آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۷، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۸
DOI: 10.22092/jaep.2020.128244.1309

مهار زیستی بیماری پوسیدگی طوقه برنج ناشی از *Fusarium fujikuroi* با استفاده از برخی قارچ‌های اندوفیت

نرجس‌خاتون رامش[۱]، شهرام نعیمی[۲]✉، سعید رضائی[۳]، خلیل‌بردی فتوحی‌فر[٤]

۱و۳- به ترتیب دانشجوی دکتری و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران؛ ۲- استادیار پژوهشی بخش تحقیقات کنترل بیولوژیک، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران؛ ٤- دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم و مهندسی کشاورزی، پردیس کشاورزی و منابع‌طبیعی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۸)

چکیده

این پژوهش با هدف، جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت برنج به‌منظور کاربرد آن‌ها به‌عنوان جایگزین مؤثر و بی‌خطر به جای قارچکش‌های شیمیایی برای کنترل بیماری پوسیدگی طوقه با عامل *Fusarium fujikuroi* انجام شد. قارچ‌های اندوفیت، از برگ، ساقه، غلاف و ریشه بوته‌های برنج شالیزارهای استان مازندران و گیلان جداسازی شد. جدایه‌های قارچی به دست آمده، ابتدا در آزمون کشت متقابل علیه سویه پُرآزار *F. fujikuroi* F257 غربال شده و سپس سویه‌های مؤثر برای آزمون گلخانه انتخاب شدند. بذور برنج با جدایه‌های منتخب اندوفیت، تیمار و درصد وقوع بیماری در نشاها و نیز شاخص‌های رشد برنج تعیین شدند. کمترین میزان وقوع مرگ گیاهچه در نشاهای برنج تحت تیمار قارچ‌های اندوفیت *Chaetomium globosum* NR-R688 و *C. globosum* NR-SH321 با دو درصد (۹۷/٤ درصد کنترل وقوع بیماری)، *Penicillium* sp. NR-L243 و *Fusarium* sp. NR-L645 با شش درصد (۹۲/۳ درصد کنترل وقوع بیماری) مشاهده شد. همچنین، این چهار سویه باعث افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشد گیاه برنج نسبت به گیاهان شاهد شد. نتایج این تحقیق نشان داد که قارچ‌های اندوفیت برنج می‌توانند به‌عنوان عوامل کنترل زیستی بیماری پوسیدگی طوقه و افزاینده رشد برنج با هدف کاربردی نمودن آن‌ها در تحقیقات آتی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: شاخص‌های رشدی، خزانه برنج، فوزاریوم، کنترل بیولوژیک، مرگ گیاهچه

Biological control of rice Bakanae disease caused by *Fusarium fujikuroi* using some endophytic fungi

N.K. RAMESH[1], S. NAEIMI[2]✉, S. REZAEE[1], K.-B. FOTOUHIFAR[3]

1 and 3. Department of Plant Protection, College of Agricultural Sciences and Food Industries , Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran; 2. Biological Control Research Department, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extention Organization (AREEO), Tehran, Iran; 4. Department of Plant Protection, Faculty of Agricultural Science and Engineering, College of Agricultural and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

Abstract

The objective of the current study was to isolate and identify the fungal endophytes of rice as the effective and safe alternatives to use indtead of chemical fungicides for controlling rice Bakanae disease caused by *Fusarium fujikuroi*. Fungal endophytes obtained from leaf, stem, sheath and root samples of rice plants in paddy fields. The fungal isolates screened against aggressive strain of *F. fujikuroi* F257 in dual culture tests and the most effective endophytes were selected for greenhouse experiments. Rice seedlings were treated with the fungal endophytes and *F. fujikuroi* F257 isolate. Disease incidence and growth parameters were measured. The lowest Bakanae incidences were recorded using *Chaetomium globosum* NR-R688 and *C. globosum* NR-SH321 strains as 2% (with 97.4% disease control) and by NR-L243 *Penicillium* sp. and *Fusarium* sp. NR-L645 as 6% (with 92.3% disease control). In addition, these four fungal endophytes significantly promoted the growth parameters of rice seedlings compared to the control. According to the results of this study, fungal endophytes of rice could be applied as the potential biocontrol agents of Bakanae disease and plant growth promoter, but more research is needed for developing them in the future.

Keywords: Biocontrol, Fusarium, growth parameters, nursery, seedling blight

✉ **sh.naeimi@areeo.ac.ir**

مقدمه

برنج (*Oryza sativa* L.)، به‌عنوان یک محصول غذایی اصلی، نقش بسیار مهمی در تغذیه و امنیت غذایی جمعیت زیادی از مردم جهان به ویژه در کشورهای در حال توسعه دارد. بیماری باکانی[1] یا پوسیدگی طوقه و ریشه با عامل *Fusarium fujikuroi* species complex در همه مناطق عمده برنج‌کاری دنیا وجود دارد (Carter *et al*., 2008)و یکی از بیماری‌های مهم برنج در جهان است (Singh and Sunder, 2012). این بیماری برای اولین‌بار در سال ۱۸۹۸ توسط هُری از ژاپن گزارش شد که نام *Fusarium heterosporium* را برای فرم غیرجنسی عامل بیماری انتخاب کرد (Hori, 1898). علائم این بیماری در هر مرحله از دوره رشد گیاه می تواند رخ دهد امّا علائم مشخص بیماری باکانی (به‌معنی نشای احمق در زبان ژاپنی)، گیاهانی باریک و کشیده (ناشی از جیبرلین تولید شده توسط بیمارگر)، با برگ‌های سبز رنگ پریده تا زرد است که در خزانه و یا مزرعه مشاهده می‌شود. مرگ گیاه در مراحل اولیه رشد یا در مزرعه، کوتولگی بوته‌ها در اثر پوسیدگی ریشه و طوقه، تشکیل ریشه‌های نابجا و بذور تغییر رنگ یافته، نیمه پر یا پوک به‌عنوان علائم دیگر بیماری محسوب می‌شود (Bashyal *et al*., 2015; Katoch *et al*., 2019). در مجموع، پوسیدگی طوقه و ریشه باعث کاهش کیفی و کمّی محصول شده و خسارت آن ممکن است به ٤٠ درصد برسد (Ou, 1985). درایران، بیماری پوسیدگی طوقه برنج برای اولین‌بار در سال ١٣٤٣ از شهرستان فومن در استان گیلان گزارش شد. در دهه هفتاد شمسی با کشت ارقام اصلاح شده، به‌خصوص رقم بسیار حساس خزر، این بیماری به‌سرعت در استان گیلان گسترش یافت (Padasht-Dehkaei, 1993). گزارش‌هایی مربوط به درصد آلودگی برنج به این بیماری در استان‌های مختلف وجود دارد که براساس نوع رقم، منطقه و سال متفاوت است. در هر حال، میزان خسارت دقیق ناشی از بیماری نامشخص است.

پوسیدگی طوقه برنج یک بیماری تک چرخه‌ای[2] بوده و عامل بیماری غالباً با بذر آلوده منتقل می‌شود، اگرچه بقایای گیاهی آلوده از فصل زراعی قبل هم می‌تواند به‌عنوان منبع زاد مایه باشد (Carter *et al*., 2008). استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی به‌صورت ضدعفونی بذر، رایج‌ترین روش کنترل این بیماری است ولی سموم شیمیایی گران بوده و برای انسان و محیط زیست خطرناک هستند. علاوه بر آن، استفاده مستمر از قارچ‌کش‌های شیمیایی موجب ظهور سویه‌های مقاوم قارچ بیمارگر شده و اثربخشی آن‌ها را کاهش داده و نیز باعث اختلال در جامعه میکروبی، کاهش سلامت خاک و تنوع زیستی و بر هم خوردن تعادل اکوسیستم می‌شوند (Park *et al*., 2009; Yang *et al*., 2011). رویکردهای کنترل‌زیستی مبتنی بر استفاده از جمعیت‌های میکروبی طبیعی و متابولیت‌های ثانویه آن‌ها جایگزین مناسب و بی‌خطری برای قارچ‌کش‌های شیمیایی و همسو با کشاورزی پایدار بوده (Dubey *et al*., 2015) و استفاده از میکروارگانیسم‌های بومی برای کنترل قارچ‌های بیماری‌زا در سال‌های اخیر مورد تأکید و توجه زیادی قرار گرفته است (Whipps, 2007).

قارچ‌های اندوفیت تمام یا دوره‌ای از چرخه زندگی خود را در داخل بافت‌های گیاهی سپری می‌کنند، بدون این که علائمی از بیماری را بروز دهند (Faeth and Fagan, 2002). این قارچ‌ها بخشی از میکروبیوم گیاه بوده و به‌فراوانی در گیاهان و اکوسیستم‌های مختلف وجود دارند (Arnold, 2007; Porras-Alfaro and Bayman, 2011) و با افزایش مقاومت و بهبود رشد گیاه، نقش مهمی در محافظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زای زنده و تنش‌های غیرزنده ایفا می‌کنند (Mayerhofer *et al*., 2013). این قارچ‌ها به‌دلیل تولید ترکیبات زیستی[3] فراوان به‌طور گسترده در کشاورزی (مدیریت آفات و بیماری‌های گیاهی و افزایش رشد) و پزشکی (داروسازی) استفاده می‌شوند (Strobel 2003; Aly *et al*., 2011; Hamilton *et*

1. Bakanae

2. Monocyclic disease
3. Bioactive compounds

al., 2016). استفاده از قارچ‌های اندوفیت برای افزایش مقاومت گیاه به بیمارگرها، گامی به‌سوی کاهش استفاده از قارچ‌کش‌ها و سایر مواد شیمیایی در کشت برنج خواهد بود (Suada *et al*., 2012).

