مهار زیستی بیماری پوسیدگی طوقه کلزا با استفاده از جدایه‌های تریکودرما در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

محمد رضا صفری مطلق[1*] و مصطفی ابوالقاسمی [2]

۱- ***نویسنده مسوول:** دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (ssafarimotlagh@yahoo.com)

۲- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، موسسه آموزش عالی دیلمان، لاهیجان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۱۹

چکیده

بیماری پوسیدگی طوقه کلزا با عامل *Sclerotinia sclerotiorum*، یکی از بیماری‌های مهم کلزا در سراسر دنیا محسوب می‌شود. مهار زیستی یکی از روش‌های کنترل در کشاورزی است که با استفاده از عوامل زنده به‌ویژه قارچ‌ها و باکتری‌ها، خسارت وارد شده به گیاهان، کنترل می‌شود. در این پژوهش، اثر ۷۱ جدایه از گونه‌های مختلف تریکودرما با استفاده از روش‌های کشت متقابل و کشت روی اسلاید در آزمایشگاه و اثر شش جدایه برتر به همراه دو تیمار شاهد (مثبت و منفی) و قارچ‌کش تبوکونازول در گلخانه روی *S. sclerotiorum* بررسی گردید. در کشت متقابل، جدایه‌ی *T. harzianum* ARCTr281 موثرترین جدایه در مهار رشد میسلیومی *S. sclerotiorum* بود و در روش کشت روی اسلاید، تمامی جدایه‌های *T. harzianum* در مهار ریسه‌های بیمارگر موفق بودند. تمامی قارچ‌های مایه‌زنی شده به صورت دو مرحله‌ای به طور موثری قادر به کاهش میزان وقوع و شدت بیماری در برگ‌ها و ساقه‌ها شدند که در بین آنها جدایه‌ی *T. harzianum* ARCTr281 موثرترین قارچ در بررسی‌های گلخانه‌ای بود. همچنین به‌کارگیری جدایه‌های تریکودرما به صورت دو مرحله‌ای در گلخانه موجب افزایش ارتفاع، وزن تر و وزن خشک اندام هوایی و ریشه در حضور قارچ عامل بیماری گردید. با توجه به نتایج فوق، جدایه‌های قارچی ARCTr281 و ARCTr272 متعلق به گونه *T. harzianum*، موثرترین آنتاگونیست‌ها در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه کلزا بودند.

***کلیدواژه‌ها:** مهار زیستی، پوسیدگی طوقه، Sclerotinia sclerotiorum، کلزا، جدایه‌های تریکودرما*

مقدمه

کلزا بعد از سویا و نخل روغنی مقام سوم را در تأمین روغن نباتی دارد و همچنین بعد از سویا مقام دوم را در تولید دانه‌های روغنی دارا می‌باشد (Mohammadzadeh, 2015). پوسیدگی طوقه کلزا با عامل *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib). de Bary یکی از مهم‌ترین بیماری‌های کلزا در ایران و در جهان است. قارچ عامل بیماری دارای دامنه میزبانی وسیع بوده و گیاهان مختلفی را آلوده می‌کند (Saharan and Mehta, 2008). اولین علائم بیماری مدتی پس از شروع گل‌دهی ابتدا به صورت لکه‌های کوچک خاکستری رنگ و آب‌سوخته روی برگ‌ها تشکیل می‌شوند که به تدریج لکه‌ها توسعه یافته و در شرایط مرطوب، ریسه‌های سفید و پنبه‌ای قارچ روی لکه‌ها تشکیل می‌شوند. میزان آلودگی به این بیماری و خسارت آن بسته به منطقه جغرافیایی، شرایط محیطی و وضعیت مزرعه متفاوت و میزان کاهش محصول کلزا توسط

آن در آمریکا ۱۳-۵ درصد و در استرالیا ۰/۳۹ تا ۱/۵۴ تن در هکتار بوده و در هند کاهش محصول ۵۰ تا ۷۵ درصد گزارش شده است (Saharan and Mehta, 2008). این بیماری از استان‌های مختلف ایران هم‌چون مازندران، کردستان و فارس گزارش شده است (Mahdi Alamdarloo and Gharagozloo, 2003; Aghajani et al., 2008). با توجه به این‌که قارچ عامل بیماری دارای دامنه میزبانی وسیع بوده و پایداری طولانی‌مدت توسط سختینه‌ها در شرایط مختلف دارد برای کنترل آن باید تلفیقی از روش‌های مختلف زراعی، شیمیایی و بیولوژیکی به کار گرفته شوند (Steadman, 1979).

در مطالعه‌ای مشخص شد که *Trichoderma viride* با فعالیت آنزیم گلوکوناز، دیواره سلولی *S. sclerotiorum* را تخریب نموده و موجب کنترل بیماری شد (Jones et al., 1974). *T. koningii* Trutmann and Keane (1990) را در شرایط آزمایشگاهی و مزرعه لوبیا مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این قارچ می‌تواند ۵۰ درصد سختینه‌های *S. sclerotiorum* را در شرایط *in vitro* کنترل کند. در تحقیق دیگری معلوم شد که قارچ‌های *T. harzianum*، *T. virens*، *Coniothyrium minitans* و *Gliocladium roseum* در شرایط آزمایشگاهی باعث آلودگی و متلاشی شدن سختینه‌های *S. sclerotiorum* شدند (Phillips, 1990). برای مهار زیستی بیماری کپک سفید در مزارع لوبیا، با عامل *S. sclerotiorum*، از سوسپانسیون اسپور چهار قارچ *C. minitans*، *T. roseum*، *T. virens* و *Epicoccum purpurascens* در زمان گل‌دهی استفاده گردید و همه آن‌ها به‌طور معنی‌داری شدت بیماری را کنترل کردند (Huang et al., 2000).

