دوفصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی
سال چهارم، شماره دوم، پاییز و زمستان 1395
صص 26-13

اثرات آنتاگونیستی گونه‌های مختلف تریکودرما در کنترل *Sclerotinia sclerotiorum* و مقایسه آن با قارچ‌کش‌های شیمیایی

حسین براری*[1]، علیرضا دلیلی[1]

تاریخ دریافت: 94/1/21 تاریخ پذیرش: 94/8/14

چکیده

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary یکی از عوامل مهم کاهش عملکرد بسیاری از محصولات مهم اقتصادی محصولات زراعی و باغی می‌باشد. بسیاری از روش‌های مرسوم در مدیریت بیماری موثر نیست. در این میان کنترل بیولوژیک با قارچ‌های آنتاگونیست، می‌تواند در کاهش بیماری چاره‌ساز باشد. در این پژوهش اثر آنتاگونیستی 14 جدایه بومی قارچ تریکودرما مربوط به چهار گونه مختلف برای کنترل قارچ بیمارگر *S. sclerotiorum* در شرایط *in vitro* با بررسی‌های کشت دوتایی، ترکیبات ضدقارچی فرار و غیرفرار تولید شده توسط آنتاگونیست‌ها، ارزیابی شد. بازدارندگی رشد میسلیوم‌های *S. sclerotiorum* به وسیله جدایه‌های تریکودرما در کشت دوتایی، ترکیبات فرار و غیرفرار بین 53/4-35/5، 33-0 و 100-0 درصد متغیر بود، در این میان *Trichoderma harzianum* (A10) بیش‌ترین تاثیر را در مهار رشد میسلیوم‌ها در کشت دوتایی و *T. harzianum* (A2 و A10) بیش‌ترین تاثیر را در مهار رشد میسلیوم‌ها با تولید مواد فرار و غیرفرار داشتند. که در نهایت آنتاگونیست T10 (*T. harzianum*) موثرترین جدایه در کنترل قارچ عامل بیماری درشرایط آزمایشگاه انتخاب شد. در بررسی سه قارچکش تیوفانات متیل، رورال‌تی‌اس و بنومیل در شرایط آزمایشگاه، مشاهده شد که قارچ‌کش تیوفانات متیل در غلظت 10 پی‌پی‌ام و دو قارچ‌کش دیگر در غلظت 100 پی‌پی‌ام توانستند به طور کامل مانع از رشد میسلیوم‌ها شوند. در بررسی مقایسه کنترل شیمیایی و بیولوژیکی در شرایط گلخانه، مشاهده شد که تیمار خاک با آنتاگونیست هشت روز قبل از آلودگی با قارچ بیمارگر، تاثیر بهتری حتی نسبت به کنترل شیمیایی دارد. این مطالعه نشان داده که استفاده از ترکیبات بیولوژیک در زمان مناسب جهت پیشگیری از وقوع این بیماری، نسبت به سموم شیمیایی از کارایی بیشتری برخوردار است.

واژه های کلیدی: تریکودرما، کنترل بیولوژیک، کنترل شیمیایی، اسکلروتینیا، قارچ‌کش.

---

[1]- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.
*- نویسنده مسئول مقاله: Hosseinbarari385@yahoo.com

مقدمه

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib) de Bary، یک بیمارگر گیاهی با دامنه میزبانی وسیع است که انتشار جهانی دارد. خسارت این بیمارگر گیاهی ممکن است به 100% نیز برسد (Adams and Ayers, 1973; Baniasadi *et al*., 2009; Beheshti *et al*., 2011). این قارچ سال‌ها به صورت سختینه در خاک بقاء می‌یابد و در حضور ترشحات ریشه گیاهان جوانه می‌زند و اگر به درستی کنترل نشود جمعیت سختینه‌ها در خاک افزایش می‌یابد که منجر به افزایش میزان بیماری می‌گردد (Johnson and Atallah, 2006).

مرسوم‌ترین روش کنترل این بیمارگر گیاهی استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی می‌باشد. با این حال این تکنیک فوق‌العاده پرهزینه است (Rocha and Oliveira, 1998) و همچنین منجر به مقاوم شدن قارچ‌ها و عدم تعادل زیست‌بوم به خاطر وجود باقی‌مانده سموم در محیط و به خطر افتادن سلامتی انسان‌ها و حیوانات می‌شود (Johnson and Atallah, 2006). کنترل بیولوژیک بیماری‌های خاک‌زاد می‌تواند روشی دیگر برای کاهش پوسیدگی ریشه محصولات مختلف باشد (Baniasadi *et al*., 2009; Bell et al., 1982; Benhamou and Chet, 1993; Cherif and Benhamou, 1990; Cooney and Lauren 1998; Dennis and Webster, 1971; Dubey and Suresh, 2006; Etebarian, 2006; Johnson and Atallah, 2006; Metcalf *et al*., 2004). بیش از 30 گونه قارچ و باکتری شناخته شده‌اند که برای قارچ اسکلروتینیا خاصیت آنتاگونیستی دارند که گونه‌های مختلف جنس تریکودرما درمیان آنتاگونیست‌های قارچی قرار دارند. این قارچ به خاطر مکانیزم‌های متفاوتی که علیه بیمارگرهای گیاهی دارد، مانند رقابت برای غذا، مایکوپارازیتیسم[1] و آنتی‌بیوزیسم[2] با تولید آنزیم‌های هیدرولایتیک و متابولیت‌هایی هم‌چون ترکیبات رشدی گیاه، یکی از مهم‌ترین میکروارگانیزم‌های آنتاگونیست است (Mendez-Vilas, 2010; Valencia *et al*., 2011). در مطالعات متعدد حضور هیف، کلامیدوسپور و کنیدی تریکودرما روی گونه‌های تولیدکننده سختینه هم‌چون اسکلروتینیا بررسی شده است. همچنین یافته‌هایی وجود دارد که گونه‌های تریکودرما باعث تخریب و لیز سختینه‌های این قارچ‌ها شده‌اند (Baniasadi *et al*., 2009). با توجه به تاثیر تریکودرما روی کنترل بیمارگرهای خاکزی، هدف از این مطالعه انتخاب گونه‌های بومی تریکودرما روی بیمارگر قارچی *S. sclerotiorum* در استان مازندران می‌باشد.