نتایج مطالعات انجام شده در خصوص ارزیابی پتانسیل میکروارگانیسم‌های اندوفیت نشان دهنده این واقعیت است که آن‌ها توانسته‌اند تعداد زیاد و متنوعی از بیماری‌های گیاهی را به‌ویژه در غلات کنترل نمایند (Sun *et al*., 2012; Wani *et al*., 2015). قارچ‌های اندوفیت برنج توسط محققین مختلف در دنیا مطالعه شده اند، امّا تاکنون تحقیق جامعی در این زمینه در کشور انجام نشده است. جدایه KNB-422 قارچ *Talaromyces* sp. اندوفیت جدا شده از گیاه برنج دارای خاصیت آنتاگونیستی علیه *Gibberella fujikuroi* (Sawada) Ito بوده و توانایی ممانعت از رشد این قارچ را داشته است (Kato *et al*., 2012). در مطالعه‌ای دیگر مکانیسم عملکرد جدایه قارچی مذکور بررسی شده است. ریسه‌های این جدایه در اطراف ریسه قارچ بیمارگر رشد کرده و با سوراخ کردن ریسه، آن را مورد حمله قرار داده و مانع از رشد قارچ شده است (Miyake *et al*., 2012). تأثیر قارچ‌های اندوفیت گیاه برنج *Absidia* Tiegh. و *Cylindrocladium* Morgan بر رشد گیاه برنج و جلوگیری از رشد قارچ *Magnaporthe grisea* (Hebert) Barr بررسی شده است و این قارچ ها موجب افزایش معنی‌دار رشد برنج و ممانعت از رشد میسلیومی *M. grisea* شده‌اند (Atugala and Deshappriya, 2015). در مطالعه‌ای دیگر، تأثیر قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از برنج در بروز بیماری لکه قهوه‌ای برنج آزمایش شده است و قارچ‌های *Trichoderma* sp. و *Chaetomium* sp.، به‌طور قابل توجهی قارچ بیمارگر *Bipolaris oryzae* (Breda de Haan) Shoemaker را در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه کنترل کرده اند (Priyadarshani *et al*., 2018). همچنین، قارچ‌های *Phialemonium* Gams & Cooke *curvatum* و *Phaeosphaeria oryzae* Miyake باعث مهار بیماری بلاست ناشی از قارچ *Pyricularia oryzae* Cavara شده اند (Suada *et al*., 2012). در ایران، نقش قارچ اندوفیت ریشه برنج *Piriformospora indica* Verma, Varma, Rexer, Kost & Franken در کنترل بیماری بلاست برنج (Mousavi, 2014) و سوختگی غلاف برنج گزارش شده است (Nassimi and Taheri, 2017).

در سال‌های اخیر تقاضا برای استفاده از آفتکش‌های بیولوژیک[4] رو به‌افزایش نهاده و به موازات آن، بازار فرآورده‌های بیولوژیک نیز رونق چشمگیری داشته است (Glare & Moran-Diez, 2016). بنابراین، جستجو برای یافتن قارچ‌های اندوفیت با خاصیت کنترل بیولوژیک بیماری‌های مهم گیاهی، ضروری و منطقی به‌نظر می‌رسد. با در نظر گرفتن این که قارچ‌های اندوفیت توانسته‌اند به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک بیمارگرهای متعدد گیاهی و افزایش دهنده رشد و عملکرد تعداد زیادی از گیاهان میزبان بکار روند و با توجه به گزارشات متعدد مبنی بر توانایی قارچ‌های اندوفیت در کنترل بیماری‌های غلات و به‌خصوص برنج، این پژوهش با هدف جداسازی و شناسایی قارچ‌های اندوفیت مؤثر در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج انجام شد. لازم به‌ذکر است که تاکنون تحقیقی در زمینه کنترل بیولوژیک بیماری پوسیدگی طوقه برنج با استفاده از قارچ‌های اندوفیت در دنیا انجام نشده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی

به‌منظور دستیابی به قارچ‌های اندوفیت، در طی بهار و تابستان سال ۱۳۹۶، نمونه‌برداری به‌صورت تصادفی از شالیزارهای مناطق مختلف استان‌های مازندران و گیلان انجام شد. نمونه‌برداری از گیاهان برنج سالم و فاقد هر گونه علائم آفات و بیماری‌ها انجام شد. اندام‌های گیاهی شامل برگ، ساقه، غلاف و ریشه به‌تفکیک درون کیسه‌های پلاستیکی و در جعبه حاوی یخ[5] و با ثبت مشخصات نمونه‌ها از قبیل

4. Biopesticides
5. Cool box

مکان جمع‌آوری، رقم برنج و تاریخ نمونه‌برداری به آزمایشگاه منتقل شدند و در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند.

جداسازی قارچ‌های اندوفیت

جداسازی قارچ‌های اندوفیت طی حداکثر ۷۲ ساعت پس از انتقال نمونه‌های گیاهی به آزمایشگاه انجام شد. برای این منظور، نمونه‌های گیاهی (ساقه، برگ، غلاف و ریشه) ابتدا به‌مدت ۱۰ دقیقه زیر جریان آبِ شیر شسته و سپس به قطعات ۰/۵×۰/۵ سانتی‌متری بریده شدند. برای حذف عوامل سطحی، قطعات گیاهی بریده شده ابتدا به‌مدت ۴۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد و سپس به‌مدت چهار الی پنج دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد قرار داده شدند. قطعات گیاهی جهت شستشوی کامل از عوامل ضدعفونی کننده سه بار با آب مقطر سترون شستشو شدند. پس از رطوبت‌گیری با کاغذ صافی سترون، قطعات گیاهی درون تشتک‌های پتری نُه سانتی‌متری حاوی محیط کشت آب-آگار دو درصد (agar, Liofilchem, Italy) و یا عصاره مالت آگار دو درصد (malt extract agar = MEA, Merck, Germany) دارای هر یک از آنتی بیوتیک های سولفات استرپتومایسین و پنیسیلین به میزان ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر کشت و سپس تشتک‌های پتری به انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی منتقل شدند. به‌منظور اطمینان از ضدعفونی سطحی و حذف قارچ‌های سطحی زی، مقداری از آب مقطر سترون مرحله آخرِ شستشو روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (potato dextrose agar = PDA, Merck, Germany) کشت داده شد (Yuan *et al*., 2010; 2011). ریسه‌های قارچی که از قطعات گیاهی رشد کرده بودند به‌صورت جداگانه به محیط کشت PDA منتقل شدند. سپس جدایه‌های قارچ اندوفیت به‌روش نوک ریسه خالص سازی شدند. به‌منظور نگهداری قارچ‌های اندوفیت، قرص‌های میسلیومی از حاشیه پرگنه در حال رشد انتخاب و به درون لوله‌های سترون حاوی ۲۰ درصد گلیسرول منتقل و سپس در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

بررسی خواص آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت

اثر جدایه‌های قارچی اندوفیت به‌دست آمده از گیاه برنج علیه عامل پوسیدگی طوقه و ریشه برنج، سویه پُرآزار قارچ بیمارگر (*Fusarium fujikuroi* F257) که از کلکسیون قارچ‌های زنده مؤسسه تحقیقات برنج کشور دریافت شده بود در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد.

روش کشت متقابل[6]

در این آزمایش در یک طرف تشتک پتری نُه سانتی‌متری حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA)، قرص میسلیومی بیمارگر و در طرف دیگر قرص میسلیومی از هر یک از قارچ‌های اندوفیت به‌صورت جداگانه قرار داده شد. قرص‌های میسلیومی به‌اندازه پنج میلی‌متر و از حاشیه پرگنه پنج تا هفت روزه در حال رشد قارچ‌ها تهیه شد. در تشتک پتری شاهد روبروی بیمارگر، قرصی از محیط کشت PDA قرار داده شد. سپس تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در شرایط تاریکی درون انکوباتور نگهداری شدند. شعاع پرگنه‌ها در روز چهاردهم برای محاسبات آماری اندازه‌گیری شد و درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر با استفاده از فرمول $[(R_1-R_2) / R_1] \times 100$ که در آن R_1 برابر با شعاع پرگنه در شاهد و R_2 برابر با شعاع پرگنه در تیمار است، محاسبه شد (Lahlali and Higri, 2010).