بررسی‌ها نشان داده است که *Ulocladium atrum* می‌تواند بر روی پرگنه *S. sclerotiorum* رشد کند ولی نمی‌تواند سختینه‌های آن را پارازیته نماید (Li et al., 2003). آزمایش‌های گلخانه‌ای و مزرعه‌ای نشان داده‌اند که کاربرد هوایی سوسپانسیون اسپورهای *C. minitans* سبب بازدارندگی آلودگی گلبرگ‌های کلزا توسط آسکوسپورهای *S. sclerotiorum* و نیز باعث کاهش معنی‌دار پوسیدگی ساقه کلزا در مقایسه با شاهد گردید (Li et al., 2006). همچنین در تحقیق دیگری، (Abdollahzadeh et al., 2006) اثر نه جدایه از گونه‌های تریکودرما شامل *T. harzianum*، *T. virens* و *T. viride* علیه *S. sclerotiorum* را مورد بررسی قرار دادند و مشخص گردید که جدایه‌های مذکور از نظر قدرت پارازیتیسم، قدرت رقابتی ساپروفیتی، قدرت کلونیزاسیون، تأثیر متابولیت‌های فرار و غیرفرار از کارآیی مطلوبی برخوردار بودند. کاربرد برگی سوسپانسیون اسپور *U. atrum* بر روی کلزا در اوایل گل‌دهی سبب کاهش میزان وقوع و شدت بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی ساقه، کاهش سختینه‌های مخلوط شده با بذر پس از برداشت و افزایش محصول تولیدی گردید (Huang and Erickson, 2007).

اثر بیولوژیکی پنج گونه‌ی تریکودرما (شامل *T. viridescens*، *T. virens*، *T. koningiopsis* و *T. ceramicum*) و یک جدایه از *C. minitans* روی *S. sclerotiorum* بررسی شد و مشخص گردید که عوامل بیولوژیکی مذکور با درجات مختلف باعث کنترل این بیمارگر در شرایط آزمایشگاه شده‌اند (Ojaghian et al., 2009). اثر ۳۰ جدایه تریکودرما روی قارچ اسکلروتینیا بررسی شد و بر اساس نتایج آن، سه جدایه از سه گونه‌ی *T. harzianum*، *T. atroviride* و *T. longibrachiatum* از نظر رشد سریع، تولید آنزیم‌های کیتیناز و گلوکاناز و نیز بازداری از رشد اسکلروتینیا برتر بودند (Matroudi et al., 2009). در مهار زیستی عامل بیماری پوسیدگی یقه توتون (*S. sclerotiorum*) با استفاده از عوامل بیوکنترل قارچی در استان گیلان، گونه‌ی *T. harzianum* در روش

کشت متقابل و *T. virens* در روش کشت روی اسلاید در مهار ریسه‌های *S. sclerotiorum* موفق بوده و قارچ‌های تریکودرمای مایه‌زنی شده بر روی گیاه توتون، به طور مؤثری قادر به کاهش شدت بیماری در سطح گلخانه شدند و رشد اندام‌های هوایی گیاه توتون را بهبود بخشیدند (Alavi Rad, 2016). تأثیر ۱۴ جدایه بومی تریکودرما مربوط به چهارگونه مختلف در کنترل *S. sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که بیشترین تأثیر در مهار رشد میسلیوم‌های بیمارگر متعلق به دو جدایه از گونه *T. harzianum* بوده است (Barari and Dalili, 2016). در یک بررسی، گونه‌های *Trichoderma* باعث مهار ۱۰۰ درصدی جوانه‌زنی سختینه‌های *S. sclerotiorum* شدند و همچنین گونه‌های *T. koningiopsis*، *T. asperelloides*، *T. atroviride* و *T. virens* در شرایط گلخانه باعث حفاظت از گیاه سویا در برابر عامل بیماری و همچنین بهبود عملکرد اندام هوایی آن گردیدند (Haddad et al., 2017).

اهداف این تحقیق شامل جداسازی و شناسایی گونه‌های مختلفی از جنس تریکودرما موجود در فلور طبیعی گیاه کلزا و ارزیابی توانایی آن‌ها در مهار رشد ریسه‌های *S. sclrotiorum* در سطح آزمایشگاه و انتخاب بهترین جدایه‌ها در کاهش شدت بیماری پوسیدگی طوقه کلزا در سطح گلخانه و نیز بررسی تأثیر این جدایه‌ها روی صفات مورفولوژیک کلزا بود.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، جداسازی، نگهداری و شناسایی جدایه‌های قارچی

بیمارگر *S. sclerotiorum* از طوقه کلزای دارای علائم بیماری پوسیدگی اسکلروتینیایی که از مزرعه آزمایشی واقع در ساری جمع‌آوری شده بود، جداسازی گردید. برای این منظور قطعاتی از طوقه بوته بیمار کلزا تهیه و پس از شستشو با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به‌مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی سطحی شدند. در مرحله بعد، شستشو با آب مقطر سترون و خشک کردن قطعات روی کاغذ صافی انجام شد و آن‌گاه در داخل تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت سیب‌زمینی - دکستروز - آگار (PDA) کشت داده شدند و این تشتک‌ها به داخل انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد انتقال یافته و در شرایط تاریکی به مدت ۳ تا ۵ روز نگهداری شدند. خالص‌سازی قارچ به روش نوک ریسه انجام شد (Almomani et al., 2013). برای تهیه جدایه‌های تریکودرما تعدادی نمونه‌ی خاک به طور تصادفی از زمین‌های زراعی و بایر مناطق مختلف استان‌های مازندران، گلستان، فارس، همدان و لرستان جمع‌آوری شد. برای تهیه نمونه، پس از کنار زدن خاک سطحی، از عمق ۳۰-۵ سانتی‌متری خاک، نمونه‌برداری انجام شد و نمونه‌ها در داخل کیسه‌های پلاستیکی جداگانه به آزمایشگاه منتقل شدند. جداسازی جدایه‌های تریکودرما از خاک روی محیط کشت انتخابی Elad and Chet (1980) انجام شد. برای نگهداری درازمدت، جدایه‌ها در دستگاه فریزدرایر (مدل درسا تک) خشک-انجمادی شدند. برای نگهداری کوتاه‌مدت، جدایه‌ها روی PDA داخل لوله‌های آزمایش به یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های قارچی با استفاده از کلیدهای شناسایی معتبر انجام شد (Bissett, 1984; Gams and Bissett, 1998; Mordue and Holliday, 1976; Kohn, 1979; Samuels et al., 2010). برای این منظور خصوصیات مورفولوژیکی جدایه‌ها شامل شکل و رنگ پرگنه، نحوه رشد آن، شکل، رنگ و ابعاد کنیدیوم و کنیدیوفور و مشخصات فیالیدها مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون کشت متقابل

