون ژرمیناتور قرار گرفتند. ارزیابی ایجاد علائم بیماری و انتخاب سویه‌ها در ۳۰-۱۵ روز بعد انجام شد (۱۷-۱۸). پس از ظهور علائم، نمونه‌های بیمار شده دوباره در فرایند جداسازی قرار گرفتند و جدایه‌های به‌دست‌آمده از نظر ریخت‌شناسی با قارچ‌های مایه‌زنی شده مقایسه شدند.

شناسایی ریخت‌شناسی و مولکولی بیمارگرهای

انتخاب‌شده: ریخت‌شناسی این سویه‌ها با بررسی ساختارهای رویشی و تولیدمثلی و مقایسه آن با توصیف سویه‌های تایپ انجام شد. پس از رشد میسلیم‌های قارچی سویه‌های بیمارگر انتخاب‌شده در مرحله اثبات بیماری‌زایی در محیط مایع، جمع‌آوری توده میسلیومی با پمپ خلأ انجام شد و استخراج DNA آنها با روش ریدر و برودا (۱۹) با اندکی تغییر صورت گرفت (۲۰). واکنش زنجیره‌ای پلیمرز مربوط به سویه‌های انتخاب‌شده با جفت آغازگر عمومی NL4 و ITS1 برای تکثیر نواحی ITS و بخش‌هایی از اسیدریبونوکلیک ریوزومی ۲۸S انجام شد (۲۱). قطعات تکثیری نواحی ژنی مربوط به سویه‌های انتخابی با روش استخراج DNA از ژل با استفاده از کیت تجاری Vivantis GF-1 Gel DNA Recovery Kit (مالزی) و منطبق با دستورالعمل ارائه‌شده خالص‌سازی و توسط شرکت نرگس (اهواز) با استفاده از آغازگرهای پیشرو و معکوس توالی‌یابی شدند. توالی‌های پیشرو و معکوس با نرم‌افزار DNA HeracleBioSoft, Baser Sequence Assembler v.4 (com http://www.dnabaser BioEdit و مونتاژ و

بررسی و مقایسه توان تولید سیدروفور در سویه‌های *Trichoderma* و سویه‌های بیمارگر: محیط حداقلی فاقد آهن حاوی سولفات منیزیم، کلرید کلسیم، سولفات آمونیوم و محلول پایه فلزی (مخلوط سولفات منگنز، سولفات روی و سولفات کبالت) با اسیدیته ۶/۸ تهیه شد و سویه‌های *Trichoderma* (با نسبت ۱۰^۵ اسپور در هر میلی‌لیتر) و بیمارگر (چهار دیسک از حاشیه در حال رشد پرگنه) به آنها، مایه‌زنی و به مدت ۱۵ روز در شیکر انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. بعد از توقف رشد توده میسلیومی در محیط فوق، فاز مایع محیط با فیلتراسیون از کاغذ صافی و سانتریفوژ کردن در دور ۳۰۰۰ g و دمای ۴ درجه سانتی-گراد جداسازی و جمع‌آوری شدند. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره کشت فوق مربوط به هر سویه در لوله‌های آزمایش ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و به آن ۵۰۰ میکرولیتر از بافر S Chrome Azurol (CAS)، شامل S Chrome Azurol، محلول FeCl₃، هگزا دسیل تری متیل آمونیوم یا Hdtma و ۲N مورفولین اتان سولفونیک اسید یا Mes Buffer) و ۲۰ میکرولیتر محلول shuttle یا سولفوسالیسیلیک اسید، اضافه و پس از ۱۰ دقیقه تغییر رنگ مشاهده شد. در آخر، از هر نمونه ۰/۵ میلی‌لیتر در کووت‌های اسپکتروفتومتر ریخته شد و میزان جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر، اندازه‌گیری و طبق فرمول زیر میزان نسبی تولید سیدروفور توسط هر سویه محاسبه شد (۲۳-۲۴):

$$= \frac{O1 - O2}{O1} \times 100 = \text{میزان نسبی تولید سیدروفور}$$

O1: میزان جذب رفرنس، O2: میزان جذب نمونه

رفرنس شامل عصاره محیط مایه‌زنی نشده، محلول CAS و محلول shuttle بود.

ویراستاری شدند. توالی‌های ITS هر سویه با توالی‌های مربوط به سویه‌های شناخته‌شده در بانک ژن با استفاده از الگوریتم جستجوی BLASTn و تجزیه و تحلیل تبارزایی درست‌نمایی بیشینه با کمک نرم‌افزار MEGA 6 (۲۲) مقایسه شدند.

اثر سویه‌های *Trichoderma* در جلوگیری از رشد عامل بیماری در کشت متقابل: نه سویه *Trichoderma* (شامل *T. harzianum* Arak-، *T. capillare* Isf-7، *T. harzianum* Arak-6، *T. harzianum* Isf-B، 12، *T. pleuroticola* Isf-، *T. koningiopsis* Arak-96، *T. virens* Ham-65، *T. virens* Isf-77T، 15، *T. virens* Arak-14) از مجموعه قارچ‌های زنده گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز (SCUA: Collection of Fungal Cultures, Department of Plant Protection, Shahid Chamran University of Ahvaz, Iran) انتخاب شدند. یک دیسک نیم سانتی‌متری از حاشیه در حال رشد پرگنه دو روزه هر سویه *Trichoderma*، در یک طرف تشتک پتری و دیسک‌هایی مشابه به قطر نیم سانتی‌متر از حاشیه در حال رشد پرگنه قارچ‌های بیمارگر در مقابل آنها قرار داده و تا زمان نزدیک به پر کردن تشتک‌های پتری، میزان رشد شعاعی بیمارگرها، تولید رنگدانه، اسپورزایی و میکوپارازیسیسم (پیچیدگی ریشه‌ای اطراف ریشه بیمارگر) بررسی شد (۱۶). میزان رشد در قالب طرح کاملاً تصادفی تجزیه و تحلیل شد و گروه‌بندی آماری با استفاده از آزمون توکی انجام گرفت. درصد بازدارندگی با فرمول شناخته‌شده ذیل محاسبه شد:

$$= \frac{RGC - RGT}{RGC} \times 100 = \text{درصد بازدارندگی رشد}$$

RGC: میزان رشد شعاعی در شاهد، RGT: میزان

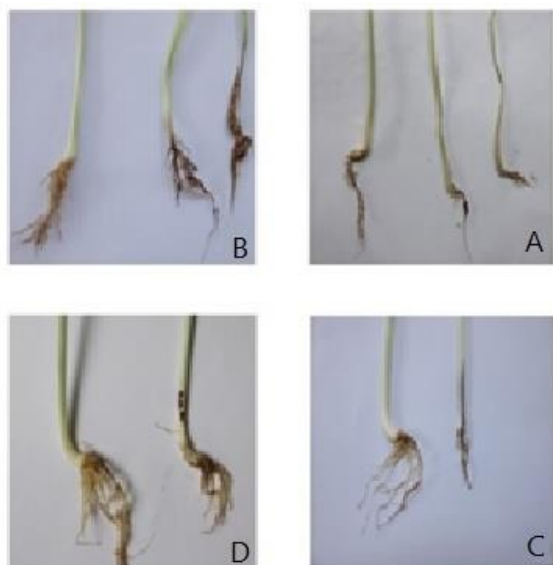
رشد شعاعی در تیمار

نتایج

بسیست سویه قارچی پس از ضدعفونی سطحی و کشت به دست آمدند. این سویه‌ها از نظر علائم، بیشتر روی ریشه و طوقه (پوسیدگی ریشه و طوقه) در آزمون بیماری‌زایی، ارزیابی و براساس آن، چهار سویه با ریخت‌شناسی متفاوت و ایجادکننده بیشترین علائم برای بررسی‌های بیشتر انتخاب شدند.

اثبات بیماری‌زایی: در هر سه تکرار مربوط به چهار بیمارگر، علائم بیماری مشاهده شد. دو سویه *Fusarium*، علائم زردی، پژمردگی و پوسیدگی خشک طوقه و ریشه ایجاد کردند (شکل ۱، A و B). در بیماری‌زایی سویه *M. phaseolina* SCUA-M-5P، علائم زردی و پژمردگی به همراه پوسیدگی زغالی طوقه مشاهده شدند (شکل ۱، C). سویه *R. Solani* SCUA-Rh علائم زردی شاخ و برگ به همراه شانکر طوقه و ریشه ایجاد کردند (شکل ۱، D). پس از ظهور علائم، نمونه‌های بیمار شده دوباره در فرایند جداسازی قرار گرفتند و پس از بررسی ریخت‌شناسی سویه‌های به‌دست‌آمده، هر چهار گونه دوباره بازیابی شدند.

شناسایی بیمارگرهای انتخابی: این چهار جدایه براساس صفات ریخت‌شناسی و تکثیر و تجزیه و تحلیل ناحیه ITS (شکل‌های ۲، ۳، ۴، ۵ و ۶)، گونه‌های *Rhizoctonia solani* (سویه SCUA-Rh)، شماره دسترسی در بانک ژن: MH715170، *Fusarium chlamydosporum* (سویه SCUA-5P2)، شماره دسترسی در بانک ژن: MH715168، *F. falciforme* (سویه SCUA-3p)، شماره دسترسی در بانک ژن: MH715167 و *Macrophomina phaseolina* (سویه SCUA-M-5P)، شماره دسترسی در بانک ژن: MH715169 بودند.



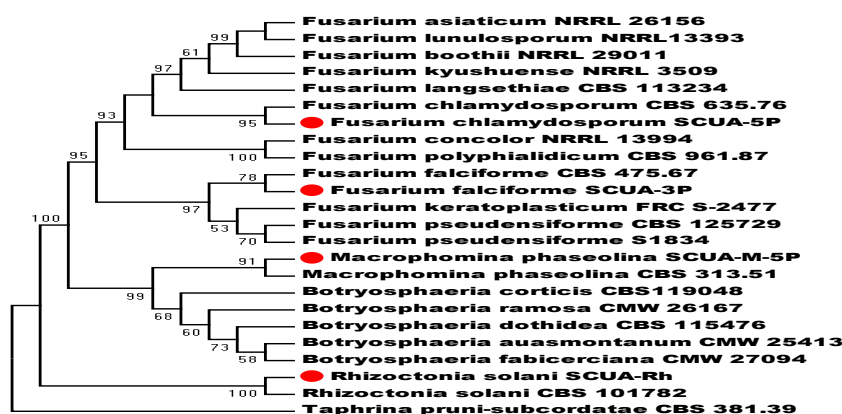
شکل ۱- آزمون بیماری‌زایی بیمارگرهای مطالعه‌شده. (A) پوسیدگی ریشه بعد از مایه‌زنی با سویه *F. chlamydosporum* SCUA-5p2، (B) پوسیدگی ریشه ایجادشده با سویه *F. falciforme* SCUA-3P، (C) پوسیدگی زغالی ناشی از سویه *M. phaseolina* SCUA-M-5P و (D) شانکر طوقه ناشی از *R. solani* SCUA-Rh