بررسی اثر جدایه‌های منتخب در کنترل بیماری

جدایه‌های قارچ اندوفیت که در آزمون کشت متقابل در آزمایشگاه، بیشترین اثر بازدارندگی را روی رشد قارچ *F. fujikuroi* نشان داده بودند و همچنین هاله بازدارندگی ایجاد کردند، بعلاوه چندین جدایه دیگر از جنس‌های *Chaetomium* Kunze و *Microdochium* Syd. & Syd. که در منابع به‌عنوان عوامل مؤثر کنترل بیماری‌های گیاهی معرفی شده‌اند، برای آزمون گلخانه‌ای انتخاب شدند. بذور برنج رقم خزر (حساس

6. Dual culture

به بیماری پوسیدگی طوقه) به‌مدت ۲٤ ساعت در آب مقطر سترون خیسانده شدند و سپس توسط هیپوکلریت سدیم دو درصد به‌مدت پنج دقیقه ضد عفونی و سه بار با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. سپس بذور درون سوسپانسیون اسپور قارچ *F. fujikuroi* به غلظت $۱۰^{٤} \times ۱$ اسپور در هر میلی‌لیتر، به‌مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند (Khosravi, 2018). به‌ازای هر تیمار، ۵۰ بذر جوانه‌دار شده در هر سینی نشاء به‌ابعاد ۷×۳۰×٤۰ سانتی‌متر حاوی خاک شالیزار کاشته شدند. به خاک درون سینی‌ها کودهای اوره و فسفات به‌ترتیب به‌میزان ۲۵۰ و ۱۵۰ کیلوگرم در هکتار اضافه شد و در گلخانه با دمای ۲۵ تا ۳۰ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰ درصد نگهداری شدند. در این آزمایش از سه روش مایه زنی قارچ های اندوفیت استفاده شد. الف) تیمار بذر[7]؛ برای قارچ‌های اسپورزا، ابتدا از کشت ۱۰ روزه آن‌ها روی محیط PDA، سوسپانسیون با جمعیت $۱۰^{۸} \times ۱$ اسپور در هر میلی‌لیتر تهیه شد. بذرهای جوانه‌زده برنج در ۱۰ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به‌اضافه ۵۰ میکرولیتر محلول ۰/۵ درصد کربوکسی‌متیل سلولز (Carboxymethyl cellulose, BPH, England) به‌عنوان ماده چسباننده[8] به‌مدت ٤۸ ساعت قرار گرفتند (Atugala and Deshapria, 2015). ب) خیساندن خاک[9]؛ هفت روز بعد از کاشت بذرهای تیمار شده با قارچ‌های اندوفیت، سوسپانسیون اسپورهای قارچ‌ها با جمعیت $۱۰^{۸} \times ۱$ اسپور در میلی‌لیتر و به‌مقدار ۵۰ میلی لیتر، پای نشاها اضافه شد. ج) برای قارچ‌های عقیم، بذرهای جوانه‌زده، درون پرگنه چهار روزه و در حال رشد قارچ‌ها در محیط کشت PDA به‌مدت ٤۸ ساعت قرار گرفتند و سپس در داخل سینی نشاء کاشته شدند (Priyadarshani *et al*., 2018).

تیمارهای آزمایش شامل بذور مایه‌زنی شده با بیمارگر + هر یک از قارچ‌های اندوفیت منتخب، بذور مایه‌زنی نشده + هر یک از قارچ‌های اندوفیت منتخب، بذور مایه‌زنی شده با بیمارگر ضدعفونی شده با قارچکش تری‌فلومیزول (Trifmine® 15% EC, Nippon Soda, Japan)، بذور مایه‌زنی شده با بیمارگر به‌تنهایی (شاهد آلوده) و بذور مایه‌زنی نشده به‌تنهایی (شاهد سالم) بود. پس از ۲۱ روز درصد وقوع بیماری[10] با شمارش تعداد نشاهای سالم و بیمار، تعیین و میزان کنترل بیماری برای هر تیمار محاسبه شد. میزان کنترل بیماری با استفاده از فرمول $[(D_1-D_2) / D_1] \times 100$ که در آن D_1 درصد وقوع بیماری در شاهد آلوده و D_2 درصد وقوع بیماری در تیمار است، محاسبه شد.

تأثیر قارچ‌های اندوفیت بر رشد گیاه برنج

برای بررسی اثر جدایه‌های اندوفیت بر شاخص‌های رشد گیاه، بذور مایه‌زنی شده با قارچ بیمارگر با هر یک از قارچ‌های اندوفیت مایه‌زنی شده (مطابق روش اشاره شده در بالا) و در سینی‌های نشاء کاشته شدند. پس از ۲۱ روز، طول ریشه، ارتفاع بوته (گیاهچه)، وزن تر و خشک ریشه و گیاهچه اندازه‌گیری شدند. برای اندازه‌گیری وزن خشک، نمونه‌ها به‌مدت سه روز در دمای ۷۰ درجه سلسیوس در آون نگهداری و سپس توزین شدند.

ردیابی حضور اندوفیت‌ها در بافت‌های گیاهی

از هر کدام از تیمارهای مایه‌زنی شده با قارچ‌های اندوفیت و شاهد مایه‌زنی نشده، پنج گیاهچه به‌صورت تصادفی برای اثبات پدیده اندوفیت شدن انتخاب شدند. برای این منظور، قطعات گیاهی مختلف پس از انجام همان مراحل اشاره شده در قسمت جداسازی قارچ‌های اندوفیت، روی محیط کشت PDA قرار داده شدند. پس از جداسازی و شناسایی قارچ‌های رشد یافته در اطراف قطعات و مقایسه آن‌ها با قارچ‌های جداسازی شده از قطعات مربوط به‌شاهد مایه‌زنی نشده، اندوفیت بودن قارچ‌های مورد مطالعه تعیین شد.

شناسایی قارچ‌های اندوفیت مؤثر

مؤثرترین قارچ‌های اندوفیت در آزمایش گلخانه، مورد شناسایی ریخت‌شناختی و مولکولی قرار گرفتند. ابتدا میزان

7. Seed treatment
8. Sticker
9. Soil drench
10. Disease incidence

رشد روزانه جدایه‌ها روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس اندازه گیری شد. سپس خصوصیات ریخت‌شناختی قارچ‌ها شامل خصوصیات پرگنه و میکروسکوپی بررسی شد. به‌این منظور، برای جنس فوزاریوم از محیط کشت برگ میخک آگار[11] و محیط مصنوعی آگاردار ضعیف[12] و برای سایر قارچ‌ها از محیط‌های کشت عمومی سیب زمینی دکستروز آگار و عصاره مالت آگار استفاده شد. همه کشت‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از انجام بررسی‌های ریخت‌شناختی و شناسایی قارچ‌ها بر اساس کلیدهای شناسایی و توصیف‌های قارچی معتبر (Ellis, 1971; De Hoog and Hermanides-Nijhof, 1977; von Arx, 1982; von Arx *et al*. 1986; Pitt, 1988; Leslie and Summerell, 2006; Crous *et al*., 2006)، به‌منظور تأیید شناسایی ریخت‌شناختی و یا برای قارچ‌های عقیم که شناسایی ریخت شناختی آن‌ها ممکن نبود، شناسایی مولکولی انجام شد. برای این کار، ابتدا استخراج DNA ژنومی براساس روش Zhong and Steffenson (2001) صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR)، با استفاده از جفت آغازگر ITS1/ITS4 برای تکثیر ناحیه ITS-rDNA (White *et al*.,1990) توسط دستگاه ترموسایکلر (Peqstar 2x, Peqlab, Germany) انجام شد. در این مطالعه از مخلوط آماده-ی PCR (Ampliqon, Denmark) شامل dNTPs، آنزیم *Taq* DNA Polymerase، $MgCl_2$ و بافرPCR استفاده شد. برنامه حرارتی PCR جهت تکثیر ناحیه ژنومی rDNA-ITS، بر اساس روش White *et al*. (1990) انجام شد. جهت تخمین اندازه محصولات تکثیر شده از نشانگر اندازه DNA یک کیلوبازی (Gene Ruler TM 1Kb DNA Ladder به‌شماره SM0313) ساخت شرکت آلمانی MBI Fermentas استفاده شد. ژل آگارز ۰/۸ درصد، تهیه و سپس تانک الکتروفورز به دستگاه تأمین کننده نیروی الکتریکی (Labnet midi, Labnet power supply, USA) با ولتاژ ۹۰ ولت به‌مدت ٦۰ دقیقه متصل شد. عکس‌برداری با استفاده از دستگاه Gel Documentation (E-Box CX5, Vilber Lourmar, France) انجام شد. محصولات تکثیر شده، برای خالص‌سازی و تعیین‌توالی نوکلئوتیدی به شرکت میکروسینث (Microsynth, Switzerland) از طریق شرکت توپاز ژن فرستاده شد. بعد از دریافت فایل ab1 قطعات تعیین‌توالی شده، کروماتوگرام مربوط به توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار Finch TV 1.4 مشاهده و ارزیابی شد. ارزیابی تشابه توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI GenBank) با استفاده از ابزار جستجوی BLAST انجام شد. توالی‌ها با نرم‌افزار BankIt در بانک ژن ذخیره شدند و به‌ازای هر توالی، یک شماره دسترسی[13] دریافت شد.

تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه (آزمون کشت متقابل) و پنج تکرار (آزمون گلخانه، هر تکرار شامل ۱۰ گیاهچه) انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. برای نرمال کردن داده‌ها، از رابطه $(Y+0.5)^{1/2}$ استفاده شد ولی اعداد اصلی در جداول نمایش داده شد. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

نتایج

جداسازی قارچ‌های اندوفیت

تعداد ۱۷٤٦ جدایه قارچی اندوفیت به‌دست آمده از مزارع برنج مازندران و گیلان ابتدا بر اساس صفات ریخت شناختی (شامل رنگ سطح و پشت پرگنه، شکل و سرعت رشد پرگنه و مشخصات میکروسکوپی) به گروه‌هایی (Morphotypes) تقسیم شدند. در نهایت، ٤٦ جدایه (۱۰ جدایه از برگ، ۱۳ جدایه از ریشه، ۱۰ جدایه از ساقه و ۱۳ جدایه از غلاف) برای مطالعات آزمایشگاهی انتخاب شدند که در میان آن‌ها، ۳٤ جدایه قارچی اسپورزا و ۱۲ جدایه عقیم بودند.