مواد و روش‌ها

گونه‌های قارچ بیمارگر و آنتاگونیست استفاده شده در این مطالعه، از گیاهان بیمار کلزا و نمونه‌های خاک خشک به طور جداگانه از مزارع مختلف استان مازندران شامل شهرهای قائم شهر، ساری، نکا، بهشهر، گلوگاه و جویبار طی فصل زراعی 91-1390 جمع آوری شدند.

[1] Mycoparasitism
[2] Antibiosism

قارچ *S. sclerotiorum* از ساقه‌های آلوده کلزا کشت داده شده در روی محیط کشت PDA جدا شد. برای جداسازی جدایه های تریکودرما، نمونه‌های خاک ناحیه ریزوسفری، به مدت هشت روز در دمای اتاق خشک شدند. سپس نمونه‌های خشک شده به طورسریالی با آب مقطررقیق شدند (Wijesundera *et al*., 1991). پس از رقیق‌سازی، مقدار 100 میکرولیتر از رقت‌های 10^{-4} تا 10^{-6} به طور جداگانه روی محیط کشت انتخابی *مک‌فادن و ساتن* (McFadden and sutton, 1975)، کشت داده شدند.

در بررسی‌های اولیه 18 جدایه *S. sclerotiorum* و 11 جدایه از گونه‌های مختلف تریکودرما از گیاهان آلوده کلزا و نمونه‌های خاک جدا شدند و همرا با سه جدایه تریکودرما که در مطالعات قبلی به عنوان جدایه‌های برتر شناخته شده بودند برای بررسی‌های آزمایشگاهی انتخاب شدند. آزمون بیماری‌زایی جدایه های *S. sclerotiorum* نیز، مطابق روش استاندارد بر روی برگ کلزا رقم هایولا 401در شرایط آزمایشگاهی انجام شد (Godoy *et al*., 1990) و بیماری‌زاترین آن انتخاب گردید. همه جدایه‌های آنتاگونیست و بیمارگر در روی محیط کشت عصاره سیب زمینی آگار در دمای 25°C نگهداری شدند.

شناسایی گونه‌های بیمارگر و آنتاگونیست بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی، سیتولوژیکی پرگنه‌ها، اندازه‌گیری قطر هیف، کنیدیوفور و ابعاد کنیدی انجام شد (Kohn, 1979; Rifai, 1969; Bissett, 1991).

تاثیر جدایه‌های تریکودرما روی رشد میسلیومی *S. sclerotiorum*

فعالیت آنتاگونیستی 14 جدایه از قارچ *Trichoderma* روی *S. sclerotiorum* با استفاده از روش کشت متقابل (Cherif and Benhamou, 1990)، پوشش سلوفان (Dennis and Webster, 1971) و ترکیبات فرار مورد مطالعه قرار گرفت. برای کشت دوتایی یک بلوک میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه‌های سه روزه در حال رشد هر یک از جدایه‌های تریکودرما و بیمارگر جدا و به فاصله چهار سانتی‌متری از هم روی محیط آگار دار قرار گرفته و در دمای 25±2°C تا زمانی که رشد قارچ بیمارگر در تشتک شاهد تمام ظرف را پر کند نگهداری شدند. در این مطالعه سرعت رشد روزانه تا زمان به هم رسیدن دو قارچ بررسی گردید و در ارتباط با روش سلوفان، یک غشاء سلوفانی به قطر هشت سانتی سانتی‌متر(سلوفان استرالیایی، ویکتوریا)، ابتدا در آب مقطر به مدت نیم ساعت جوشانده و قبل از قرار دادن روی محیط کشت آگاردار در بین کاغذ فیلتر قرار داده در اتوکلاو سترون شد. سپس بلوک‌های میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه‌های سه روزه آنتاگونیست‌های در حال رشد در وسط این غشاء قرار داده شد و برای تیمار شاهد، یک بلوک سترون PDA بجای آنتاگونیست‌ها استفاده گردید. بعد از 48 ساعت غشای سلوفانی همراه با قارچ چسبیده به آن و یا قطعه آگار (در تیمار شاهد) برداشته شد (Etebarian *et al*., 2000) و برای فعالیت ضد قارچی جدایه های تریکودرما، یک بلوک میسلیومی به قطر 5 میلی‌متر تلقیح شده با *S. sclerotiorum* به تشتک‌های فوق انتقال داده شد و تشتک‌ها در دمای 25 درجه سانتی‌گراد ودر شرایط تاریکی