نتایج جستجوی BLASTn و تبارزایی: جستجوی

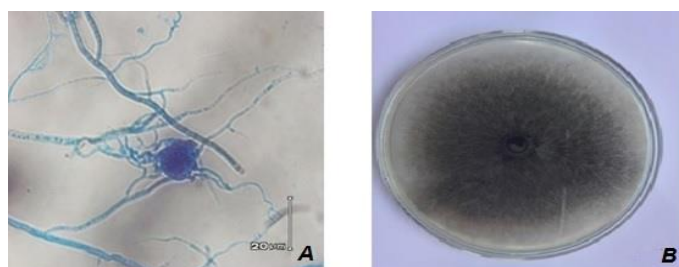
بلاست مبتنی بر توالی تکثیری ITS مشخص کرد سویه بیمارگر *F. chlamydosporum* SCUA-5p-2، ۹۹ درصد تشابه نوکلئوتیدی با سویه شناخته‌شده *F. chlamydosporum* CBS 635.76 دارد. در درخت تبارزایی درست‌نمایی بیشینه که براساس ناحیه ITS (شکل ۲) ساخته شده است، سویه *F. chlamydosporum* SCUA-5p-2 با سویه شناخته‌شده از همین گونه (CBS 635.76) خوشه‌بندی شد و یک کلاد با ارزش بوت‌استرپ ۹۵ درصد ایجاد کرد. سویه بیمارگر *F. falciforme* SCUA-3p با سویه شناخته‌شده *F. falciforme* CBS 475.67، ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی نشان داد. همچنین در درخت تبارزایی (شکل ۲)، این سویه با سویه‌های شناخته‌شده از این گونه

phaseolina EH2 ۹۹ و ۱۰۰ درصد شباهت نوکلئوتیدی نشان دادند. در درخت تبارزایی (شکل ۲)، سویه‌های *R. solani* SCUA-M-5P و *solani* SCUA-Rh با سویه‌های شناخته‌شده از گونه خود خوشه‌بندی شدند و به ترتیب کلادهایی به ارزش بوت‌استرپ ۱۰۰ و ۹۱ درصد ایجاد کردند.

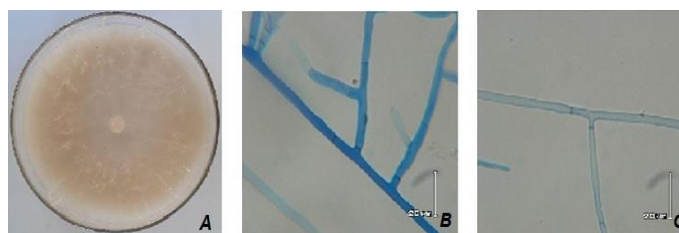
(CBS 635.76) و گونه‌های خویشاوند *F. pseudensiforme* و *keratoplasticum* شدند و یک کلاذ با ارزش بوت‌استرپ ۹۷ درصد ایجاد کردند. علاوه بر این، دو سویه *R. solani* SCUA-Rh و *M. phaseolina* SCUA-M-5P به ترتیب با سویه‌های شناخته‌شده *R. solani* CBS 101782 و *M.*



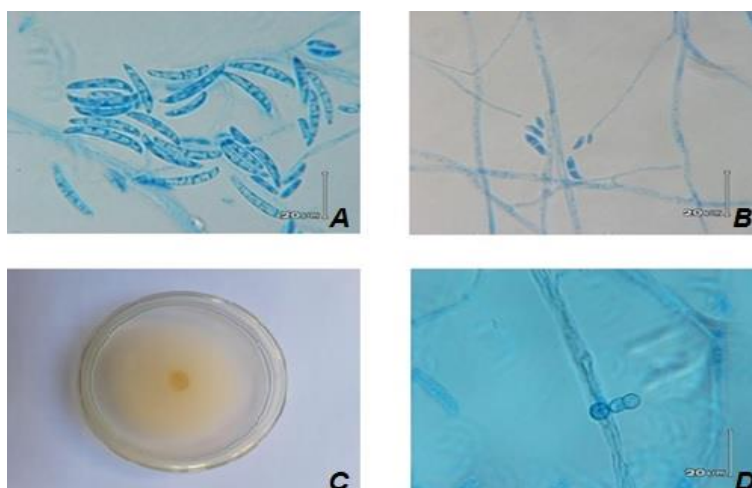
شکل ۲- درخت تبارزایی بدون مقیاس گونه‌های بیمارگر که در تجزیه و تحلیل درست‌نمایی بیشینه براساس توالی ITS با استفاده از مدل Kimura two-parameter، توزیع جداگانه گاما و با فرض ثابت بودن سایت‌ها (K2+G+I) به دست آمده است. اعداد اعتبارسنجی زیر ۵۰ درصد نشان داده نشده و شاخص‌های بوت‌استرپ براساس ۱۰۰۰ بار نمونه‌گیری کاذب به دست آمده‌اند.