11. Carnation leaf agar (CLA)
12. Synthetic nutrient poor–agar (SNA)

13. Accession number [13]

اثر آنتاگونیستی قارچ‌های اندوفیت در آزمایشگاه

نتایج تجزیه واریانس صفات مقادیر رشد میسلیومی و درصد ممانعت از رشد بیمارگر، نشان دادند که اثر تیمار در این آزمون در سطح احتمال یک درصد برای هر دو صفت معنی‌دار است. مقایسه میانگین تیمارهای آزمایش نشان داد که رشد میسلیومی و درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند. همه ٤٦ جدایه قارچ اندوفیت مورد آزمایش پس از ١٤ روز، رشد قارچ *F. fujikuroi* را در روش کشت متقابل کم و بیش مهار کردند (١٣/٣٤ تا ٧٤/٢٨ درصد) و در گروه‌های مختلف آماری قرار گرفتند. ٤٤ جدایه اندوفیت هاله بازدارندگی (Inhibition zone) ایجاد کردند و دو جدایه NR-S118 و NR-R302 روی پرگنه *F. fujikuroi* رشد نمودند (Overgrowth) و مانع از رشد قارچ بیمارگر شدند (شکل ١).

شکل ١- آزمون کشت متقابل قارچ‌های اندوفیت و *Fusarium fujikuroi* در تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA. **A**- رشد سویه NR-S118 *Neoscytalidium* sp. روی پرگنه قارچ بیمارگر، **B**- ایجاد هاله بازدارندگی توسط سویه NR-SH321 *Chaetomium globosum* و **C**- شاهد (*Fusarium fujikuroi* F257 به تنهایی).

Fig. 1. Dual culture test between fungal endophytes and *Fusarium fujikuroi* in Petri dishes containing PDA. **A**. Overgrowth of *Neoscytalidium* sp. NR-S118 strain on pathogen colony, **B**. Inhibition zone produced by *Chaetomium globosum* NR-SH321 strain and **C**. Control (*Fusarium fujikuroi* F257 alone).

کم‌ترین میزان رشد میسلیومی قارچ بیمارگر در تیمارهای NR-S118، NR-R302 و NR-SH501 مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد و این سه سویه بیش از ٧٠ درصد باعث کاهش رشد میسلیومی *F. fujikuroi* شدند. علاوه بر آن، سه سویه NR-S520، NR-R531 و NR-L243 بیشتر از ٦٠ درصد از رشد قارچ بیمارگر ممانعت کردند که اختلاف معنی‌داری میان آن‌ها وجود نداشت. همچنین، هشت سویه قارچ اندوفیت بین ٥٠ تا ٦٠ درصد باعث بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر شدند و اختلاف معنی‌دار آماری بین آن‌ها دیده نشد (جدول ١).

اثرجدایه های منتخب در کنترل بیماری درگلخانه

نتایج تجزیه واریانس صفت درصد وقوع بیماری پوسیدگی طوقه در گلخانه نشان داد که اثر تیمار روی این صفت در سطح یک درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان داد که تیمارها از نظر تأثیر روی وقوع بیماری در سطح یک درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند (جدول ٢). از ١٧ سویه اندوفیت مورد آزمایش، ١٥ سویه، بیماری پوسیدگی طوقه را از ٦١/٥٤ تا ٩٧/٤٣ درصد کنترل کردند و میزان بیماری در این تیمارها به‌همراه قارچکش شیمیایی با شاهد تیمار نشده اختلاف معنی‌دار آماری نداشت. در این میان، دو سویه NR-SH321 و NR-R688 به‌میزان دو درصد، هشت سویه NR-L182، NR-L243، NR-L645، NR-R193، NR-R302، NR-SH252، NR-SH502 و NR-SH665 بین شش تا ١٠ درصد، سه جدایه NR-S118، NR-S161 و NR-SH501 بین ١٢ تا ١٤ درصد و دو جدایه NR-S28 و NR-R531 به‌ترتیب ٢٢ و ٣٠ درصد موجب بروز بیماری شدند (جدول ٢). درصد وقوع بیماری در شاهد بیمار ٧٨ درصد، شاهد تیمار نشده ١٤ درصد و قارچ‌کش شیمیایی شش درصد بود.

اثر قارچ‌های اندوفیت بر رشد گیاه

نتایج تجزیه واریانس شاخص‌های رشد شامل ارتفاع گیاهچه، طول ریشه، وزن تر ساقه، وزن خشک ساقه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه در گلخانه نشان داد که اثر تیمار روی همگی این صفات در سطح یک درصد معنی‌دار است. نتایج مقایسه میانگین‌ها نشان دادند که تیمارها از نظر تأثیر روی همه شش شاخص رشدی مذکور در سطح یک درصد با یکدیگر تفاوت معنی‌دار دارند (جدول ٢). سویه‌های NR-L645، NR-L182 و NR-S161 در سه پارامتر و سویه‌های NR-L118 و NR-R193 در دو پارامتر، نسبت به‌شاهد تیمار

نشده افزایش معنی‌دار نشان دادند. سویه‌های NR-SH321، NR-R193 و NR-S507 باعث بیشترین افزایش معنی‌دار پارامتر طول ریشه نسبت به شاهد تیمار نشده شدند. هیچ یک از تیمارهای اندوفیت باعث افزایش معنی‌دار ارتفاع نشاء در مقایسه با شاهد تیمار نشده، نشدند (جدول ۲).

جداسازی مجدد قارچ‌های اندوفیت در محیط‌های WA و MEA انجام شد و حضور مجدد همان گونه‌های مایه‌زنی شده به‌صورت اندوفیت در گیاه برنج اثبات شد.

شناسایی قارچ‌های اندوفیت مؤثر

سیزده جدایه برتر که در آزمون گلخانه بیشترین کنترل شدت بیماری پوسیدگی طوقه را نشان دادند، بر اساس خصوصیات ریخت‌شناختی و مولکولی، مورد شناسایی قرار گرفتند. گونه‌های شناسایی شده به‌همراه سایر مشخصات هر سویه شامل درصد کنترل بیماری، اندام گیاهی، رقم برنج و مکان جداسازی و نیز شماره دسترسی بانک ژن (مربوط به ناحیه rDNA-ITS) در جدول ۳ نمایش داده شده است.

جدول ۱- تأثیر قارچ‌های اندوفیت جداسازی شده از گیاه برنج روی رشد میسلیومی *Fusarium fujikuroi* عامل پوسیدگی طوقه برنج.

Table 1. Effect of endophytic fungi obtained from rice plants on mycelial growth of *Fusarium fujikuroi*, the Bakanae disease pathogen.

Treatment	Mycelial growth (mm)	Inhibition (%)	Treatment	Mycelial growth (mm)	Inhibition (%)
Control*	70.00 a	-	NR-S28	33.00 qrs	52.86 efghi
NR-L86	53.33 cde	23.81 vw	NR-S50	41.33 jklm	40.95 nop
NR-L143	39.33 klmno	43.81 lmnop	NR-S118	20.67 x	70.48 ab
NR-L182	36.33 opqr	48.09 hijkl	NR-S161	38.67 lmno	44.76 klmnop
NR-L184	43.33 hij	38.09 pqr	NR-S207	33.00 qrs	52.86 efghi
NR-L243	27.00 tuv	61.43 cd	NR-S361	53.00 cde	24.28 uvw
NR-L285	37.67 mnop	46.19 jklmn	NR-S451	36.67 opq	47.62 hijklm
NR-L581	43.00 hijk	38.57 pqr	NR-S507	29.67 st	57.62 def
NR-L631	54.33 cd	22.38 vw	NR-S520	26.00 uv	62.86 cd
NR-L645	32.67 rs	53.34 efgh	NR-S661	40.67 jklmn	41.91 mnop
NR-L712	40.00 jklmno	42.86 lmnop	NR-SH155	34.67 pqr	50.48 ghijk
NR-R193	34.33 pqr	50.95 fghijk	NR-SH180	46.00 gh	34.29 rs
NR-R302	21.00 wx	70.00 ab	NR-SH252	30.00 st	57.14 defg
NR-R322	41.00 jklmn	41.43 mnop	NR-SH265	42.33 hijkl	39.52 opqr
NR-R410	52.33 cde	25.24 uv	NR-SH312	45.67 ghi	34.76 qrs
NR-R412	51.33 de	26.66 uv	NR-SH321	41.33 jklm	40.95 nop
NR-R458	55.67 c	20.47 w	NR-SH457	52.67 cde	24.76 uv
NR-R459	37.33 nop	47.62 hijklm	NR-SH501	18.00 x	74.28 a
NR-R508	60.67 b	13.34 x	NR-SH502	40.67 jklmn	41.91 mnop
NR-R531	24.33 vw	62.24 bc	NR-SH503	50.00 ef	28.57 tu
NR-R622	33.33 qrs	52.38 efghij	NR-SH629	52.67 cde	24.76 uv
NR-R650	42.00 ijkl	40.00 opq	NR-SH665	47.33 fg	32.38 st
NR-R688	33.00 qrs	52.86 efghi	NR-SH778	42.33 hijkl	39.52 opqr
NR-R816	28.67 tu	50.05 cde			

در هر ستون میانگین‌هایی که یک حرف مشترک دارند، بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند. * قارچ بیمارگر (*Fusarium fujikuroi* F257)

Values followed by the same letter are not statistically significantly different ($P \leq 0.01$) according to Duncan's multiple range test. * Fungal pathogen (*Fusarium fujikuroi* F257)

جدول ۲- تأثیر قارچ‌های اندوفیت روی درصد وقوع پوسیدگی طوقه، ارتفاع گیاهچه، طول ریشه، وزن تر ساقه، وزن خشک ساقه، وزن تر ریشه و وزن خشک ریشه در شرایط گلخانه.