نگهداری شدند. بعد از سه روز که تشتک‌های شاهد از قارچ بیمارگر پر شد ناحیه بازدارندگی رشد اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه شد و درصد بازدارندگی رشد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (GI%: درصد بازدارندگی از رشد، a: میانگین قطر رشد پرگنه قارچ *S. sclerotiorum* در تیمار شاهد و b: میانگین قطر رشد قارچ در تیمار مورد بررسی)

$$\% GI = ((a-b)/a)\times 100$$

لازم به ذکر است که قطر پرگنه بیمارگر به صورت میانگین دو اندازه‌گیری ناحیه محاسبه شده در نظر گرفته شد. این مطالعات در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد.

بل و همکاران، خاصیت آنتاگونیستی گونه‌های تریکودرما را به روش زیر طبقه‌بندی کردند (Bell *et al.*, 1982). I) تریکودرما به طور کامل سطح قارچ بیمارگر را بپوشاند، II) تریکودرما $\frac{2}{3}$ سطح تشتک را بپوشاند، III) تریکودرما و آنتاگونیست هر یک نیمی از تشتک را بپوشانند و هیچ‌کدام غالب به نظر نیایند، IV) بیمارگر $\frac{2}{3}$ سطح تشتک را بپوشاند و در برابر تریکودرما مقاومت کند و V) قارچ بیمارگربه طور کامل سطح قارچ تریکودرما را بپوشاند.

همچنین به منظور بررسی تاثیر متابولیت‌های فرار تولید شده توسط جدایه‌های آنتاگونیست تریکودرما بر بیمارگر، آزمونی بر اساس روش *دنیس و وبستر* (1971)، طراحی و اجرا گردید. سپس یک دیسک پنج میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه‌های قارچی سه روزه آنتاگونیست و بیمارگر به طور جداگانه در مرکز تشتک‌های هشت سانتی‌متری حاوی محیط PDA کشت شد. پس از برداشت درب پتری‌ها، تشتک‌های حاوی بیمارگر بر روی تشتک‌های حاوی آنتاگونیست قرار داده شده و دور تشتک‌ها با نوار پارافیلم مسدود گردید. در تیمار شاهد به جای آنتاگونیست از دیسک پنج میلی‌متری محیط PDA استفاده شد. تشتک‌ها به مدت سه روز در دمای 21 در تاریکی قرار داده شدند. میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر بر اساس فرمول فوق محاسبه و یادداشت گردید. آزمون در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد.

کنترل شیمیایی *S. sclerotiorum* در شرایط *in vitro*

سه قارچ‌کش تیوفانات متیل (Thiophanate methyl)، روورال‌تی‌اس (Rovral T-S) و بنومیل (Benomyl) برای این مطالعه انتخاب شدند. این ترکیبات مطابق روش *کالداری* (Caldari, 1998) در چهار غلظت ماده موثره (1، 10، 50و 100ppm) به محیط کشت PDA اضافه شدند. سپس بلوک میسلیومی حاوی قارچ بیمارگر در محیط کشت‌های حاوی قارچ‌کش‌های ذکر شده قرار داده شدند. تیمار شاهد حاوی محیط کشت فاقد قارچ‌کش بود. رشد میسلیومی قارچ به فواصل هر 24 ساعت اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی رشد بعد از آنکه قارچ بیمارگر در تیمار شاهد به طورکامل تشتک هشت سانتی‌متری را پر کرد اندازه‌گیری شد. این آزمایش در یک طرح کاملاً تصادفی با

چهار تکرار و شاهد، مرتب شد و پس از تجزیه واریانس، مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح 5% با هم مقایسه شدند.

کنترل شیمیایی و بیولوژیکی در شرایط گلخانه

در این آزمایش، کارآمدترین آنتاگونیست و قارچکش مورد بررسی در شرایط آزمایشگاه انتخاب و در شرایط گلخانه با هم مقایسه شدند. برای تکثیر *S. sclerotiorum* و جدایه‌های تریکودرما، ابتدا روی محیط PDA به مدت یک هفته کشت داده شدند. سپس محیط کشت قارچ اسکلروتینیا به قطعات PDA دو سانتی‌متر مربعی تقسیم و به فلاسک‌های درپوش‌دار 250 میلی‌لیتری حاوی 100 گرم ماسه، پنج گرم آرد ذرت و 20 میلی‌لیتر آب مقطر استریل و محیط کشت قارچ تریکودرما به فلاسک‌های درپوش‌دار 250 میلی‌لیتری حاوی 100 گرم سبوس گندم مرطوب انتقال داده شد .سپس بسترهای تلقیح شده در دمای اتاق به مدت سه هفته نگهداری شد تا تمام سطح بستر از قارچ اسکلروتینیا و تریکودرما پوشانده شود. مایه تلقیح هر یک از دو قارچ اسکلروتینیا و تریکودرما با خاک گلدان ضدعفونی شده، به میزان 15 گرم برای هرکیلو خاکی که دو بار به فاصله زمانی 24 ساعت در دمای 121°C سترون شده بودند مخلوط شدند (Etebarian *et al*., 2000). سپس بذر کلزا رقم هایولا 401 با غوطه‌ور شدن درمحلول هیپوکلریت سدیم یک درصد برای دو دقیقه ضدعفونی و سپس سه بار با آب مقطر استریل شستشو شدند ودر گلدان‌های دو کیلوگرمی کاشته شدند. در این آزمایش آنتاگونیست، قارچ بیمارگر و قارچ‌کش به صورت تیمارهای زیر مورد استفاده قرار گرفتند: 1- آنتاگونیست هشت روز قبل از قارچ اسکلروتینیا به خاک گلدان اضافه شد. 2- تریکودرما و اسکلروتینیا هم‌زمان به خاک گلدان اضافه شدند. 3- آنتاگونیست هشت روز بعد از قارچ اسکلروتینیا به خاک گلدان اضافه شد. 4- قارچ‌کش مطابق توصیه شرکت سازنده به صورت ضدعفونی بذر مورد استفاده قرار گرفت. 5- شاهد. و در نهایت بعد از دو هفته، 10 بوته از هر تیمار جدا و تعداد بوته‌های سالم و بیمار هر تیمار براساس علایم ظاهری جدا و درصد وقوع بیماری براساس فرمول زیر محاسبه گردید.