قرص‌های پنج میلی‌متری از قارچ بیمارگر و هر کدام از جدایه‌های تریکودرما روی محیط کشت PDA در دو طرف تشتک پتری نه سانتی‌متری مقابل هم کشت داده

شدند و در تشتک پتری شاهد نیز در یک طرف قارچ بیمارگر و در مقابل آن قرص محیط کشت قرار داده شد. سپس تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به مدت چهار روز نگهداری و میزان رشد شعاعی قارچ‌ها در آن‌ها اندازه‌گیری گردید (Abassi et al., 2014; Dennis and Webster, 1971). میزان بازداری از رشد بیمارگر توسط جدایه‌های مختلف تریکودرما، به کمک معادله $I = [(C - T)/C] \times 100$ محاسبه گردید که در آن I: درصد بازدارندگی از رشد شعاعی اسکلروتینیا، C: میزان رشد شعاعی اسکلروتینیا در شاهد و T: میزان رشد شعاعی اسکلروتینیا در برابر جدایه‌های تریکودرما بود.

بررسی برهمکنش تریکودرما و بیمارگر در کشت روی اسلاید

ابتدا در وسط هر تشتک پتری ۹ سانتیمتری سترون، یک لام سترون قرار داده شد. سپس مقداری محیط کشت آگار به آن اضافه شد به طوری که لایه‌ای نازک از آگار روی لام را بپوشاند. بعد از بستن محیط کشت، در یک طرف تشتک پتری، یک قرص پنج میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه *S. sclerotiorum* و در طرف دیگر تشتک پتری یک قرص پنج میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه قارچ‌های آنتاگونیست کشت داده شد. برای هر جدایه آنتاگونیست سه تکرار در نظر گرفته شد. تشتک‌های پتری به انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند و بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت که هیف قارچ‌ها رشد کردند، نحوه تاثیر قارچ‌های آنتاگونیست روی قارچ عامل بیماری‌زا زیر میکروسکوپ بررسی شد و ساختمان ریسه‌هایی که به لام چسبیده بودند، مورد مطالعه قرار گرفت (Abdollahzadeh et al., 2006).

مطالعات گلخانه‌ای

در این آزمایش، شش جدایه از گونه‌های مختلف *Trichoderma* که در بررسی‌های آزمایشگاهی بیشترین تأثیر را در بازدارندگی از رشد *S. sclerotiorum* داشتند، شامل جدایه‌های ARCTr260، ARCTr262، ARCTr272، ARCtr281، ARCTr418 و ARCTr420 که از سه گونه *T. harzianum*، *T. viride* و *T. reesei* بودند برای مطالعات گلخانه‌ای انتخاب شدند. یکی دیگر از تیمارها شامل قارچکش تبوکونازول به میزان دو در هزار بود. اجرای آزمایش در شرایط طبیعی در داخل گلدان و در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و ۷ تیمار انجام شد. خاک مورد استفاده در گلدان‌ها مخلوطی از ورمی‌کمپوست و خاک زراعی بود و ۴۵ گلدان برای این کار در نظر گرفته شد. بذرهای کلزا به عمق دو سانتی‌متر در زیر خاک نرم قرار داده شدند و آبیاری انجام گرفت. در هر تیمار سه گلدان و در هر گلدان پنج بوته کلزا قرار گرفت. هم‌چنین شاهدهای مثبت و منفی برای آزمایش در نظر گرفته شد که در شاهد مثبت گلبرگ‌های آلوده به *S. sclerotiorum* بر روی برگ‌ها تیمار شد و در شاهد منفی ازگلبرگ‌های سالم و آب مقطر استفاده گردید. در این روش گلبرگ‌های گیاه کلزا در شرایط آزمایشگاهی و در زیر هود استریل جدا و با آب مقطر سترون ضدعفونی شدند و به داخل تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA که در وسط آن یک قرص پنج میلی‌متری از عامل بیماری قرار داشت، انتقال داده شدند و پس از سه روز و آلودگی گلبرگ‌ها به ریسه بیمارگر،گلبرگ‌های آلوده روی تعدادی از برگ‌های بوته‌ها در هر یک از گلدان‌ها به صورت تصادفی قرار داده شدند. برای مایه‌زنی تریکودرما، از سوسپانسیون تریکودرما با غلظت 10^8 اسپور در میلی‌لیتر (تنظیم شده با لام گلبول‌شمار) استفاده شد. گلدان‌های مایه‌زنی شده تا ۲۴ ساعت آبیاری نشدند. بوته‌های کلزا در مرحله گل‌دهی به دو صورت مایه‌زنی شدند: ۱۸ گلدان، ۲۴ ساعت قبل از مایه‌زنی بیمارگر و ۱۸ گلدان، ۲۴ ساعت قبل و بعد از