Table 2. Effect of fungal endophytes on Bakanae incidence, seedling height, root length, shoot wet weight, shoot dry weight, root wet weight and root dry weight under greenhouse conditions

Treatment	Disease incidence (%)	Seedling height (cm)	Root length (cm)	Shoot wet weight (g)	Shoot dry weight (g)	Root wet weight (g)	Root dry weight (g)
Inoculated control	78.00 a	23.57 ab	3.09 efd	0.56 fg	0.17 d	0.09 fgh	0.013 ij
Non-inoculated control	14.00 bcd	24.85 ab	3.40 cde	0.65 cde	0.20 c	0.11 def	0.017 hi
Triflumizole	6.00 cd	17.64 c	3.91 abc	0.37 i	0.05 h	0.07 ghi	0.011 ij
NR-L182	8.00 bcd	27.72 a	3.67 abcd	0.75 b	0.10 e	0.19 a	0.042 b
NR-L243	6.00 cd	23.85 ab	2.84 ef	0.67 cd	0.07 fg	0.15 bcd	0.027 f
NR-L645	6.00 cd	27.97 a	3.51 cd	0.75 b	0.31 a	0.13 bcde	0.038 bcd
NR-R193	8.00 cd	26.61 a	4.19 ab	0.85 a	0.09 ef	0.11 efg	0.024 fgh
NR-R302	8.00 cd	24.71 ab	3.32 cdef	0.66 cd	0.09 ef	0.12 bcdef	0.024 fgh
NR-R531	30.00 b	23.93 ab	3.49 cde	0.46 h	0.19 cd	0.11 efg	0.017 ghi
NR-R688	2.00 d	26.56 a	3.45 cde	0.65 cde	0.10 ef	0.11 efg	0.024 fgh
NR-S28	22.00 bc	23.76 ab	2.73 f	0.60 def	0.08 ef	0.09 fgh	0.015 ij
NR-S118	12.00 bcd	24.82 ab	3.54 bcd	0.64 cdef	0.09 ef	0.15 bc	0.031 efd
NR-S161	14.00 bcd	27.04 a	3.65 abcd	0.71 bc	0.23 b	0.16 b	0.041 bc
NR-S507	66.00 a	21.82 b	4.17 ab	0.27 j	0.08 efg	0.06 ih	0.008 j
NR-S520	84.00 a	16.32 c	3.24 cdef	0.15 k	0.05 gh	0.05 i	0.018 ghi
NR-SH252	10.00 bcd	27.10 a	3.65 abcd	0.62 def	0.20 c	0.14 bcde	0.058 a
NR-SH321	2.00 d	24.78 ab	4.25 a	0.59 def	0.09 ef	0.09 fgh	0.024 fg
NR-SH501	14.00 bcd	24.41 ab	3.39 cde	0.46 h	0.02 i	0.12 cdef	0.035 cde
NR-SH502	10.00 bcd	24.14 ab	3.83 abc	0.50 gh	0.07 fg	0.11 def	0.031 ef
NR-SH665	10.00 bcd	26.46 a	3.84 abc	0.59 efg	0.08 ef	0.09 fgh	0.028 ef

*: در هر ستون میانگین‌هایی که یک حرف مشترک دارند، بر اساس آزمون دانکن در سطح یک درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

Values followed by the same letter are not statistically significant difference ($P \leq 0.01$) according to Duncan's multiple range test

جدول ۳- مشخصات قارچ‌های اندوفیت مؤثر در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در شرایط گلخانه.

Table 3. Characteristics of effective fungal endophytes to control Bakanae disease of rice in greenhouse condition.

Strain	Species	Tissue	Cultivar	Efficacy (%)	Location	GPS coordinates	Gen Bank Accession Numbers (rDNA-ITS)
NR-L182	*Microdochium bolleyi*	leaf	local	89.74	Rudsar, Guilan	N: 37º 8' 9" E: 50º 16' 26"	MN338379
NR-L243	*Penicillium* sp.	leaf	improved	92.30	Bahnamir, Mazandaran	N: 36º 40' 27" E: 52º 47' 19"	MN453402
NR-L645	*Fusarium* sp.	leaf	local	92.30	Sorkhrud, Mazandaran	N: 36º 39 '9" E: 52º 22' 44"	MN453403
NR-R193	*Chaetomium globosum*	root	local	89.74	Rudsar, Guilan	N: 37º 8' 9" E:50º 16' 26"	MN338363
NR-R302	*Nigrospora oryzae*	root	local	89.74	Babol, Mazandaran	N: 36º 22' 57" E: 52º 43' 17"	MN338358
NR-R688	*Chaetomium globosum*	root	local	97.43	Rasht, Guilan	N: 37º 16' 93" E: 49º 45' 14"	MN338361
NR-S118	*Neoscytalidium* sp.	stem	local	84.61	Sorkhrud, Mazandaran	N: 36º 39' 9" E: 52º 22' 44"	MN453404
NR-S161	*Microdochium bolleyi*	stem	local	82.05	Amol, Mazandaran	N: 36º 31' 17" E: 52º 27' 47"	MN338380
NR-SH252	*Chaetomium globosum*	sheath	improved	87.18	Bahnamir, Mazandaran	N: 36º 40' 27" E: 52º 47'19"	MN338360
NR-SH321	*Chaetomium globosum*	sheath	improved	97.43	Bahnamir, Mazandaran	N: 36º 38' 19" E: 52º 46' 45"	MN338362
NR-SH501	*Nigrospora* sp.	sheath	local	82.05	Babol, Mazandaran	N: 36º 33' 2" E: 52º 42' 37"	MN453405
NR-SH502	*Chaetomium globosum*	sheath	local	87.18	Babol, Mazandaran	N: 36º 33' 2" E: 52º 42' 37"	MN338365
NR-SH665	*Chaetomium globosum*	sheath	improved	87.18	Babol, Mazandaran	N: 36º 37' 2" E: 52º 13' 23"	MN453401

بحث

با توجه به اثرات مخرب ایجاد شده توسط سموم شیمیایی و مزایای کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی و تمایل دولت‌ها و مردم برای استفاده از محصولات کشاورزی ارگانیک، امروزه تلاش بر این است تا از سموم شیمیایی کمتری در کشاورزی استفاده شود. روش کنترل بیولوژیک به‌عنوان جزئی از مدیریت تلفیقی آفات در کشاورزی پایدار ضروری بوده و با رشد آگاهی جامعه در خصوص مشکلات زیست‌محیطی و ایمنی غذایی ناشی از کاربرد آفتکش‌های شیمیایی و به لطف پیشرفت‌های فنی قابل توجه در زمینه تولید و تجاری‌سازی آفتکش‌های میکروبی، کاربرد آن‌ها به‌عنوان جایگزین‌های بی‌خطر و مؤثر، رواج بیشتری یافته و چشم‌انداز روشنی را در این زمینه به‌وجود آورده است (Glare & Moran-Diez, 2016). اندوفیت‌ها به فراوانی در طبیعت وجود دارند و برخی از آن‌ها باعث افزایش مقاومت گیاهان میزبانشان به آفات و بیماری‌ها، افزایش تحمل به تنش‌های محیطی و نیز افزایش رشد می‌شوند (Wani *et al*., 2015). به‌همین دلایل، علاقه زیادی برای کاربرد اندوفیت‌ها در کشاورزی به‌وجود آمده است (Backman and Sikora 2008). براساس مطالعات انجام شده در دنیا، برنج مانند گیاهان دیگر، میزبان میکروارگانیسم‌های اندوفیت فراوانی است که به‌صورت همزیست، مزایایی را برای گیاه مانند مقاومت در برابر عوامل بیماری‌زا و افزایش رشد و عملکرد به‌همراه دارد. نتایج تحقیق حاضر هم نشان داد که قارچ‌های اندوفیت از همه اندام‌های گیاهی برنج جداسازی شده و توانایی بالایی در کنترل پوسیدگی طوقه، به‌عنوان یکی از بیماری‌های مهم برنج داشته و نیز باعث افزایش پارامترهای رشدی نشاهای برنج شدند.

داشتن یک خزانه سالم با نشاهای بدون آلودگی و قوی، امتیاز بالایی برای شالیکاران برای شروع فصل زراعی برنج محسوب می‌شود. از طرف دیگر، بیماری پوسیدگی طوقه به‌دلیل بذر زاد بودن باعث از بین رفتن نشاها در خزانه شده و یکی از چالش‌های اصلی در تهیه خزانه برنج محسوب می‌شود. بنابراین، کنترل این بیماری به‌همراه افزایش رشد نشاها مزیت مهمی در مدیریت خزانه بوده و عدم انتقال بیماری به‌مزرعه را هم تا حدود زیادی تضمین می‌نماید. در این مطالعه اندوفیت‌های قارچی ساکن در برگ، ساقه، غلاف و ریشه برنج که از ارقام بومی و پُرمحصول در شالیزارهای شمال کشور به‌دست آمدند، ابتدا در آزمایشگاه علیه قارچ بیمارگر، *F. fujikuroi* غربال شدند. مطابق نتایج به‌دست آمده تقریباً همه قارچ‌های اندوفیت مورد بررسی توانایی مهار رشد بیمارگر را با درجات مختلف دارا بودند. در این میان، سویه‌های متعلق به‌جنس‌های *Nigrospora* Zimm. و Crous & *Neoscytalidium* Slippers موفق‌تر عمل کرده و بیش از ۷۰ درصد موجب بازدارندگی از رشد میسلیومی بیمارگر شدند. Tian *et al.* (2004) هم گزارش کردند که قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاه برنج تا حدود ٦٠ درصد از رشد قارچ *Fusarium moniliforme* Sheld. در شرایط آزمایشگاه، ممانعت به‌عمل آوردند.