100×تعداد کل بوته های مورد بررسی/تعداد بوته های بیمار =درصد وقوع بیماری

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام گردید و پس از تجزیه واریانس، میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن با هم مقایسه شدند.

نتایج

اولین علائم بیماری در بررسی بیماری‌زایی 18 جدایه قارچ *S. sclerotiorum* در روی برگ کلزا در شرایط آزمایشگاه، 24 ساعت بعد از تلقیح مشاهده شد و با اندازه‌گیری روزانه قطر آلودگی طی سه روز، جدایه S-13 به عنوان بیماری‌زاترین جدایه برای بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه انتخاب گردید (شکل 1).

شکل 1- علایم برگ های آلوده به *S. sclerotiorum* (S13) (برگ سمت راست) و شاهد (برگ سمت چپ) بعد از 72 ساعت

تاثیر جدایه‌های تریکودرما روی رشد میسلیومی *S. sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاه

در بررسی تاثیر بازدارندگی 14 جدایه تریکودرما روی رشد میسلیوم‌های *S. sclerotiorum* در کشت‌های دوتایی، تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0/01$) در میان گونه‌های تریکودرما دیده شد.

در بررسی میزان سرعت رشد جدایه‌های آنتاگونیست در کشت های دوتایی مشاهده شد که کلیه جدایه‌های آنتاگونیست به استثناء *T. asperellum* M11 و *T. Koningii* M13 پس از دو روز به کلنی قارچ بیمارگر رسیده و در یک گروه قرار گرفتند (جدول 1). همچنین درصد مهار رشد قارچ بیمارگر بین 40- 60 درصد متفاوت بود و نتایج نشان داد که *T. harzianum* (A10) از بیش‌ترین توانایی بازدارندگی از رشد بیمارگر برخوردار بود (53/4%) و جدایه M 11 (*T. asperellum*) کم‌ترین تاثیر را در بازدارندگی رشد داشت (35/5%)(جدول 1). در تمامی کشت‌های دوتایی تماس بین آنتاگونیست‌ها و قارچ *S. sclerotiorum* در روز دوم اتفاق افتاد به جزء M 11 (*T. asperellum*) و M 23 (*T. koningii*)، که تماس در روز سوم رخ داد (جدول 1). مطابق سیستم نمره‌دهی (Bell *et al.*, 1982) گونه‌های تریکودرما در گروه‌های II و III قرار گرفتند. در این میان هفت جدایه در گروه دوم قرار گرفتند که از توانایی آنتاگونیستی خوبی در کنترل قارچ عامل بیماری برخوردار بودند. بقیه جدایه‌ها درگروه سوم قرار گرفتند (جدول 1).

تاثیر فعالیت ترکیبات فرار ضدقارچی در میان گونه‌های تریکودرما در مهار رشد *S. sclerotiorum* در سطح 1% معنی دار بود. بیش‌ترین مهار رشد قارچ بیمارگر بوسیله آنتاگونیست‌های A2، A10 و A12 (*T. harzianum*)، مشاهده شد و چهار جدایه تریکودرما نتوانستند تاثیری در مهار رشد میسلیوم‌های قارچ بیمارگر داشته باشند با این حال رشد میسلیوم‌ها ضعیف‌تر و کم تراکم‌تر از شاهد بود (جدول 1).

تاثیر فعالیت متابولیت‌های غیرفرار در مهار رشد *S. sclerotiorum* که به وسیله روش سلوفان مطالعه شد در میان گونه‌های تریکودرما در سطح 1% معنی‌دار بود. جدایه‌های(*T. harzianum*) A2 و A10 باعث مهار رشد قارچ بیمارگر به طور کامل (100%) شدند (جدول 1).