مایه‌زنی بیمارگر با سوسپانسیون حاصل از جدایه‌های *تریکودرما* مایه‌زنی شدند. بروز علائم بیماری در گیاهان از طریق مشاهدات بصری در اواخر مرحله پر شدن غلاف مورد بررسی قرار گرفت (Huang et al., 2000). برای تعیین شدت بیماری در بوته‌های آلوده، از مقیاس‌های معتبر موجود استفاده شد و برآن اساس: (۰): بدون بیماری، (۱): لکه‌های سطحی یا آلودگی شاخه‌های کوچک، (۲): آلودگی شاخه‌های بزرگ، (۳): حداقل ۵۰ درصد از ساقه اصلی به وسیله پوسیدگی احاطه شده بود، (۴): ساقه اصلی به وسیله پوسیدگی احاطه شده اما گیاه محصول خوبی تولید می‌کرد و (۵): احاطه شدن ساقه اصلی به وسیله پوسیدگی به‌طوری که گیاه محصول قابل برداشت نخواهد داشت (Bradley et al., 2003). میزان وقوع یا درصد آلودگی به بیماری که بیانگر تعداد بوته‌ها و برگ‌های بیمار نسبت به کل بوته‌ها و برگ‌های بررسی شده می‌باشد با استفاده از فرمول $I = \sum X / N$ به‌دست آمدکه در این معادله I بیانگر میزان وقوع بیماری، X بیانگر تعداد بوته‌ها و برگ‌های بیمار و N بیانگر تعداد کل بوته‌های ارزیابی شده بود (Cardoso et al., 2004). برای تعیین شدت بیماری از معادله $X = \sum(x_i n_i) / N.5$ استفاده شد که در آن x_i بیانگر درجه شدت بیماری، n_i بیانگر تعداد بوته‌های بیمار در درجه i ام بیماری و n تعداد کل بوته‌های بیمار بود (Cardoso et al., 2004). پس از محاسبه وقوع و شدت بیماری، به منظور اندازه‌گیری ارتفاع، وزن تر و وزن خشک، بوته‌های کلزا همراه با ریشه از خاک گلدان‌ها جدا شدند. در همه آزمایش‌ها برای اختصار از پیشوندهای P.A.S و P.S به‌ترتیب برای تیمارهای دومرحله‌ای و یک مرحله‌ای استفاده گردید. این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با هفت تیمار و سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها و و مقایسه میانگین صفات به روش دانکن و حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) به کمک نرم‌افزارهای SAS، SPSS و GGEbiplot و رسم نمودارها به کمک نرم افزار Excel انجام شد.

نتایج

از مجموع نمونه‌های خاک جمع‌آوری شده، ۷۱ جدایه تریکودرما به‌دست آمد که از این تعداد ۱۸ جدایه از مازندران، ۲۵ جدایه از گلستان، ۲ جدایه از فارس، ۲۰ جدایه از همدان و ۶ جدایه از استان لرستان بودند. براساس ریخت‌شناسی جدایه‌های تریکودرما در شش گروه مورفولوژیکی شامل *Trichoderma harzianum* Rifai، *T. atroviride* P. Karsten, Finl. Mögelsvamp، *T. viride* Persoon، *T. pseudokoningii* Rifai، *T. citrinoviride* Bissett و *T. reesei* E.G. Simmons قرار گرفتند که مشخصات آنها به‌طور خلاصه به شرح زیر بود:

گروه اول *Trichoderma harzianum* Rifai: پرگنه این جدایه‌ها دارای رشد سریع بود. رنگ پشت پرگنه‌ها در جدایه‌های مختلف بین سفید، کرم و زرد متغیر بود. ریسه‌ها به صورت هوایی و کرکی تا خوابیده و غوطه‌ور در محیط کشت بودند. الگوی انشعاب کنیدیوفور به صورت کم تراکم و منظم بود. فیالیدها آمپولی‌شکل تا تقریبا کروی بودند و اندازه آن‌ها ۳-۱×۱۰-۵ میکرومتر بود. فیالیدهای انتهایی بلندتر بوده و طول آن‌ها تا ۱۲ میکرومتر می‌رسید.کنیدی‌ها کروی، نیمه‌کروی تا تخم‌مرغی و بیضوی کوتاه و اندازه آن‌ها ۳-۱/۸×۴-۱/۸ میکرومتر و سطح‌شان صاف و به رنگ سبز روشن تا بی‌رنگ بود.

گروه دوم *Trichoderma atroviridae* P. Karsten, Finl. Mögelsvamp.: پرگنه‌ها دارای رشد نسبتاً سریع بودند و بعد از سه روز قطر رشد آن‌ها بر روی محیط کشت PDA در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به ۹۰

میلی‌متر رسید. ریسه‌ها بی‌رنگ و دارای دیواره صاف بودند. کنیدیوفورها درختچه‌ای و قابل انعطاف بودند. فیالیدها راست یا خمیده و غالباً در قسمت نوک قلاب‌مانند بودند. کنیدیوم‌ها نیمه‌کروی تا تخم‌مرغی و دارای دیواره صاف بودند. در انتهای فوقانی گرد و در پایه باریک و قدری نوک‌دار بودند. سطح کنیدیوم‌ها صاف و به رنگ سبز روشن تا بی‌رنگ بود.

گروه سوم *Trichoderma viride* Persoon: قطر پرگنه در PDA در تاریکی پس از ۷۲ ساعت در ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۴۰-۳۰ میلی‌متر، در دمای ۲۰ درجه، ۳۵-۲۵ میلی‌متر و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، ۲۵-۱۵ میلی‌متر بود و در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد رشد نکرد. کنیدیوفورها به طول ۱۵۰-۱۰۰ میکرومتر، با شاخه‌های جانبی جفتی یا غیرجفتی بودند. فیالیدها استوانه‌ای و تا حدودی وسط آن متورم و گاهی اوقات با گردن بلند، راست، قلابی یا سینوسی بودند، به طول (۱۶/۷-) ۱۱/۵-۷/۰ (-۴/۸)میکرومتر و عرض (۴/۰-) ۳/۵-۲/۵(-۱/۸) میکرومتر. کنیدیوم‌ها سبز تیره، نیمه‌کروی به ابعاد (۴/۸-)۴/۰-۳/۲ (-۲/۷) × (-۵/۰) ۴/۵-۳/۵ (-۳/۰) میکرومتر و با برآمدگی‌های واضح بودند.