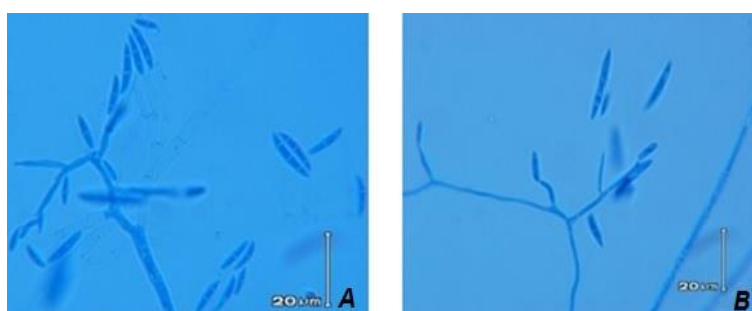
شکل ۳- گونه *Macrophomina phaseolina* (سویه SCUA-M-5P): (A) میکرواسکلروت و (B) شکل پرگنه. رنگ آمیزی اسلایدها با استفاده از محلول لاکتوفنل - کاتن‌بلو انجام شده است.



شکل ۴- گونه *Rhizoctonia solani* (سویه SCUA-Rh): (A) شکل پرگنه و (B-C) انشعابات ریشه. رنگ آمیزی اسلایدها با استفاده از محلول لاکتوفنل - کاتن‌بلو انجام شده است.



شکل ۵- گونه *Fusarium falciforme* (سویه SCUA-3p): (A-B) کنیدیوم‌ها، (C) شکل پرگنه و (D) کلأمیدوسپورها. رنگ آمیزی اسلایدها با استفاده از محلول لاکتوفنل - کاتن‌بلو انجام شده است.



شکل ۶- گونه *Fusarium chlamydosporum* (سویه SCUA-5P2): (A-B) کنیدیوفورها و کنیدیوم‌ها. رنگ آمیزی اسلایدها با استفاده از محلول لاکتوفنل - کاتن‌بلو انجام شده است.

مقایسه میزان تولید سیدروفور توسط سویه‌های

Trichoderma و بیمارگرها در محیط کشت حداقلی: با افزودن معرف CAS و محلول shuttle یا سولفوسالسیلیک اسید به عصاره محیط کشت، تغییر رنگ بعد از ده دقیقه مشاهده شد. این تغییر رنگ با توجه به میزان سیدروفور تولیدشده سویه‌های *Trichoderma* و سویه‌های بیمارگر در محیط کشت متفاوت بود و از آبی به نارنجی و صورتی مشاهده می‌شد. در اینجا تغییر رنگ، بیشتر از آبی به صورتی به معنای تولید سیدروفور بیشتر و کلاته‌شده آهن موجود در محلول CAS است.

با اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان تولید سیدروفور توسط سویه‌های مختلف اندازه‌گیری شد. طبق مشاهدات انجام‌شده، با افزایش میزان سیدروفور تولیدی در محیط رشد مربوط به هر نمونه، آهن بیشتری با سیدروفور آن کلاته می‌شود؛ در نتیجه، میزان جذب نوری در طول موج ۶۳۰ نانومتر و نیز عدد خوانده‌شده توسط دستگاه کمتر است. عدد جذب کمتر به معنای تولید بیشتر سیدروفور بود.

پس از اندازه‌گیری جذب نوری با اسپکتروفتومتر، درصد سیدروفور تولیدشده سویه‌های بیمارگر و سویه‌های عامل کنترل بیولوژیک محاسبه شد (جدول

۱). سنجش و ردیابی میزان سیدروفور تولیدشده نشان داد سویه *T. pleurotica* Isf-15 بین سویه‌های *Trichoderma* و سویه *Rhizoctonia solani* SCUA-3P بیشترین سیدروفور را تولید کردند.

جدول ۱- درصد سیدروفور تولیدشده سویه‌های مدنظر در محیط کشت

درصد تولید سیدروفور	میزان جذب نوری در ۶۳۰ نانومتر	تیمارها ^۱
–	۰	محیط کشت
–	۱/۶۱۹	رفرنس: محیط + محلول CAS + محلول shuttle
۳۶/۱۳	۱/۰۳۴	<i>T. virens</i> ISF-77
۳۱/۲۵	۱/۱۱۳	<i>T. koningiopsis</i> Arak-96
۵۷/۶۲	۰/۶۸۶	<i>T. harzianum</i> Arak-6
۶۳/۸۶	۰/۵۸۳	<i>T. virens</i> Arak-60
۶۲/۵۶	۰/۶۰۶	<i>T. virens</i> Ham-65
۶۴/۷۹	۰/۵۷	<i>T. harzianum</i> ISF-B
۴۳	۰/۹۲	<i>T. capillare</i> Isf-7
۸۵/۴۳	۰/۲۳	<i>T. pleurotica</i> Isf-15
۵۹	۰/۶۶۷	<i>T. harzianum</i> Arak-12
۴۷/۳۷	۰/۸۵۲	<i>F. chlamydosporum</i> SCUA-5p
۵۰/۷۱	۰/۷۹۸	<i>M. phaseolina</i> SCUA-M-5P
۶۴/۴۸	۰/۵۷۵	<i>R. solani</i> SCUA-RH
۴۵/۸۳	۰/۸۷۷	<i>F. falciform</i> SCUA-3P