جدول 1- تاثیر گونه های مختلف تریکودرما در بازدارندگی رشد میسلیومی *S. sclerotiorum* در کشت‌های دوتایی، تولید ترکیبات ضد قارچی فرار و غیر فرار

گونه‌های تریکودرما	کد جدایه‌ها	کشت دوتایی*	بازدارندگی از رشد *S. sclerotiorum* (%)			
			روزهای* تماس	مقیاس بل	ترکیبات* فرار	ترکیبات* غیرفرار
T. harzianum	M 2	48/ 5 bcd	2 a	2	28 ab	74/5 bc
	M 6	47/1 cd	2 a	2	0 g	66/0 c
	M 9	51/7 ab	2 a	2	27/5 ab	83/7 ab
	M 15	49/6 bc	2 a	2	12/6 d	56/0 d
	M 23	49/5 bc	2 a	3	19/1 c	55/5 d
	A 2	50/0 ab	2 a	3	30/3 a	100 a
	A 10	53/4 a	2 a	3	31 a	100 a
	A 12	50/1 ab	2 a	2	33 a	78/0 b
T. asperellum	M 5	44/3 de	2 a	2	7/3 e	63/2 c
	M 11	35/5 fg	3 b	3	0 g	12/5h
	M 14	46/3 cde	2 a	3	4/5 f	23/5 g
T. Koningii	M 21	38/4 f	3 b	3	5/3 f	0/0 i
	M 13	45/5 cde	2 a	3	0 g	45/5 e
T. homatum	M 8	48/2 bcd	2 a	2	0 g	30/0 f

* تیمارهای با حروف مشابه مطابق با آزمون چند دامنه‌ای دانکن، تفاوت معنی‌داری در سطح 5% نداشتند.

در بررسی کارایی قارچ‌کش در کنترل قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاه مشاهده شد که هر سه قارچ‌کش مورد استفاده توانستند به طور قابل توجهی رشد میسلیومی جدایه *S. sclerotiorum* (S13) را کاهش دهند. در این آزمایش، تیوفانات متیل حتی در پایین‌ترین غلظت ماده موثره استفاده شده (یک پی‌پی‌ام)، بیش‌ترین تاثیر را در کاهش رشد میسلیوم‌ها داشت و در غلظت‌های بالاتر به طور کامل مانع از رشد مسیلیوم‌ها شد. جدایه *S. Sclerotiorum* مورد آزمایش قادر به رشد در غلظت 100 پی‌پی‌ام هیچ‌یک از قارچ‌کش‌های آزمایش شده نبود (جدول 2).

جدول 2- درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف ماده موثره سموم استفاده شده روی رشد میسلیومی *S. sclerotiorum* بعد از سه روز در محیط کشت PDA

	غلظت ماده موثره (پی‌پی‌ام)			
قارچ کش	1	10	50	100
تیوفانات متیل	33/20 c	0 a	0 a	0 a
رورال تی اس	50/43 d	15/28 c	75/8 b	0 a
بنومیل	25/75 f	65/54 e	50/28 c	0 a

تیمارهای با حروف مشابه مطابق با آزمون چند دامنه‌ای دانکن، تفاوت معنی‌داری در سطح 5% نداشتند.

مقایسه کنترل شیمیایی و بیولوژیکی در شرایط گلخانه

در این آزمایش درصد وقوع بیماری دو هفته بعد از کاشت بذر مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور 10 بوته از هر تیمار از خاک بیرون آورده شدند وتعداد بوته‌های آلوده شمارش شد و درصد وقوع بیماری محاسبه گردید. نتایج تجزیه واریانس داده های درصد وقوع بیماری (جدول 3) دو هفته بعد از کاشت بذر نشان داد که همه تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌داری دارند (شکل 2)، همچنین مقایسه میانگین بین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن نشان داد که تیمار مایه‌زنی خاک با آنتاگونیست‌ها هشت روز قبل از بیمارگر، با میزان بروز بیماری 23% بیش‌ترین تاثیر را در کنترل قارچ *S. sclerotiorum* داشت و پس از آن تیمارهای قارچ‌کش تیوفانات متیل و مایه‌زنی هم‌زمان آنتاگونیست و بیمارگر با بروز بیماری 35 و 38 درصد در گروه دوم قرار گرفتند و میزان بروز بیماری در تیمار مایه‌زنی خاک با آنتاگونیست هشت روز بعد از بیمارگر 65 % بوده هرچند که با شاهد اختلاف معنی‌دار داشته ولی چندان در کنترل بیماری موثر نبود.

جدول 3- جدول تجزیه واریانس درصد وقوع بیماری کپک سفید کلزا در شرایط گلخانه تحت تاثیر تیمارهای قارچکش و زمان های مختلف استفاده آنتاگونیست در خاک، دو هفته بعد از کاشت

منابع تغییرات	DF	MS	Fvalue	Pr>F
تیمار	4	2313/90**	160/13	<0/0001
خطا	10	14/45		
کل	14			
CV: 7.51				

شکل 2- نمودار گروه‌بندی درصد وقوع بیماری کپک سفید کلزا در شرایط گلخانه. تیمارهای با حروف مشابه مطابق با آزمون چند دامنه‌ای دانکن اختلاف معنی‌داری در سطح 5% نداشتند.