از تعداد ۱۷ سویه اندوفیت منتخب، ۱۳ سویه وقوع بیماری پوسیدگی طوقه در نشاهای برنج را به‌میزان ۹۷-۸۲ درصد در گلخانه کنترل کردند که با اثر قارچکش شیمیایی اختلاف معنی‌دار نداشتند. نکته قابل توجه این که، هم بالاترین مقادیر کنترل بیماری (۹۷/٤ درصد) مربوط به دو سویه از گونه *Chaetomium globosum* Kunze بود و هم بیشترین تعداد سویه‌های مؤثر به این گونه تعلق داشت (شش سویه). پس از آن، گونه *Microdochium bolleyi* (Sprague) de Hoog & Herm.-Nijh. و جنس *Nigrospora* با دو سویه و جنس‌های *Fusarium*، Link *Penicillium* Link و *Neoscytalidium* هر کدام با یک سویه در میان ۱۳ سویه برتر در کنترل وقوع بیماری پوسیدگی طوقه قرار داشتند.

القای مقاومت در گیاه میزبان با تولید ترکیبات زیستی مختلف، مایکوپارازیتیسم، تولید آنتی بیوتیک‌ها، رقابت و سایر موارد از مکانیسم‌های دخیل در کنترل بیماری‌های گیاهی

توسط اندوفیت‌ها می‌باشد (Blumenstein *et al*., 2015; Martínez-Arias *et al*., 2018). بسیاری از گونه‌های *Chaetomium* این پتانسیل را دارند که به‌عنوان عامل کنترل بیولوژیکی از طریق رقابت (برای بستر و مواد غذایی)، مایکو پارازیتیسم، آنتی‌بیوز یا ترکیب‌های مختلف از این مکانیسم‌ها، باعث جلوگیری از رشد قارچ‌های بیمارگر شوند (Marwah *et al*., 2007; Zhang and Yung, 2007). گونه‌های این قارچ می‌توانند با تولید متابولیت‌های ثانویه به‌عنوان آلکالوئیدها اثرات بیماری‌های قارچی را در میزبان کاهش دهند (Paulinamaya *et al*., 2016). گونه *C. globosum* یکی از گونه‌های غالب اندوفیت گیاه برنج معرفی شده است که فعالیت زیاد آنتاگونیستی علیه چندین قارچ بیمارگر گیاهی در آزمایشگاه نشان داده است (Naik *et al*., 2009). نقش مؤثر جدایه‌های *C. globosum* اندوفیت در کنترل بیماری‌های لکه برگی جو (Moya *et al*., 2016) و لکه قیری گندم (Larran *et al*., 2016) گزارش شده است. در مطالعه‌ای تأثیر *C. globosum* در کاهش خسارت ناشی از مرگ‌گیاهچه و پوسیدگی بذرهای مختلف ناشی از *Fusarium* sp. گزارش شده است (Aggarwal *et al*., 2004). پوشش بذر ذرت، جو دو سر و جو با جدایه‌های *C. globosum* از اثر پژمردگی گیاهچه ناشی از *Fusarium* spp. جلوگیری کرده است (Kommedahl and Mew, 1975). همچنین، طی تحقیقی، اثر مثبت گونه های قارچ *Chaetomium oxysporum* Schltdl بر قارچ خاک‌زاد *Fusarium* اثبات شده است (Tomilova *et al*., 2006). ژنوم *C. globosum* به‌طور گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده است که حاوی بسیاری از ژن‌های مفید می باشد که به این قارچ اجازه می‌دهد تا با بسیاری از محیط‌های مختلف (خاک، آب، بافت‌های مرده، داخل گیاه و غیره) سازگار شود (Ashwini, 2019). مطالعات نشان داده است که *Microdochium bolleyi* یک قارچ اندوفیت موفق در گیاهان به‌ویژه تیره گندمیان مانند گندم، جو، جو دو سر و انواع چمن‌ها است (Sieber and Gruning, 2013). دو جدایه از قارچ اندوفیت *M. bolleyi* جدا شده از ریشه جو، باعث کنترل مؤثر بیماری پاخوره و افزایش معنی‌دار شاخص‌های رشد جو شده‌اند (Shadmani *et al*., 2018). همچنین، *M. bolleyi* یکی از قارچ‌های اندوفیت مؤثر در کنترل مرگ گیاهچه ناشی از *Fusarium graminearum* Schwabe در گندم (Gdanetz and Trail, 2017) و سایر بیمارگرهای مختلف گیاهان از جمله *Fusarium culmorum* (Wm.G. Sm.) Sacc. گزارش شده است (Duczek, 1997; Knudsen *et al*., 1995). قارچ (Berk. & Petch) *Nigrospora oryzae* Broome به‌عنوان قارچ اندوفیت از ریشه، ساقه و بذر برنج جداسازی شده است (Fisher and Petrini, 1992; Naik *et al*., 2009). چندین گونه *Fusarium* به‌عنوان اندوفیت از گیاهان مختلف از جمله برنج جداسازی شده‌اند (Petrovic *et al*. 2013; Pili *et al*., 2016) و جنس *Fusarium* به‌عنوان جنس غالب اندوفیت از گیاه برنج گزارش شده است (Tian *et al*., 2004; Zakaria *et al*., 2010). جدایه‌های *Fusarium* به‌دست آمده از گیاه برنج فعالیت آنتاگونیستی علیه قارچ‌های *Magnaporthe grisea*، *Rhizoctonia solani* Kühn و *Fusarium moniliforme* در شرایط آزمایشگاهی نشان دادند (Tian *et al*., 2004). گزارشات متعددی وجود دارند که نشان می‌دهند که جنس *Penicillium*، جنس غالب اندوفیت گیاه برنج است (Tian *et al*., 2004; Naik *et al*., 2009; Vallino *et al*., 2009; Zakaria *et al*., 2010). امّا تاکنون خواص بیوکنترل جدایه‌های آن مطالعه نشده و این اولین گزارش مبنی بر توانایی بیوکنترل جنس *Penicillium* به‌عنوان قارچ اندوفیت گیاه برنج می‌باشد. جنس *Neoscytalidium* بیشتر به‌عنوان بیمارگر گیاهی (Ray *et al*., 2010; Nouri *et al*., 2018; Alidadi *et al*., 2019) و نیز به‌عنوان قارچ اندوفیت (Pavlic & Wingfield, 2008; Abdollahi Aghdam and Fotouhifar, 2017) درختان گزارش شده است. همچنین، جدایه‌ای از (Penz.) *N. dimidiatum* Crous & Slippers به‌دست آمده از یک گیاه علفی به‌عنوان یک قارچ اندوفیت با فعالیت ضد قارچی معرفی شده است (Abdel-Motaal *et al*., 2010). این اولین

گزارش از جنس *Neoscytalidium* به‌عنوان قارچ اندوفیت گیاه برنج و عامل کنترل بیماری است.

قارچ‌های اندوفیت علاوه بر القای مقاومت در گیاهان میزبان به بیماری‌ها و تنش‌های محیطی، با مکانیسم‌های مختلف باعث افزایش رشد و عملکرد محصول هم می‌شوند که این امر در گیاه برنج هم نشان داده شده است (Wijesooriya and Deshappriya, 2016). در این مطالعه، از بین ۱۷ قارچ اندوفیت، پنج سویه شامل دو سویه *M. bolleyi*، یک سویه *Fusarium* sp. و دو سویه *C. globosum* بیشترین تأثیر را در افزایش شاخص‌های رشد نشاهای برنج در شرایط گلخانه نشان دادند. در مطالعات انجام شده دیگر هم اثر قارچ‌های اندوفیت جدا شده از گیاهان مختلف در بهبود رشد گیاه گزارش شده است. دو قارچ اندوفیت Raper & Thom *Aspergillus caespitosus* و *Phoma* sp. جدا شده از گیاه *Moringa peregrina* (Forssk.) Fiori با تولید جیبرلین باعث بهبود رشد گیاه برنج شده‌اند (Latifkhan *et al*., 2014). چندین قارچ اندوفیت جدا شده از گیاهان تیره گندمیان، به‌عنوان قارچ‌های بهبود دهنده رشد گیاه برنج معرفی شده‌اند (Kandar *et al*., 2018). قارچ‌های *Trichoderma* sp. و *Chaetomium* sp. نیز به‌عنوان قارچ اندوفیت که باعث افزایش شاخص‌های رشد برنج شدند، گزارش شده‌اند (Priyadarshani *et al*., 2018). نتایج این تحقیق با نتایج مطالعات مشابه روی برنج مطابقت دارد (Paguia and Valentino, 2016; Potshangham *et al*., 2017; Lalngaihowni *et al*., 2018; Muhammad Hamnayyun, 2018; Sopiani *et al*., 2018).