گروه چهارم *Trichoderma pseudokoningii* Rifai: پرگنه‌ها دارای رشد سریع بوده و بعد از چهار روز قطر آن‌ها روی محیط کشت PDA در دمای ۳۰-۲۵ درجه‌سانتی‌گراد به ۷۰ تا ۹۰ میلی‌متر رسید. پرگنه‌ها ابتدا بی‌رنگ ولی بعد از اسپورزایی سفید و به تدریج سبز متمایل به خاکستری و در نهایت سبز تیره شدند. کنیدیوفورها در برخی دارای انشعابات فراوان و معمولاً شاخه‌ها به صورت دسته‌های دو تا سه‌تایی با زاویه‌های به نسبت باز از محور اصلی منشعب می‌شدند. فیالیدها تنگی-شکل و پایه آن‌ها باریک‌تر از قسمت میانی و به طرف نوک بود.

گروه پنجم *Trichoderma citrinoviride* Bissett: رنگ پرگنه‌ها روی محیط PDA سبز متمایل به زرد و سطح زیرین آنها زرد بود. کنیدیوفورها بی‌رنگ نسبتاً بلند و ایستاده، دارای انشعابات غالباً نامنظم و به ندرت به صورت جفتی و متقابل هستند که با محور اصلی تشکیل زاویه قائمه می‌دهند. فیالیدها تنگی‌شکل تا آمپولی‌شکل بودند. کنیدیوم‌ها مستطیلی تا بیضوی نسبتا منظم و دیواره آنها صاف و به رنگ سبز روشن بود.

گروه ششم *Trichoderma reesei* E.G. Simmons: پرگنه در محیط PDA در دمای کمتر از ۳۵ درجه سانتی‌گراد با میسلیوم‌های مجاور هم و خطوط شعاعی واضح و با میسلیوم‌های هوایی پنبه‌ای بود. کنیدیوفورها در امتداد هیف‌های هوایی تشکیل شدند که معمولا حاوی یک محور اصلی مشخص بود که فیالیدها به طور جداگانه از این قسمت به سمت نوک امتداد یافته بعد از آن از نوک، یک فیالید تک‌سلولی به علاوه شاخه‌های دارای چند سلول تشکیل می‌شدند و در انتهای هر شاخه یک یا دو فیالید قرار داشت.

کشت متقابل

در این ارزیابی با در نظر گرفتن فراوانی جدایه‌ها در بین گونه‌های مورد مطالعه، میانگین بازدارندگی از رشد شعاعی ریسه بیمارگر توسط گونه‌های مختلف *Trichoderma* متفاوت بود به طوری که *T. reesei* با یک جدایه و ۶۳/۸۱ درصد بازدارندگی، بهترین عملکرد را داشت و پس از آن *T. harzianum* با ۴۵ جدایه و میانگین ۵۵/۷۱ درصد بیشترین بازدارندگی را نشان داد. پس از این دو گونه، *T. pseudokoningii* با ۵۵/۶۹ درصد، *T. viride* با ۵۵/۶۵ درصد، *T. citrinoviride* با ۴۲/۸۶ درصد و *T. atroviride* با ۴۰/۸۰ درصد در ردیف‌های بعدی قرار گرفتند. براساس جدول تجزیه واریانس از نظر درصد بازدارندگی رشدی *S. sclerotiorum* بین جدایه‌های

تریکودرما اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۱٪ وجود داشت. مقایسه میانگین میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی *S. sclerotiorum* توسط جدایه‌های *Trichoderma* با استفاده از آزمون توکی نشان داد که جدایه‌های ARCtr281 و ARCTr272 متعلق به گونه *T. harzianum* با درصد مهار رشد میسلیومی به ترتیب به میزان ۸۹/۵۲ و ۸۹/۰۴ درصد بهترین کارآیی را داشته و با سایر جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ نشان دادند. ضعیف‌ترین جدایه‌ها در این روش، جدایه‌های ARCTr354 و ARCTr385 به‌ترتیب متعلق به گونه‌های *T. viride* و *T. atroviride* بودند که با ۳۰/۹۵۳ و ۳۱/۹۰۷ درصد بازدارندگی با سایر جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری داشتند (جدول ۱).

برهمکنش تریکودرما و بیمارگر در کشت روی اسلاید

در این روش از جدایه‌هایی استفاده گردید که در روش کشت متقابل بیشترین کارآیی را از خود نشان داده بودند. در ارزیابی جدایه‌هایی از *T. harzianum* علیه *S. sclerotiorum*، ریسه‌های *Trichoderma* در امتداد ریسه‌های *S. sclerotiorum* رشد کردند و در دو نقطه، حلقه‌ای به دور ریسه بیمارگر مشاهده گردید و ریسه *Trichoderma* به درون ریسه *S. sclerotiorum* رخنه نمود و علائم پارازیته‌کردن آشکار بود (شکل۱-A). در ارزیابی *T. atroviride* علیه *S. sclerotiorum*، پیچیدگی و حرکت ریسه‌های *Trichoderma* بر روی ریسه *S. sclerotiorum* مشاهده گردید و نفوذ ریسه‌های قارچ آنتاگونیست به داخل ریسه‌های قارچ بیماری‌زا کاملا ملموس بود (شکل۱-B). در بررسی *T. viride* علیه *S. sclerotiorum*، پیچیدگی و حرکت ریسه‌های *Trichoderma* بر روی ریسه *S. sclerotiorum* مشاهده گردید و در برخی نقاط با تشکیل قلاب‌هایی باعث توقف رشد ریسه *S. sclerotiorum* و فروپاشی آن گردید (شکل۱-C).