بحث

توانایی گونه‌های تریکودرما در مهار رشد میسلیوم‌های *S. sclerotiorum* در بررسی کشت‌های دوتایی در بین گونه‌های مختلف تریکودرما و حتی بین جدایه‌های یک گونه متفاوت بود. این نتایج نشان می‌دهد که توانایی‌های آنتاگونیستی هر جدایه، نسبت به جدایه دیگر متفاوت است. اگر چه *شایگان و همکاران* (Shaigan *et al*., 2008) در بررسی میان پنج گونه مختلف تریکودرما، مشاهده کردند که *T. viride* نسبت به چهار گونه دیگر (*T. harzianum*، *T. hamatum*، *T. longibrachiatum* و *T. paraseramosum*)، از توانایی بیش‌تری در مهار رشد قارچ *Sclerotium rolfsii* Sacc برخوردار است ولی *الحسن و همکاران* (El-Hasan *et al*., 2007) در بررسی تعداد زیادی از گونه‌های تریکودرما مشاهده نمودند که جدایه‌های *T. harzianum* بیش‌ترین تاثیر را در کنترل *F. moniliforme* دارد. علاوه بر این در بررسی 10 جدایه تریکودرما از گونه‌های *T. viride*، *T. harzianum* و *T. virens* برای کنترل *Fusarium oxysporum* f.sp. *ciceris* مشاهده شد که *T. viride* و *T. harzianum* بیش‌ترین توانایی را (به ترتیب 61/1 و 60%) در مهار رشد قارچ بیمارگر داشتند (Dubey and Suresh, 2006). *دوبی و سورش* دریافتند که میزان فعالیت آنتاگونیستی هر جدایه در برخورد با بیمارگرهای مختلف متفاوت است.

سنجش میزان قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما که مطابق مقیاس بل محاسبه شد نشان داد که در کل حدود نیمی از جدایه‌های تریکودرما به عنوان ارگانیسم‌هایی با سطح آنتاگونیستی بالا (گروه 2) بر ضد *S. sclerotiorum* هستند. بر اساس نظر *شایگان و همکاران* هر چه زمان تماس آنتاگونیست‌ها با قارچ بیمارگر کمتر باشد، رقابت آنتاگونیستی برای غذا و مکان بیش‌تر خواهد بود (Shaigan *et al*., 2008). مطالعات انجام شده بوسیله *بن‌هامو و چت* نشان داد که مدت زمان رسیدن و برقراری تماس بین *T. harzianum* و *Rhizoctonia solani* دو روز به طول می انجامد (Benhamou and Chet, 1993)، در حالی‌که *میشل و همکاران* این مدت را برای گونه‌های بومی

تریکودرما با *Fusarium oxysporum*، 3-6 روز و با *F. subtinans* 3-10 روزگزارش نمودند (Michel *et al.*, 2005).

به طور کلی در این آزمایش‌ها مهار رشد میسلیوم‌های قارچ بیمارگر توسط ترکیبات فرار قارچ تریکودرما حتی بین جدایه‌های یک گونه، بسیار ناهمگن بود. این روند توسط *دنیس و وبستر* (Dennis and Webster, 1971) نیز گزارش شد. آنها نشان دادند که تولید متابولیت‌های گونه‌های تریکودرما متغیر و حتی یک جدایه خاص در مراحل مختلف رشدی بسته به شرایط در حال رشد، متابولیت‌های مختلف تولید می‌کنند.

بازدارندگی رشد عصاره‌های تولیدی در مهار میسلیوم‌های *S. sclerotiorum* در روش سلفون در بین جدایه‌های تریکودرما از 0-100 متغیر بود که تایید کننده نظر *شیواسیتام‌پارام و قیسالبرتی* (Sivasithamparam and Ghisalberti, 2002) بود. هر چند آنتی‌بیوتیک‌ها ی تولید شده از جدایه‌های تریکودرما در این مطالعه جداسازی و شناسایی نشدند اما بعضی از آنتی‌بیوتیک‌ها هم‌چون توبرسیدین، کاندیسیدین، فسفولاکتومایسین، فناسین و 4- دی استیل فلوروگلوسینول که به وسیله بعضی از آنتاگونیست‌ها هم‌چون *Pseudomonas flourescens*, *Streptomyces* spp. و *Trichoderma* spp. تولید می‌شوند به وسیله بعضی از محققان گزارش شده است (Hwang *et al*., 1994; Mazzola *et al*., 1992). اثر متابولیت‌های ثانویه تولید شده توسط قارچ تریکودرما در رشد پاتوژن گیاهی به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. *اعتباریان* در مطالعاتش اثر قارچ‌کشی متابولیت‌های تولید شده توسط گونه‌های *T. harzianum* و *T. virens* که باعث مهار صد درصدی رشد میسلیوم قارچ *Macrophomina phaseolina* شد را گزارش کرد (Etebarian, 2006).

در حال حاضر بیش از 120 متابولیت ثانویه تولید شده توسط گونه‌های تریکودرما گزارش شده است، از جمله پلی‌کتیدها، پیرن‌ها، ترپن‌ها، متابولیت‌های مشتق شده از اسیدهای آمینه و پلی‌پپتیدها که به داشتن خواص آنتی‌بیوتیکی، قارچ‌کشی، باکتری‌کشی، مایکوتوکسین، فیتوتوکسین و تنظیم‌کننده‌های رشدی شناخته شده‌اند (Sivasithamparam and Ghisalberti, 2002). همچنین ترکیبات ضدقارچی مثل گلی توکسین و ویردین که توسط *T. virens* (= *Gilocladium*) تولید می شود سبب انعقاد پرتوپلاسم *P. ultimum* می گردد که نهایتا این قارچ بیمارگر نمی‌تواند به خوبی رشد کند همچنین پاسیباسین و تریکودرمین و دیگر آنتی‌بیوتیک‌ها و آنزیم‌ها را تولید می‌کند که نشان داده شده است در کاهش مایه تلقیح بیمارگرهای قارچی دخالت دارند، همچنین تریکورزیامین‌ها که متابولیت‌های ثانویه با اثر آنتی‌بیوتیکی است که ممکن است منجر به تغییر در الگوی مورفولوژیکی میسلیوم‌های *S. rolfsii* شود از *T. harzianum* به دست آمده است (Reino, 2008).