مطالعات تکمیلی در زمینه بررسی کنترل بیماری پوسیدگی طوقه در شرایط طبیعی خزانه و مزرعه، مکانیسم‌های کنترل و برهمکنش اندوفیت‌های مؤثر با گیاه میزبان، بررسی توان اندوفیت‌های برتر در کنترل سایر بیماری‌های مهم برنج و نیز مطالعات کاربردی در زمینه تکثیر و فرمولاسیون سویه‌های امیدبخش این پژوهش پیشنهاد می‌شود. می‌توان امیدوار بود که در آینده با انجام مطالعات تکمیلی، سویه‌های قارچی اندوفیت معرفی شده در این تحقیق بتواند برای مدیریت بیماری مهم پوسیدگی طوقه برنج مورد استفاده واقع شود و از خسارت آن در خزانه و شالیزار بکاهد.

سپاسگزاری

از پرسنل بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی معاونت مؤسسه تحقیقات برنج کشور در مازندران به ویژه آقای دکتر وحید خسروی به خاطر همکاری در انجام تحقیقات گلخانه‌ای این پژوهش، تقدیر و تشکر می‌شود.

References

ABDEL-MOTAAL, F., S.M. MORTADA, A.EL. SOAD. A. MAJDI and I. C. SHIN, 2010. Antifungal activity of endophytic fungi isolated from Egyptian henbane (*Hyscyamus muticus* L.), Pakistan Journal of Botany, 42(4): 2883–2894.

ABDOLLAHI AGHDAM, SH. and KH.B. FOTOUHI FAR, 2017. Identification of some endophytic fungi of cherry trees (*Prunus arium*) in Iran, Iranian Journal of Plant Protection Science, 48(1): 43–57. (in Persian with English summary).

AGGARWAL, R., A.K. TIWARI, K.D. SRIVASTAVA, and D.V. SINGH, 2004. Role of antibiosis in the biological control of spot blotch (*Cochliobolus sativus*) of wheat by *Chaetomium globosum*, Mycopathologia, 157(14): 369–377.

ALIDADI, A., M. KOWSARI, M. JAVAN-NIKKHAH, G.R. SALEHI JOUZANI, and M. EBRAHIMI RASTAGHI, 2019. New pathogenic and endophytic fungal species associated with Persian oak in Iran, European Journal of Plant Pathology, 155(3): 1017–1035.

ALY, A.H., A. DEBBAB, and P. PROKSCH, 2011. Fungal endophytes: Unique plant inhabitants with great promises, Applied Microbiology and Biotechnology, 90(6): 1829–1845.

ARNOLD, E.A, 2007. Understanding the diversity of foliar endophytic fungi: progress, challenges, and frontiers, Fungal Biology Reviews, 21(2-3): 51–66.

ASWINI, C., 2019. A review on *Chaetomium globosum* is versatile weapons for various plant pathogens, Journal of Pharmocognosy and Phytochemistry, 8(2): 946–949.

ATUGALA, D.M. and N. DESHAPPRIYA, 2015. Effect of endophytic fungi on plant growth and blast disease incidence of two traditional rice varieties, Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, 43(2): 173–187.

BAKMAN. P.A., and R.A. SIKORA, 2008. Endophytes: An emerging tool for biological control, Biological Control, 46(1): 1–3.

BASHYAL, B.M., R. AGGARWAL, S. SHARMA, S. GUOTA, K. RAWAT, D. SINGH, A. K. SINGH, and S.K. GOPALA, 2015. Occurrence, identification and pathogenicity of *Fusarium* species associated with bakanae disease of basmati rice in India, European Journal Plant Pathology, 144(2): 457–466.

BLUMENSTEIN, K., B.R. ALBERECTSEN, J.A. MARTIN, M. HULTBERG, T.N. SIEBER, M. HELANDER, and J. WITZELL, 2015. Nutritional niche overlap potentiates the use of endophytes in biocontrol of a tree disease, BioControl, 60(5): 655–667.

CARTER, L.L.A., J.F. LESLIE, and R.K. Webster, 2008. Population structure of *Fusarium fujikuroi* from California rice and water grass, Phytopathology, 98(9): 992–998.

CROUS, P.W., B. SLIPPERS, M.J. WINGFIELD, J. RHEEDER, W.F.O. MARASAS, A.J.L. PHILIPS, A. ALVES, T. BURGESS, P. BARBER, and J.Z. GROENEWALD, 2006. Phylogenetic lineages in the *Botryosphaeriaceae*, Studies in Mycology, 55: 235–253.

DE HOOG, G.S., and E.J. HERMANIDES-NIJHOF, 1977. Survey of the black yeasts and allied fungi, Studies in Mycology, 15: 178-222.

DUBEY, S.C., V. SINGH, K. PRIYANKA, B.K. UPADHYAY, and B. SINGH, 2015. Combined application of fungal and bacterial bio-agents: together with fungicide and Mesorhizobium for integrated management of *Fusarium* wilt of chickpea, BioControl, 60(3): 413–424.

DUCZEK, L.J, 1997. Biological control of common root rot in barley by *Idriella bolleyi*, Canadian Journal of Plant Pathology, 19(4): 402–405.

ELLIS, M.B., 1971. Dematiaceous Hyphomycete, Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK, 608 pp.

FAETH, S.H. and W.F, FAGAN, 2002. Fungal endophytes: Common host plant symbionts but uncommon mutualists, Integrative and Comparative Biology, 42(2): 360–368.

FISHER, P.J. and O. PETRINI, 1992. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.), New Phytologist, 120(1): 137–143.

GDANETZ, K., and F. TRAIL, 2017. The wheat microbiome under four management strategies, and potential for endophytes in disease protection, Phytobiomes, 1(3): 158–168.

GLARE, T.R., and M.E. MORAN-DIES, 2016. Microbial-Based Biopesticides-Methods and Protocols, Springer Protocols, Humana Press, New York, NY. 224 pp.

HAMILTON, C.E., D.B. JAMES, J. LABBE, and X. YANG, 2016. Mitigating climate change through managing constructed microbial communities in agriculture, Agriculture, Ecosystem & Environment, 216: 304–308.

HORI, S., 1898. Researches on ‘Bakanae’ disease of the rice plant, Noji Shikenjo Seiski, (12): 110–119.

KANDAR, M., S. SUHANDONO, and N. PUGEG ARYANTHA. 2018, Growth promotion of rice plant by endophytic fungi, Journal of pure and applied Microbiology, 12(3): 1569–1577.

KATO, A., M. TAIJI, N. KANA, T. HIDEAKI, and T. TUHRU, 2012. Visualize interactions between the Bakanae disease pathogen *Gibberella fujikuroi* and the agent *Talaromyces* sp. KNB-422, Journal of General Plant Pathology, 78(1): 54–61.

KATOCH, P., A. KATOCH, M. PODEL, and SH. UPRETI, 2019. Bakanae of Rice: A serious disease in Punjab,

International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 8(5): 129–136.

KHOSRAVI, V., 2018. Biodiversity of *Fusarium* species associated with seeds on rice panicle in Iran. Ph.D. thesis in Plant Pathology, Collage of Agriculture and Natural Resources, Faculty of Agricultural Sciences and Engineering, 164 pp. (In Persian with English summary).

KOMMEDEHL, T., and I.C, MEW, 1975. Biocontrol of corn root infection in the field by seed treatment with antagonists, Phytopathology, 65(3): 296–300.

LAHLALI, R., and M. HIJRI, 2010. Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants, FEMS Microbiology Letters, 311(2): 152–159.

LALNGAIHAWMI, S., P. BANIK, GHAKRANO, and KHATEMENLA, 2018. Effect of rice fungal endophytes on seed germination and seedling growth of rice, International Journal of Current Microbiology, 7(4): 3653–3663.

LARRAN, S., M.R. SIMON, M.V. MORENO, M.P. SANTAMARINA SIURANA, and A. PERELLO, 2016. Endophytes from wheat as biocontrol agents against tan spot disease, Biological Control, 92: 17–23.

LATIFKHAN, A., M. WAGAS, J. HUSSAIN, A. AL-HARRASI, A. AL-RAWANDI, and KH. AL-HOSNI, 2014. Endophytes *Aspergillus caespitosus* LK12 and *Phoma* sp. LK13 of *Moringa peregrina* produce gibberellins and improve rice plant growth, Journal of Plant Interactions, 9(1): 731–737.

LESLIE, J.F., and B.A. SUMMERELL, 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual, Blackwell Publishing, Oxford, UK, 388. pp.

MARTINEZ-ARIAS. C., D. MACAYA-SANZ, and J. WITZELL, 2018. Enhancement of *Populus alba* tolerance to *Venturia tremulae* upon inoculation with endophytes showing *in vitro* biocontrol potential, European Journal of Plant Pathology, 153(4): 1031–1042.

MARWAH, R.G., M.O. FATOPE, M.L. DEADMAN, Y.M. AL-MAGBALI, and J. HUSBAND, 2007. Musanahol: a new aureonitol -related metabolite from a *Chaetomium* sp., Tetrahedron, 63(34): 8174–8180.

MAYERHOFER, M.S., G. KERNAGHAN, and K.A. HARPER, 2013. The effects of fungal root endophytes on plant growth: A meta-analysis, Mycorrhiza, 23(2): 119–128.

MIYAKE. T., A. KATO, H. TATEISHI, and T. ARIE, 2012. Mode of action of *Talaromyces* sp. KNB422, A biocontrol agent against rice seedling diseases, Journal of Pesticide Science, 37(1): 56–61.

MOSAVI, S.H., V. BABAEEZAD, B. SHARIFNABI, M.A. TAJIK GHANBARI, A. MASSAH and S.M. ALAVI, 2014. Induction of blast disease resistance in rice plants by endophyte fungus *Priformospora indica*, Iranian Journal of Plant Pathology, 153(3): 127–129. (In Persian with English summary).