در ارزیابی *T. pseudokoningii* علیه *S. sclerotiorum*، پیچیدگی و حرکت ریسه‌های *Trichoderma* بر روی ریسه *S. sclerotiorum* مشاهده گردید و ریسه‌های قارچ آنتاگونیست به داخل ریسه‌های قارچ بیماری‌زا نفوذ کردند(شکل۱-D). در ارزیابی *T. citrinoviride* علیه *S. sclerotiorum*، حرکت مارپیچ ریسه *Trichoderma* بر روی ریسه عامل بیماری و پیچیدگی به دور آن قابل رویت بود و همچنین در برخی نقاط نفوذ به درون ریسه بیمارگر مشاهده گردید (شکل۱-E). در ارزیابی *T. reesei* علیه *S. sclerotiorum*، ریسه‌های *Trichoderma* در محل تقاطع بر روی ریسه‌های *S. sclerotiorum* رشد کرده و در برخی موارد به دور آن پیچیده و به نظر می‌رسد به درون ریسه قارچ عامل بیماری نفوذ کرده و در نهایت باعث لیزشدن و فروپاشی نقاط مذکور شده است (شکل۱-F).

بررسی‌های گلخانه‌ای

S. sclerotiorum دو روز پس از مایه‌زنی بر روی گیاه هدف، تثبیت شد و اولین علائم ظاهر گردید. مشاهدات نشان داد، تیمارهایی که به صورت دو مرحله‌ای (یک بار قبل و یک بار بعد از مایه‌زنی عامل بیماری) با جدایه‌های *Trichoderma* مایه‌زنی شده بودند از کارآیی بیشتری نسبت به تیمارهایی که به صورت یک مرحله‌ای (فقط بعد از مایه‌زنی عامل بیماری) مایه‌زنی شده بودند برخوردار هستند. در شاهد منفی قارچ بیمارگر وجود نداشت و علائمی ظاهر نشد. در تیمار شاهد مثبت که تنها حاوی*S. sclerotiorum* بود. بیشترین میزان آلودگی به بیماری و تعداد سختینه بیمارگر مشاهده گردید. میزان درصد وقوع نسبی بیماری در برگ‌ها نشان داد که کمترین میزان وقوع بیماری در برگ متعلق به تیمار با قارچکش و پس از آن در تیمار با P.A.S281 (از گونه *T. harzianum*) به‌ترتیب به میزان ۲۵ و ۳۴/۳۳ درصد وجود داشت.

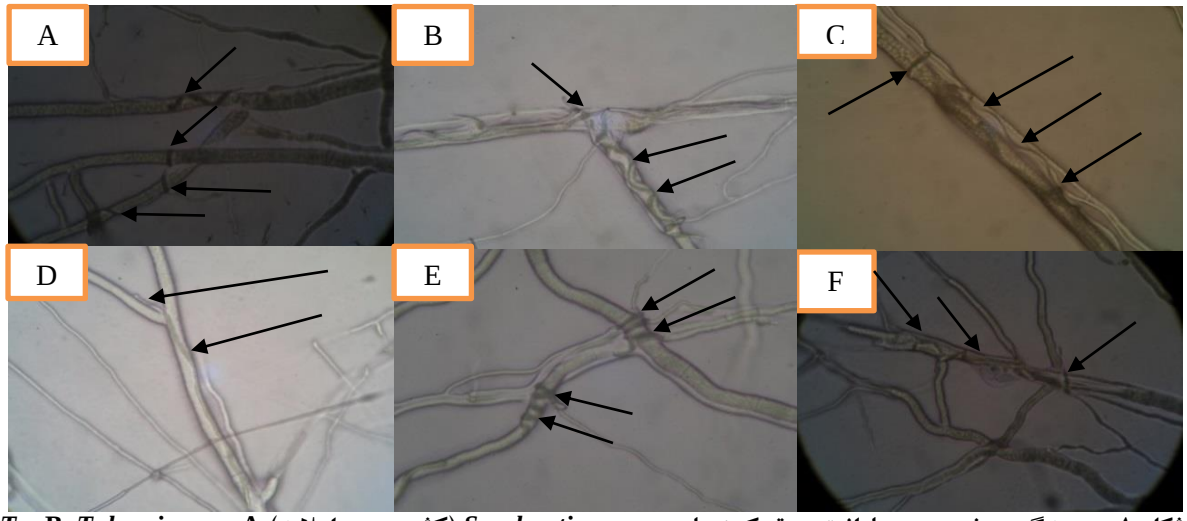
جدول ۱- مقایسه میانگین‌های بازدارندگی رشد با استفاده از آزمون توکی در روش کشت متقابل

Table 1. Comparison of means of growth inhibition by Tukey test in dual culture method