نتایج حاصل از کنترل بیولوژیکی قارچ *S. sclerotiorum* در شرایط گلخانه، همبستگی بین زمان استفاده از آنتاگونیست‌ها و کنترل بهتر قارچ بیمارگر را نشان داد که مطابق با مطالعات سایر محققین بود (Jackisch, 1996; Rocha and Oliveira, 1998). همچنین مطالعاتی وجود دارد که تفاوتی را بین دو روش کنترل شیمیایی و بیولوژیکی از نظر میزان تاثیر گزارش نمودند (Bolland, 1997).

بعضی از جدایه‌های تریکودرما به فرم تجارتی به صورت قارچکش‌های ثبت شده روی بعضی از محصولات برای کنترل بیولوژیک بعضی از بیماری‌ها موجود می‌باشند. به هر حال در این مطالعه نشان داده شده که هر چند در

استفاده هم‌زمان قارچ‌کش شیمیایی و بیولوژیک، ممکن است سموم شمیایی تاثیر سریع‌تری نشان دهند ولی اگر در زمان مناسب و حتی به منظور پیشگیری از این ترکیبات بیولوژیک استفاده شوند، هم از اثر کنترل‌کنندگی بهتری نسبت به سموم شیمیایی برخوردارند و هم به عنوان یک عامل کنترل‌کننده طولانی مدت در بهبود رشد گیاه و افزایش محصول نقش دارند. در هر حال تاثیر جدایه‌های تریکودرما آزمایش شده در این مطالعه قبل از اینکه به فرم تجاری درآیند باید جهت تولید آنتی‌بیوتیک‌های مختلف برای سلامت غذا آزمایش شوند.

References

1. Adams PB and Ayers WA. 1979. Ecology of *Sclerotinia* species. Phytopathology 69: 896–899.
2. Baniasadi F, Shahidi GH, Baghizadeh A, Nik AK and Jorjandi M. 2009. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of sunflower head and stem rot disease, by use of soil borne actinomycetes isolates. American Journal of Agriculture Biological Sciences 4: 146–151.
3. Beheshti B, Sharifi-Sirchi GR, Mansouri M, Hosseinipour A and Schlaich NL. 2011. Resistance to citrus canker in key/mexican lime induced by βaminobutyric acid and green tea. American Journal of Agriculture Biological Sciences 6: 242–248.
4. Bell DK, Well HD and Markham CR. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology 72: 379–382.
5. Benhamou N and Chet I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of the mycoparasitic process. Phytopathology 83: 1062–1071.
6. Bissett J. 1991. A revision of the genus *Trichoderma* b. Additoinal notes on section Longibrachiatum. Canadian Journal of Botany 69: 2418–2420.
7. Bolland GJ. 1997. Stability analysis for evaluating the influence of environment on chemical and biological control of white mold *Sclerotinia sclerotiorum* of bean. Biological Control 9: 7–14.
8. Cherif SS and Benhamou CS. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* spp., on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology 80: 1406–1414.
9. Caldari Júnior P. 1998. Caracterização morfológica, esporulação e sensibilidade a fungicidas de isolados de Botrytis cinerea de flores e plantas ornamentais [MSc]. [São Paulo, Brazil]: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.
10. Cooney JM and Lauren DR. 1998. *Trichoderma*/pathogen interactions: Measurement of antagonistic chemicals produced at the antagonist/pathogen interface using a tubular bioassay. Letters in Applied Microbiology 27: 283–286.
11. Dennis C and Webster J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma: I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 25–39.
12. Dubey SC and Suresh M. 2006. Randomly amplified polymorphic DNA markers for *Trichoderma* species and antagonism against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* causing chickpea wilt. Journal Phytopathology 154: 663–669.
13. Etebarian HR, Scott ES and Wicks TJ. 2000. *Trichoderma harzianum* T39 and *T. virens* DAR 74290 as potential biological control agents for *Phytophathora erythroseptica*. European Journal of Plant Pathology 106: 329–337.