MOYA, P., D. PEDEMONTE, S. AMENGUAL, M. E.E. FRANCO, and M.N. SISTERNA, 2016. Antagonism and modes of action of *Chaetomium globosum* species group, potential biocontrol agent to barley foliar diseases, The Bulletin of the Botanical Society of Argentina, 51(4): 569–578.

MUHAMMAD HAMAYUN, A., HUSSAIN, A. IQBAL, S. AFZALKHAN, and I.J. LEE, 2018. Endophytic fungus *Aspergillus japonicas* mediates host plant growth under normal and heat stress conditions, BioMed Research International, 1–11.

NAIK. B.S., J. SHASHIKALA, and Y.L. KRISHNAMURTHY, 2009. Study on the diversity of endophytic communities from rice (*Oryza sativa* L.) and their antagonistic activities *in vitro*, Microbiological Research, 164(3): 290–296.

NASSIMI. Z., and P. TAHERI, 2017. Endophytic fungus *Piriformospora indica* induced systemic resistance against rice sheath blight via affecting hydrogen peroxide and antioxidants, Biocontrol Science and Technology, 27(2): 252–267.

NOURI, M.T., D.P. LAWRENCE, M.A. YAGHMOUR, T.J. MICHAILIDES, and F.P. TROUILLAS, 2018. *Neoscytalidium dimidiatum* causing canker, shoot

blight and fruit rot of almond in California, Plant Disease, 102(8): 1638–1647.

OU, S.H., 1985. Rice Diseases. 2nd edition. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England, 380 pp.

PADASHT-DEHKAEI, F., 1993. Study on rice foot rot (*Gibberella fujikuroi*) in Guilan province. M.Sc. thesis, University of Tehran, (in Persian with English summary).

PAGUIA, E.F., and M.J.C. VALENTINO, 2016. Seed germination promoting activity of fungal endophytes in Rice (*Oryza sativa* L.) seeds, Asian Journal of Plant Science and Research, 6(4): 37–39.

PARK, W.S., H.W. CHOI, S.S. HAN, D. SHIN, H.K. SHIM, E.S. JUNG, S.W. LEE, and C.K. LIM, 2009. Control of bakanae disease of rice by seed soaking into the mixed solution of prochloraz and fludioxonil, Research in Plant Disease, 15(2): 94–100.

PAULINA, M., P. DEBROA, A. SUSANA, E.E. MARIO FRANCO, and N. MARINA SISTERNA, 2016. Antagonism and modes of action of *Chaetomium globosum* species group, potential biocontrol agent of barley foliar diseases**,** Boletin de la Sociedad Argentina de Botanica, 51(4):569–578.

PAVLIK, D., and J.M. WINGFIELD, 2008. Seven new species of the *Botryosphaeriaceae* from baobab and other native trees in Western Australia, *Mycologia*, 100: 851–866.

PETROVIC, T., L. BURGESS, I. COWIE, R. WARREN AND P. HARVEY, 2013. Diversity and fertility of *Fusarium sacchari* from wild rice (*Oryza australiensis*) in Northern Australia, and pathogenicity tests with wild rice, rice, sorghum and maize, European Journal of Plant Pathology, 136(4): 773–788.

PILI, N.N., S.C. FRANKA, T. KYND, B.A. MAKUMBA, R. SKILTON, M. MIBEY, R.K. MIBEY, and G. GHEYSEN, 2016. Analysis of fungal endophytes associated with rice roots from irrigated and upland ecosystem in Kenya, Plant and Soil, 405(1-2): 371–380.

PITT, J.I., 1988. A laboratory guide to common *Penicillium* species, 2nd ed. North Ryde, N.S.W.: CSIRO Division of Food Processing, 185 pp.

PORRAS-ALFARO, A., and P. BAYMAN, 2011. Emergent properties: endophytes and microbiomes, Annual Review of Phytopathology, 49, 291–315.

POTSHANGBAM, M., S. INDIRA, D. SAHOO, and A. STROBEL, 2017. Functional characterization of endophytic fungal community associated with *Oryza sativa* L. and *Zea mays* L., Frontiers in Microbiology, 8: 325–333.

PRIYADARSHANI, C.D.N., N. DESHAPPRIYA, and T.G.I. SANDAMALI, 2018. Effect of fungal endophytes of rice variety LD368 on growth and brown spot disease incidence of rice, Tropical Plant Research, 5(3): 292–302.

RAY, J. D., T.I, BURGESS and V.M. LANOISELET, 2010. First record of *Neoscytalidium dimidiatum* and *N. novaehollandiae* on *Mangifera indica* and *N. dimidiatum* on *Ficus carica* in Australia, Australasian Plant Disease Notes, 5: 48–50.

SHADMANI, L., S. JAMALI, and A. FATEMI, 2018. Biocontrol activity of endophytic fungus of barley, *Microdochium bolleyi*, against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, Mycologia Iranica, 5(1):7–14. (In Persian with English summary).

SIEBER, T.N., and C.R. GRUNIG, 2013. Fungal root endophytes. In: Eshel A., Beeckman T. (eds): Plant Roots –The Hidden Half, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, 38(1): 38–49.

SINGH, R. and S. SUNDER, 2012. Foot rot and bakanae of rice: an overview, Review of Plant Pathology, 5: 565–604.

SOPIANI, B., F. NADILLA, N. BAIDURI, and V. MARDINA, 2018. *In vitro* screening of endophytic fungi associated with mangroveas biofertilizer on the growth of black rice, IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, 420.

STROBEL. G.A., 2003. Endophytes as sources of bioactive products, Microbes and Infection. 5(6), 535–544.

SUADA, I.K., D.M.W.Y. SUHARTINI, N.P.L. SUNARIASIH, I.P.W. WIRAWAN, K.W. CHUN,

J.Y. CHA, and S. OHGA, 2012. Ability of endophytic fungi isolated from rice to inhibit *Pyricularia oryzae* – induced rice blast in Indonesia, Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University, 57(1): 51–53.

SUN, X., Q. DING. K.D. HYDE, and L.D. GUO, 2012. Community structure and preference of endophytic fungi of three woody plants in a mixed forest, Fungal Ecology, 5(5): 624–632.

TIAN, X.L., L.X. CAO, H.M. TAN, Q.G. ZENG, Y.Y. JIA, W.Q. HAN, and S.N. ZHOU, 2004. Study on the communities of endophytic fungi and endophytic *Actinomycetes* from rice and their antipathogenic activies *in vitro*, World Journal of Microbiology & Biotechnoligy, 20(3): 303–309.

TOMILOVO, O.G., and M.V. SHTERNASHI, 2006. The effect of a preparation from *Chaetomium* fungi on the growth of phytopathogenic fungi, Applied Biochemistry and Microbiology, 42(1): 76–80.

VALINO, M., D. GREPPI, M. NOVERO, P. BONFANTE and E. LUPOTTO, 2009. Rice root colonisation by mycorrhizal and endophytic fungi in aerobic soil, Annals of Applied Biology, 154(2): 195–204.

VON ARX, J.A., 1982. Notes on *Microdochium* and *Idriella*, Sydowia 34: 30-38.

VON ARX J.A., J. GUARRO and M.J. FIGUERAS, 1986. The ascomycete genus *Chaetomium*, Beihefte zur Nova Hedwigia, 84: 1–162.

WANI, Z.A., N. ASHRAF, T. MOHIUDDIN, and S. RIYAZ-UL-HASSAN, 2015. Plant-endophyte symbiosis, an ecological perspective, Applied Microbiology and Biotechnology, 99(7): 2955–2965.

WHIPPS, J.M., 2007. Complex multitrophic interactions in the plant environment can affect disease biocontrol, In: Proceedings of the XIV International Plant Protection Congress, Glasgow, Scotland, UK, 15-18 October, 432–433.

WHITE, T.J., T. BRUNS, S.LEE, and J.V. TAYLOR, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.), and PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Academic Press, New York, 315–322.

WIJESOORIYA, W. and N. DESHAPPRIYA, 2016. An inoculum of endophytic fungi for improved growth of a traditional rice variety in Sri Lanka, Tropical Plant Research, 3(3): 470–480.

YANG, C., C. HAMEL, V. VUJANOYIC, and Y. GAN, 2011. Fungicide: modes of action and possible impact on nontarget microorganisms, International Scholary Research Network, 1–8.

YUAN, Z.L., C.L. ZHANG, FU.C. LIN, and C.P. KUBICEK. 2010, Identity, Diversity, and Molecular Phylogeny of the Endophytic Mycobiota in the Roots of Rare Wild Rice (*Oryzae granulate*) from a Nature Reserve in Yunnan, China, Applied and Enviromental Microbiology, 76(5): 1642-1652.

YUAN, Z.L., Z.Z. SU, L.J. MAO, Y.Q. PENG, G.M. YANG, F.C. LIN, C.L. ZHANG, 2011. Distinctive endophytic fungal assemblage in stems of wild rice (*Oryza granulata*) in China with special reference to two species of *Muscodor* (*Xylarriaceae*), The Journal of Microbiology, 49(1): 15–23.

ZAKARIA, L., A.S. YAAKOP, B. SALLEH, and M. ZAKARIA, 2010. Endophytic fungi from paddy, Tropical Life Science Research, 21(1): 101–107.

ZHANG, H., and Q. YANG, 2007. Expressed sequence tags based identification of genes in the biocontrol agent *Chaetomium_cupreum*, Applied Microbiology and Biotechnology, 74(3): 650–658.

ZHONG, S., and B.J. STEFFENSON, 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*, Phytopathology, 91(5): 469–476.