^۱ هر تیمار شامل عصاره کشت قارچ + محلول CAS + محلول shuttle

نتایج آزمون کشت متقابل نه سویه از پنج گونه

Trichoderma علیه بیمارگرهای جداشده: سویه‌های *Trichoderma* رشد قارچ‌های بیمارگر را محدود کردند (جدول ۲). این سویه‌ها علاوه بر بازدارندگی رشد بیمارگر، روی پرگنه قارچ عامل بیماری نیز رشد کردند که این همپوشانی در سویه‌های *T. harzianum* Isf-B، *T. capillare* Isf-7 و *T. pleurotica* Isf-15 همراه با تولید رنگدانه و اسپورزایی روی پرگنه قارچ عامل بیماری بود (شکل ۷). همچنین، سویه‌های *T. Virens* Ham-65 و *pleurotica* Isf-15 پیچیدگی ریشه‌ای (میکوپارازیتسم) در اطراف

میسلیوم‌های سویه *R. solani* SCUA-RH ایجاد کردند (شکل ۷). مقایسه قدرت بازدارندگی سویه‌ها از رشد سه بیمارگر مدنظر، نشان داد تمامی سویه‌های *Trichoderma* در جلوگیری از رشد قارچ *F. chlamydosporum* و *M. phaseolina* نسبت به *R. solani* بهتر عمل می‌کنند.

در آزمون کشت متقابل علیه قارچ *R. Solani*، سویه‌های *T. harzianum* Isf-B و *T. capillare* Isf-7 با ۱۸/۶ درصد بازدارندگی و سویه‌های *T. harzianum* Arak-12 و *T. virens* Isf-77 با ۴/۶۲ درصد بازدارندگی، بیشترین و کمترین تأثیر را بر جلوگیری از

جلوگیری از رشد قارچ *F. chlamydosporum* SCUA-5p2 مربوط به سویه *T. virens* Ham-65 و کمترین میزان بازدارندگی مربوط به سویه *T. harzianum* Arak-12 (۸ درصد بازدارندگی) بوده است. سویه *T. virens* Ham-65 با تمامی سویه‌ها اختلاف معنی‌دار داشته و بیشترین اثر بازدارندگی را در محیط کشت بر این بیمارگرها اعمال کرده است.

رشد قارچ *R. solani* داشته‌اند. در بررسی اثر سویه‌ها بر جلوگیری از رشد قارچ *M. phaseolina*، سویه‌های *T. pleurotica* Isf-15 و *harzianum* Isf-B ۲۶ درصد بازدارندگی، بیشترین اثر را در جلوگیری از رشد بیمارگر داشتند و کمترین مقدار بازدارندگی مربوط به سویه *T. koningiopsis* Arak-96 بوده است. براساس محاسبه درصد بازدارندگی نیز بیشترین میزان

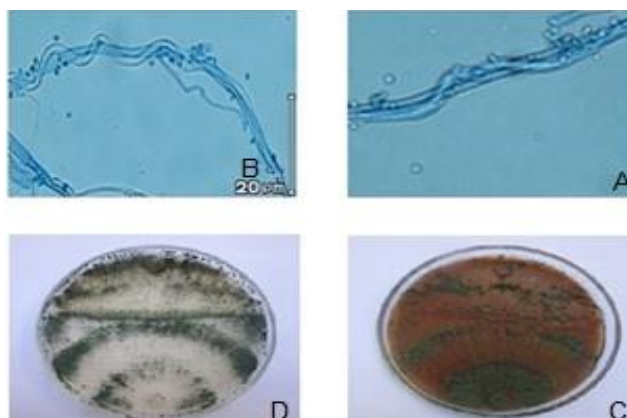
جدول ۲- درصد بازدارندگی رشد قارچ‌های بیمارگر در آزمون کشت متقابل تجزیه و تحلیل شده با یک طرح کاملاً تصادفی (آزمون توکی)

سویه‌ها	<i>F. chlamydosporum</i>	<i>M. phaseolina</i>	<i>R. solani</i>	<i>F. falciforme</i>
<i>T. virens</i> Ham-65	30 ^b	12.1 ^b	13.8 ^{bc}	29 ^c
<i>T. harzianum</i> Arak-6	13.3 ^a	13.5 ^b	16.3 ^{bc}	21.3 ^{abc}
<i>T. virens</i> Arak-60	18.7 ^{ab}	17.7 ^b	9 ^{ab}	22.6 ^{abc}
<i>T. harzianum</i> Arak-12	8 ^a	13.5 ^b	4.6 ^a	13 ^a
<i>T. koningiopsis</i> Arak-96	13.3 ^a	4.3 ^a	9.3 ^{ab}	14.1 ^{ab}
<i>T. harzianum</i> -Isf-B	22 ^{ab}	25.5 ^d	18.6 ^c	25.7 ^{bc}
<i>T. capillare</i> Isf-7	14.7 ^{ab}	21.3 ^c	18.6 ^c	19.7 ^{abc}
<i>T. pleurotica</i> Isf-15	22 ^{ab}	25.5 ^d	11.6 ^{bc}	27 ^{bc}
<i>T. virens</i> Isf-77	18.7 ^{ab}	13.5 ^b	4.6 ^a	17.7 ^{ab}

^۱ هر عدد، میانگین سه تکرار است. حروف غیرمشابه در هر ستون، اختلاف معنی‌دار آماری در سطح احتمال ($P \leq 0.05$) با آزمون توکی دارند.