ISO	N	Mean	Tukey Grouping	ISO	N	Mean	Tukey Grouping
281	3	89.523	a	392	3	51.903	Piqhrjsotkulvmgn
272	3	89.047	ab	393	3	51.430	Piqhrjsotkuwlvmn
260	3	81.430	cab	340	3	51.427	Piqhrjsotkuwlvmn
418	3	74.283	cdb	341	3	50.003	Piqrjsotkuwlvmn
420	3	68.093	Cde	390	3	50.000	Piqrjsotkuwlvmn
416	3	67.620	Cdfe	395	3	50.000	Piqrjsotkuwlvmn
421	3	66.667	Cdfeg	353	3	49.523	Piqrjsotkuwlvmn
425	3	65.713	Hdfeg	398	3	49.047	Piqrjsotkuwlvmn
262	3	63.813	Ihdfeg	383	3	48.097	Pqxrjsotkuwlvmn
422	3	62.857	Ihjdfeg	339	3	48.097	Pqxrjsotkuwlvmn
348a	3	62.380	ihjdkfeg	331	3	48.093	Pqxrjsotkuwlvmn
436	3	61.907	Ihjdkfeg	346	3	47.617	Pqxrsotkuwlvmn
413	3	61.430	Ihjdkfleg	334	3	46.663	Pqxrsotuwlvmyn
424	3	60.953	Ihjdkflemg	348b	3	46.190	Pqxrsotuwvmyn
423	3	60.950	Ihjdkflemg	350	3	45.713	Pzqxrsotuwvyn
428	3	60.950	Ihjdkflemg	332	3	45.713	Pzqxrsotuwvyn
427	3	60.000	Ihjdkflemgn	335	3	45.713	Pzqxrsotuwvyn
417	3	60.000	Ihjdkflemg	329	3	45.713	Pzqxrsotuwvyn
439	3	60.000	Ihjdkflemgn	336	3	44.763	Pzqxrsotuwvy
432	3	59.047	Ihjokflemgn	380	3	44.763	Pzqxrsotuwvy
429	3	59.047	Ihjokflemgn	352	3	44.283	Pzqxrsotuwvy
433	3	58.573	Ihjokflemgn	338	3	43.333	Pzqxrstuwvy
387	3	58.570	Ihjokflmgn	397	3	42.860	Zqxrstuwvy
437	3	58.097	Pihjokflemgn	326	3	42.857	Zqxrstuwvy
431	3	57.617	Piqhjokflemgn	313	3	41.907	Zxrstuwvy
430	3	57.143	Piqhjokflemgn	391	3	40.477	Zxstuwvy
409	3	56.667	Piqhrjokflemgn	327	3	40.000	Zxtuvy
415	3	55.240	Piqhrjsokflemgn	323	3	39.997	Zxtuwvy
426	3	55.240	Piqhrjsokflemgn	320	3	39.047	Zxuwvy
382	3	54.760	Piqhrjsotkflemgn	322	3	38.097	Zxwvy
438	3	53.810	Piqhrjsotkuflemgn	325	3	38.093	Zxwvy
384	3	53.810	Piqhrjsotkuflemgn	321	3	36.667	Zxwy
379	3	53.810	Piqhrjsotkuflemgn	389	3	33.333	Zxy
414	3	53.333	Piqhrjsotkuflemgn	385	3	31.907	Zy
388	3	52.857	Piqhrjsotkuflvmgn	354	3	30.953	Z
330	3	52.383	Piqhrjsotkulvmgn	-	-	-	-

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ ندارند.

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at P=0.01 level.



شکل ۱- پیچیدگی هیفی و هیپرپارازیتیسم تریکودرما روی *S. sclerotiorum* (کشت روی اسلاید) A: *T. harzianum*، B: *T. atroviride*، C: *T. viride*، D: *T. pseudokoningii*، E: *T. citrinoviride*، F: *T. reesei*، (با بزرگ‌نمایی تقریبی ۴۰۰ برابر)

Figure 1. Hyphal coiling and hyperparasitism of *Trichoderma* on *S. sclerotiorum* (slide culture method): A) *T. harzianum*, B) *T. atroviride*, C) *T. viride*, D) *T. pseudokoningii*, E) *T. citrinoviride*, F) *T. reesei* (× 400), Scale bars = 1 µm

تیمار شاهد مثبت با ۱۰۰ درصد و پس از آن تیمار با P.S418 (از گونه *T. harzianum*) به میزان ۹۳/۳۳ درصد بیشترین میزان وقوع بیماری در برگ را نشان دادند. میزان درصد وقوع نسبی بیماری در ساقه نشان داد که کمترین میزان وقوع نسبی بیماری در ساقه متعلق به تیمارهای قارچ‌کش و تیمار P.A.S281 (از گونه *T. harzianum*) به میزان ۳۳/۳۳ درصد و بیشترین وقوع بیماری در ساقه متعلق به تیمارهای شاهد مثبت، P.S262 (از گونه *T. reesei*)، P.S272 (از گونه *T. harzianum*)، P.S418 و P.S420 (هر دو از گونه *T. harzianum*) به میزان ۱۰۰ درصد بود. میزان درصد شدت بیماری در برگ‌ها نشان داد که شدت بیماری در تیمارهای قارچ‌کش و P.A.S281 به ترتیب به میزان ۵/۶۶ و ۸ درصد کمترین میزان را داشته و بیشترین شدت بیماری در تیمارهای شاهد مثبت و تیمار P.S418 به ترتیب به میزان ۹۵ و ۵۷ درصد بوده است. هم‌چنین کمترین شدت بروز بیماری در ساقه متعلق به تیمارهای قارچ‌کش و P.A.S281 به ترتیب به میزان ۲/۶۶ و ۴ درصد و بیشترین میزان درصد شدت بیماری در ساقه متعلق به تیمارهای شاهد مثبت و P.S420 به ترتیب به میزان ۹۶ و ۶۵ درصد بود. سپس تیمارهایی که در آن‌ها مایه‌زنی به صورت دو مرحله‌ای انجام شده بود نسبت به تیمارهای یک مرحله‌ای از کارآیی بهتری در کاهش میزان وقوع بیماری در برگ، وقوع بیماری در ساقه، شدت بیماری در برگ و شدت بیماری در ساقه برخوردار بودند (جدول ۲). بهترین عملکرد گونه‌های تریکودرما در کاهش میزان وقوع بیماری، کاهش میزان شدت بیماری و کاهش جمعیت اسکروت در تیمارهای P.A.S281، P.A.S272، P.A.S260، P.A.S262، P.A.S418 و P.A.S420 بود که با شاهد قارچ‌کش تفاوت چندانی نداشتند و پس از آن تیمارهای P.S281، P.A272، P.A260، P.A262، P.A418 و P.A420 در مقایسه با شاهد مثبت از تأثیر خوبی برخوردار بودند. براساس آزمون ناپارامتری کروسکال‌والیس در مورد میزان وقوع و شدت نسبی بیماری در ساقه و برگ‌های گیاه کلزا اختلاف معنی‌داری در سطح آماری ۱٪ بین تیمارهای آزمایش وجود داشت. لازم به ذکر است که در این میان جدایه ۲۶۰ از گونه *T. viridae*، جدایه ۲۷۲ از گونه *T. reesei* و بقیه جدایه‌ها از گونه *T. harzianum* بودند.