14. Etebarian H R. 2006. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of charcoal stem rot in melon caused by *Macrophomina phaseolina*. Journal of Agricultural Science Technology 8: 243–250.
15. El-Hasan A, Walker F, Schöne J and Buchenauer H. 2007. Antagonistic effect of 6-pentyl-alpha-pyrone produced by *Trichoderma harzianum* toward *Fusarium moniliforme*. Journal of Plant Disease Protection 114: 62–68.
16. Godoy G, Steadman JR, Dickman MB and Dam R. 1990. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *S. sclerotiorum* on *Phaseolina vulgaris*. Physiological and Molecular Plant Pathology 37:179–191.
17. Hwang BK, Ahn SJ and Moon SS. 1994. Production, purification, and antifungal activity of the antibiotic nucleoside, tubercidin, produced by *Streptomyces violaceoniger*. Canadian Journal of Botany 72: 480–485.
18. Jackisch AB. 1996. Estudo de Pythium em Nicotiana tabacum: patogenicidade, caracterização morfológica e esterásica, reação de cultivares de fumo ao patógeno e biocontrole através de espécies de *Trichoderma* [MSc]. [Recife, PE] Universidade Federal de Pernambuco.
19. Johnson DA and Atallah ZK. 2006. Timing fungicide applications for managing *Sclerotinia* stem rot of potato. Plant Disease 90: 755–758.
20. Kohn LM. 1979. A monographic revision of the genus *Sclerotinia*. Mycotaxon 9(2): 365–444.
21. Mazzola M, Cook RJ, Thomashow LS, Weller DM and Pierson LS. 1992. Contribution of phenasine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. Applied and Environmental Mirobiology 58: 2616–2624.
22. McFadden AG and Sutton JC. 1975. Relationship of populations of *Trichoderma* spp. in soil to disease in maize. Canadian Journal of Plant Science 55: 579–586.
23. Mendez-Vilas A. 2010. A review on contributions presented at the BioMicroWorld 2009 conference. American Journal Agriculture Biological Science 5: 486–487.
24. Metcalf DA, Dennis JJC and Wilson CR. 2004. Effect of inoculum density of *sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. Plant Disease 88: 287–291.
25. Michel AAC, Cruz AR, Otero MA, Rebolledo SO and Lezama R. 2005. Potencial antagónico de *Trichoderma spp*. sobre *Fusarium oxysporum* f sp. lycopersici and *Sclerotium rolfsii* in vitro e invernadero. Revista Mexicana de Fitopatología 23: 286–293.
26. Reino JL, Guerrero RF, Hernandez-Galan R and Collado IG. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent Trichoderma. Phytochemystry Reviews 7: 89–123.
27. Rifai MA. 1969. A Revision of the genus *Trichoderma*. Mycological Papers 116: 1–56.

28. Rocha JRS and Oliveira NT. 1998. Controle biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente da antracnose do maracujazeiro (Passiflora edulis), com *Trichoderma koningii*. Summa Phytopathologica 24: 180–183.
29. Shaigan S, Seraji A and Moghaddam SAM. 2008. Identification and investigation on antagonistic effect of *Trichoderma* spp. on tea seedlings white foot and root rot (*Sclerotium rolffsi* Sacc) in vitro condition. Pakistan Journal of Biological Sciences 11: 3246–2350.
30. Sivasithamparam K and Ghisalberti EL. 2002. Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. pp. 139–191, *In* CP Kubicek, GE. Harman and KL Ondik (eds.). *Trichoderma* and *Gliocladium* basic biology, taxonomy and genetics. London: Taylor and Francis.
31. Valencia GB, Vargas VH, Soto JNU, Jimenez NN and Corral JH. 2011. *Trichoderma* sp. native from chili region of Poanas, Durango, Mexico antagonist against phytopathogen fungi. American Journal of Agricultural Biological Sciences 6 (2): 185–188.
32. Wijesundera RLC, Jeganathan S and Liyanage NIS. 1991. Some effects of isolates of *Trichoderma* on Rigidiporus lignosus. Sri Lanka Journal of Rubber Research Institute 71: 45–50.

Antagonistic effects of *Trichoderma* spp. in the control of *Sclerotinia sclerotiorum* and in comparison with chemical fungicides

H. Barari*[1], A. Dalili [1]

Abstract

Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary is a major plant pathogen that plays a crucial role in yield reduction of economically important crops. Most of the conventional methods are not effective in management of *S. sclerotiorum*. The Biological control by fungal antagonists could be useful in reducing disease. In the present research, antagonistic effects of indigenous *Trichoderma* species on *S. sclerotiorum* were determined *in vitro*. Dual culture technique, production of volatile and non-volatile compounds were used to determine the percentage of mycelial growth inhibition. The mycelial growth inhibition of *S. sclerotiorum* by *Trichoderma* strains ranged from 35.5-53.4, 0-33 and 0-100 percent in dual culture, volatile compounds and non volatile metabolites tests, respectively. *Trichoderma harzianum* (A10) showed the highest impact on mycelial growth inhibition in dual culture and *T. harzianum* (A2 & A10) had the highest effect on the inhibition of mycelial growth by the production of volatile compounds and non-volatile compounds. On the whole, antagonist T10 (*T. harzianum*) was most effective in controlling pathogen isolates under laboratory conditions. Also effects of three fungicides including thiophanate- methyl, Rovral TS and Benomyl were studied in laboratory conditions. Results showed that thiophanate-methyl (10 ppm) and the other two fungicides at concentration of 100 ppm were able to completely inhibit the mycelial growth. Comparison of effectiveness of chemical and biological control methods in greenhouse conditions indicated that inoculation of soil with antagonist prior to infection with the pathogen had better effect than chemical control did. This study has shown that the use of biocontrol agents at the right time is more efficient in prevention of the disease than chemical fungicides.

Keywords: *Trichoderma*, biological control, chemical control, *Sclerotinia*, fungicide.

[1] - Research Assistant Professor, Plant Protection Research Department, Mazandaran Agriculture and Natural Researches and Education Center, AREEO, Sari, Iran.

*Corresponding author: hosseinbarari385@yahoo.com