جدول ۳- تجزیه واریانس درصد‌های بازدارندگی در آزمون کشت متقابل

تیمارها	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	مقدار F	معنی‌داری
<i>F. chlamydosporum</i>	۹۶۰/۰۰	۸/۰۰	۱۲۰/۰۰	۴/۴۰	۰/۰۰۰
<i>M. phaseolinae</i>	۱۱۵/۰۳	۸/۰۰	۱۴۴/۲۵	۲۶/۹۶	۰/۰۰۰
<i>R. solani</i>	۶۹۷/۹۲	۸/۰۰	۸۷/۲۴	۹/۶۶	۰/۰۰۰



شکل ۷- آزمون کشت متقابل. (A-B) پیچ‌خوردگی ریشه‌ای *T. virens* Ham-65 و *T. pleurotica* Isf-15 در اطراف ریشه‌های قارچ بیمارگر *R. solani* SCUA-RH (C) اسپورزایی و تولید رنگدانه سویه *Isf-15* علیه بیمارگر *F. falciforme* SCUA-3P و (D) اسپورزایی سویه *Arak-12* روی قارچ *R. Solani*. رنگ‌آمیزی اسلایدها با استفاده از محلول لاکتوفنل - کاتن‌بلو انجام شده است.

بحث

در این مطالعه، گونه‌های *Fusarium* *Macrophomina*، *F. falciforme*، *chlamydosporum*، *Rhizoctonia solani* و *phaseolina* به عنوان بیمارگرهایی که باعث بیماری طوقه و ریشه لویا چشم‌بلبلی در استان خوزستان می‌شوند، براساس ریخت‌شناسی و تجزیه و تحلیل ناحیه ITS شناسایی شدند. نقش این بیمارگرها در ایجاد بیماری در گیاهان مختلف از جمله لویا در مطالعات قبلی تأیید شده است (۱-۲-۳-۴-۵-۶). در شناسایی قارچ‌ها بررسی‌های ریخت‌شناختی منجر به شناسایی دقیق نمی‌شوند؛ بنابراین لازم است ناحیه‌های ژنی نیز توالی‌یابی و در تجزیه و تحلیل تبارزایی و جستجوی بلاست استفاده شوند (۲۵). ناحیه تغییرپذیر ITS از ژن ریپوزومی (nrDNA)، به عنوان نشانگر، در کنار تعدادی از ژن‌های کدکننده پروتئین از جمله بتاتوبولین (*tub2*)، فاکتور تداوم ترجمه ۱-آلفا (*tef1-a*)، دومین زیرواحد بزرگ RNA پلیمراز II (*rpb2*)، اکتین (ACT)، کالمودولین (Cmd)، *gapdh* و هیستون H3 (HIS) در شناسایی قارچ‌ها استفاده می‌شود. این ژن‌ها به صورت تک‌ناحیه‌ای (single-locus) و چندناحیه‌ای (multi-locus) در تجزیه و تحلیل تبارزایی آرایه‌های مختلف قارچی استفاده شده و به جداسازی تبارزایی و شناسایی دقیق بسیاری از آرایه‌های قارچی کمک کرده‌اند (۱۵-۲۰-۲۶-۲۷-۲۸-۲۹-۳۰-۳۱-۳۲-۳۳-۳۴-۳۵-۳۶).

اندازه‌گیری میزان سیدروفور نشان داد سویه‌های *Trichoderma* و بیمارگرها می‌توانند در محیط فاقد آهن، سیدروفور درخوردن توجهی تولید کنند. سیدروفورها کلاته‌کننده‌های با وزن مولکولی پایین‌اند که بیشتر میکروارگانیسم‌ها از جمله *Trichoderma* در شرایط

کمبود آهن، آنها را ترشح و آهن محیط را برای خود قابل دسترس و برای سایر موجودات خارج از دسترس می‌کنند (۳۷-۳۸). گونه‌های *Trichoderma* در مقایسه با قارچ‌های دیگر مقدار بیشتری سیدروفور در شرایط کمبود آهن، تولید و با بیمارگر گیاهی برای به دست آوردن آهن رقابت می‌کنند (۳۷-۳۸). طبق مطالعات انجام‌شده، حضور و نقش سیدروفورها در قارچ‌های بیمارگر در جوانه‌زنی میسیلیوم و اسپور قارچ (۱۳)، ذخیره آهن در کنیدیوم و جوانه‌زنی آن (۳۷) و حمل‌ونقل آن در میتوکندری قارچ‌ها به اثبات رسیده است (۱۴). تحقیقات قبلی (۳۹) نشان می‌دهند توان بیماری‌زایی بعضی بیمارگرها با تولید بیومولکول‌های اختصاصی همچون سیدروفورها تغییر می‌کند؛ برای مثال، فیل استیک‌اسید در بیماری‌زایی قارچ *R. solan* نقش دارد و نشان داده شده است که در سویه‌های تولیدکننده میزان بیشتر فیل استیک‌اسید، درصد مرگ گیاهچه گوجه‌فرنگی افزایش می‌یابد (۴۰).

در آزمون کشت متقابل، هشت سویه با رشد سریع پرگنه نسبت به رشد پرگنه قارچ بیمارگر باعث بازدارندگی رشد بیمارگرها شدند. در مطالعات گذشته، تأثیرات بازدارندگی سویه‌هایی از گونه‌های مختلف *Trichoderma* روی رشد بیمارگرهای گیاهی ثابت شده‌اند؛ از جمله بازدارندگی گونه‌های *T. koningiopsis*، *T. koningii*، *brevicompactum*، *T. virens* و *viridescens* روی بیمارگر *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* (۱۶)، گونه‌های *T. gamsii*، *T. hamatum* و *T. harzianum* روی بیمارگر *F. oxysporum* f. sp. *cepae* (۴۱) و گونه *Alternaria solani* روی بیمارگرهای *T. harzianum* و *Pythium ultimum* (۴۲). در این مطالعه

- International Research Center for Agriculture Science (JIRCAS). IITA, Ibadan, Nigeria. *Advanced in cowpea research*. 1997; 375.
- (3) Adam T. *Contribution a l'acconnaissance des maladies du niebe (Vigna unguiculata (L.) Waip.) au Niger avec mention special au Macrophomina phaseolina Goid. Universitde renne*. 1986.
- (4) Short GE, Wyllie TD, Bristow PR. Survival of *Macrophomina phaseolina* in soil and residue of soybean, *phytopathogens*. 1980; 70: 13–17.
- (5) Altinok HH, Can C. Characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *melongenae* isolated from eggplant in turkey by pathogenicity, VCG and PAPD analysis. *Phytoparasitica*. 2010; 38(2): 149–157.
- (6) Abawi GS, Pastor-Corrales MA. *Root rots of beans in Latin America and Africa: diagnosis, research methodologies and management strategies*. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia; 1990.
- (7) Naseri B. Epidemics of Rhizoctonia root rot in association with biological and physicochemical properties of field soil in bean crops. *Journal of Phytopathology*. 2013; 161(6): 397–404.
- (8) Weindling R. *Trichoderma lignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*. 1932; 32: 837–845.
- (9) Chet I, Inbar J. Biological control of fungal pathogens. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1994; 48(1): 37–43.
- (10) Demain AL, Fang A. The natural function of secondary metabolites. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2000; 69: 1–39.
- (11) Kloepper JW, Leong J, Teintze M, Schiroth MN. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth promoting Rhizobacteria. *Nature*. 1980; 286: 885–886.
- همانند تحقیقات قبلی (۱۴-۱۶-۴۱)، برخی از سویه‌های *Trichoderma* علاوه بر بازدارندگی از رشد بیمارگر، پیچ‌خوردگی ریشه‌ای اطراف ریشه بیمارگر و تولید رنگدانه زیاد در محیط را نشان داده‌اند. در مطالعات گذشته، با قرار دادن *Phoma betae*، *Rosellinia* و *Botrytis cinerea* در مقابل چند سویه *Trichoderma* به این نتیجه رسیدند که اسپورزایی و قدرت مهاجمی سویه‌های *Trichoderma* در آزمون کشت متقابل، به نوع قارچ عامل بیماری و ترکیب محیط کشت بستگی دارد (۴۳). پارازیت‌ه کردن قارچ عامل بیماری توسط سویه‌های *Trichoderma* و تولید آنزیم تجزیه‌کننده دیواره سلولی مانند گلوکوناز در مراحل پارازیتسم به اثبات رسیده‌اند و در بیشتر مقالات کنترل بیولوژیک به آنها اشاره شده است (۳۷-۴۴-۴۵).
- قارچ *Trichoderma* از مکانیسم‌های مختلفی مانند کاهش مقاومت و واکنش‌های دفاعی گیاه، مقابله مستقیم از طریق میکوپارازیتسم، آنتی‌بیوز و رقابت برای مقابله با بیمارگرهای گیاه استفاده می‌کند (۴۶). گونه *T. lignorum* در محیط کشت موادی ترشح می‌کند که برای *R. solani* مرگ‌آور است (۸). گونه *T. viride* از گسترش شعاعی پرگنه *F. moniliforme* ممانعت می‌کند و گسترش شعاعی گونه بیماری‌زا را کاهش می‌دهد (۴۷).

References

- (1) Anonymous. Agricultural statistics. volume III (horticultural products). Published by the ministry of agriculture. Department of planning and economic. In Persian: Office of statistics and information technology; 2013.
- (2) Singh BB, Mohan-raj DR, Dashiell KE, Tackai LEN. Copublication of International Institute of Tropical Agriculture and Japan

- (12) Matzanke BF, Bill E, Trautwein AX, Winkelman G. Role of siderophores in iron storage in spores of *Neurospora crassa* and *Aspergillus ochraceus*. *Journal of Bacteriology*. 1987; 169(12): 5873–76.
- (13) Winkelman G. Rhizoferrin a novel siderophore from the fungus *Rhizopus microsporus* var *rhizopodiformis*. *Biology of Metals*. 1991; 4(4): 238–243.
- (14) Charlang GNgB, Horowitz NH, Horowitz RM. Cellular and extracellular siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. *Molecular and Cellular Biology*. 1981; 1(2): 94–100.
- (15) Mehrabi-Koushki M, Pooladi P, Eisvand P, Babaahmadi G. *Curvularia ahvazensis* and *C. rouhaniai* spp. nov. from Iran. *Mycosphere*. 2018; 9(6): 1173–1186.
- (16) Zafari D, Mehrabi Koushki M, Bazgir E. Biocontrol evaluation of wheat take-all disease by *Trichoderma* screened isolates. *African Journal of Biotechnology*. 2008; 7(20): 3650–3656.
- (17) Bhattacharya D, Basu S, Chattapadhyay J P, Bose SK. Biocontrol of *Macrophomina* root rot disease of jute by an antagonistic organism, *Aspergillus versicolor*. *Plant Soil*. 1985; 87(3): 435–438.
- (18) Naseri B. Root rot of common bean in Zanjan, Iran: major pathogens and yield loss estimates. *Australasian Plant Pathology*. 2008; 37(6): 546–551.
- (19) Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. *Applied Microbiology*. 1985; 1(1): 17–20.
- (20) Ahmadpour SA, Mehrabi-Koushki M, Farokhinejad R. *Neodidimelliopsis farokhinejadii*, a new fungal species from dead branches of trees in Iran. *Sydowia*. 2017; 69: 171–182.
- (21) White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. (eds). *PCR protocols. a guide to methods and applications*. Academic Press: New York, 1990; 18(1): 315–322.
- (22) Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013; 30(12): 2725–2729.
- (23) Saha M, Sarkar S, Sarkar B, Sharma B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Microbial siderophores and their potential applications: a review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016; 23(5): 3984–3999.
- (24) Schwyn B, Neilands JB. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*. 1987; 160(1): 47–56.
- (25) Summerbell RC, Levesque CA, Seifert KA, Bovers M, Fell JW, Diaz MR, Boekhout T, de Hoog GS, Stalpers J, Crous PW. Microcoding: the second step in DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2005; 360: 1897–1903.
- (26) Ahmadpour SA, Farokhinejad R, Mehrabi-Koushki M. Further characterization and pathogenicity of *Didymella microchlamydospora* causing stem necrosis of *Morus nigra* in Iran. *Mycosphere*. 2017; 8(7): 835–852.
- (27) Babaahmadi G, Mehrabi-Koushki M, Hayati J. *Allophoma hayatii* sp. nov, an undescribed pathogenic fungus causing dieback of *Lantana camara* in Iran. *Mycological Progress*. 2018; 17(3): 365–379.
- (28) Dehdari F, Mehrabi-Koushki M, Hayati J. *Curvularia shahidchamranensis* sp. nov, a crude oil-tolerant fungus. *Current Research in Environmental and Applied Mycology*. 2018; 8(6): 572–584.
- (29) Heidari K, Mehrabi-Koushki M, Farokhinejad R. *Curvularia mosaddeghii* sp. nov, a novel species from the family Pleosporaceae. *Mycosphere*. 2018; 9(4): 635–646.
- (30) Heidari K, Farokhinejad R, Mehrabi-Koushki M. Occurrence of purslane leaf spot caused by *Dichotomophthora lutea* in

- Iran. *Australasian Plant Disease Notes*. 2018; 13(1):1–4.
- (31) Mehrabi-Koushki M, Khodadadi-Pourarpanahi S, Jounbozorgi S. Fungal endophytes associated with some thermo-tolerant plants in salt-stress ecosystem. *Mikologiya i Fitopatologiya*. 2018; 52(3): 187–195.
- (32) Jonbozorgi S, Mehrabi-Koushki M, Farokhinejad R. Isolation and identification of fungal endophytes of the cowpea in Khuzestan Province. *Biological Journal of microorganisms*. 2019; 8(29): 97–115.
- (33) Larki R, Mehrabi-Koushki M, Farokhinejad R. *Ectophoma iranica* sp. nov. and new hosts and records of *Allophoma* spp. in Iran. *Journal of Phytopathology*. 2019; 167(9): 538–545.
- (34) Song J, Liang JF, Mehrabi-Koushki M, Krisai-Greilhuber I. et al. Fungal systematics and evolution 5. *Sydowia*. 2019; 71: 141–245.
- (35) Safi A, Mehrabi-Koushki M, Farokhinejad R. 2020. *Amesia khuzestanica* and *Curvularia iranica* spp. nov. from Iran. *Mycological Progress*. 2020; 19(9): 935–945.
- (36) Aghyl H, Mehrabi-Koushki M, Esfandiari M. *Chaetomium iranicum* and *Collariella capillicompacta* spp. nov. and notes to new hosts of *Amesia* species in Iran. *Sydowia*. 2021; 73: 21–30.
- (37) Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. 2004; 2(1): 43–56.
- (38) Wallner A, Blatzer M, Schrettl M, Sarg B, Lindner H, Haas H. a siderophore involved in intra- and transcellular iron distribution in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009; 75(12): 4194–4196.
- (39) Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*. 2001; 9(7): 327–335.
- (40) Renshaw JC, Robson GD, Trinci AP, Wiebe MG, Livens FR, Collison D. Fungal siderophores: structures, functions and applications. *Mycological Research*. 2002; 106(10): 1123–1142.
- (41) Bunbury-Blanchette AL, Walker AK. *Trichoderma* species show biocontrol potential in dual culture and greenhouse bioassays against *Fusarium* basal rot of onion. *Biological Control*. 2019; 130: 127–135.
- (42) Mazrou YSA, Makhoulouf AH, Elseehy MM, Awad MF, Hassan, MM. Antagonistic activity and molecular characterization of biological control agent *Trichoderma harzianum* from Saudi Arabia. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*. 2020; 30: 4.
- (43) Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied Environmental Microbiology*. 2000; 66: 1890–1898.
- (44) McIntyre M, Nielsen J, Arnau J, van der Brink H, Hansen K, Madrid S. Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. Copenhagen: Denmark; 2004.
- (45) Howell CR. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. 2003; 87: 4–10.
- (46) Papavizas GC. *Trichoderma* and *Gliocladium* biology, ecology and potential for biocontrol. *Annual Review Phytopathology*. 1985; 23: 23–45.
- (47) Yates IE, Meredith F, Smart W, Bacon CW, Jaworski AJ. *Trichoderma viride* suppresses fumonisin B1 production by *Fusarium moniliforme*. *Journal of Food Protection*. 1999; 62: 1326–1332.