جدول ۲- میانگین درصد وقوع و شدت بیماری در برگ‌ها و ساقه‌های تیمار شده با جدایه‌های مختلف *Trichoderma* و *S. sclerotiorum*

Table 2. Means of disease incidence and disease severity percent in inoculated leaves and stems with *Trichoderma* spp. isolates and *S. sclerotiorum*

Treatments	Symptoms on leaves		Symptoms on stems	
	Disease incidence	Disease severity	Disease incidence	Disease severity
P.S260	65	37.3	93.3	53.3
P.A.S260	43.3	14	60	22.6
P.S262	75	41.3	100	50.6
P.A.S262	51.6	18	66.6	17.3
P.S272	73.3	43.6	100	52
P.A.S272	41.6	9.6	33.3	8
P.S281	58.3	32.6	93.3	45.3
P.A.S281	33.3	8	13.3	4
P.S418	93.3	57	100	61.3
P.A.S418	36.6	9.3	26.6	8
P.S420	86.6	53	100	65.3
P.A.S420	58.3	18	46.6	16
FUNGICIDE	25	5.6	13.3	2.6
PO.CHECK	100	95.3	100	96

تأثیرگذاری قارچ‌های مورد مطالعه بر صفات مورفولوژیک گیاه کلزا در شرایط گلخانه

براساس جدول تجزیه واریانس در مورد صفات ارتفاع، وزن تر و وزن خشک بین تیمارهای مورد آزمایش در سطح ۱٪ اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بیشترین میزان ارتفاع بوته در بین گروه‌های آزمایشی مورد بررسی (شاهدها و تیمارها)، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار متعلق به تیمارهای P.A.S272، P.A.S418، P.A.S260، P.A.S281 و شاهد قارچ‌کش بود که با شاهد مثبت اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۳). بیشترین میزان وزن تر اندام هوایی در بین گروه‌های آزمایش مورد بررسی (شاهد و تیمارها)، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار به ترتیب اولویت متعلق به تیمارهای P.A.S281، قارچ‌کش، شاهد منفی، P.A.S260 و P.A.S272 بود که با تیمارهای P.S418، P.S272، P.S420 و شاهد مثبت اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۳). بیشترین وزن خشک اندام هوایی در بین گروه‌های آزمایش مورد بررسی (شاهد و تیمارها)، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار متعلق به تیمارهای P.A.S281، شاهد منفی و قارچ‌کش بود که با تیمارهای P.S418، P.S272، P.S420 و شاهد مثبت اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۳). بیشترین میزان وزن تر ریشه در بین گروه‌های آزمایش مورد بررسی (شاهدها و تیمارها)، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار متعلق به تیمارهای قارچ‌کش، شاهد منفی و P.A.S281 بود که با P.S418 و شاهد مثبت اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۳). بیشترین وزن خشک ریشه در بین گروه‌های آزمایش مورد بررسی (شاهدها و تیمارها)، بر اساس آزمون حداقل اختلاف معنی‌دار متعلق به تیمارهای شاهد منفی، قارچ‌کش و P.A.S281 بود که با تیمارهای P.S 418، P.A.S260 و شاهد مثبت اختلاف معنی‌داری را نشان دادند (جدول ۳).

جدول ۳- گروه‌بندی تیمارها بر اساس صفات مورد بررسی به روش حداقل اختلاف معنی‌دار

Table 3. Grouping treatments based on traits studied by LSD method

T	M1	t Grouping	T	M2	t G	T	M3	t G	T	M4	t G	T	M5	t G
P.A.S272	70.48	a	P.A.S281	25.01	a	P.A.S281	12.60	a	FUNGICID	3.81	a	N.CHECK	1.98	t
P.A.S418	69.48	ab	FUNGICID	24.42	ab	N.CHECK	12.32	a	N.CHECK	3.78	a	FUNGICID	1.92	a
P.A.S260	66.45	cab	N.CHECK	24.13	ab	FUNGICID	12.11	a	P.A.S281	3.78	a	P.A.S281	1.91	a
P.A.S281	66.23	cadb	P.A.S260	23.02	cab	P.A.S272	11.38	ab	P.A.S420	3.53	ab	P.A.S272	1.88	ab
FUNGICID	65.90	cadb	P.A.S272	22.78	cadb	P.A.S420	10.80	cb	P.A.S260	3.52	cab	P.A.S262	1.74	cab
P.A.S420	64.80	cedb	P.A.S418	22.46	cdb	P.A.S262	10.47	cb	P.A.S272	3.45	cadb	P.A.S420	1.65	cadb
P.S281	64.20	cedb	P.A.S262	22.06	cedb	P.A.S418	10.46	cb	P.A.S418	3.45	cadb	P.A.S418	1.62	cadbe
P.S272	63.73	ced	P.A.S420	21.42	ced	P.A.S260	9.75	cd	P.A.S262	3.34	cadbe	P.S281	1.46	cfdbe
P.A.S262	63.08	ced	P.S262	20.41	ed	P.S262	8.87	ed	P.S420	2.79	cfdbe	P.S272	1.38	cfde
N.CHECK	62.93	ced	P.S260	19.55	ef	P.S260	8.70	fed	P.S281	2.77	cfdbe	P.S262	1.35	cfde
P.S260	62.26	ced	P.S281	17.47	gf	P.S281	8.41	fed	P.S272	2.72	cfde	P.S420	1.27	fde
P.S418	60.81	edf	P.CHECK	16.25	g	P.CHECK	7.78	feg	P.S262	2.64	fde	P.S260	1.25	fde
P.S262	59.63	ef	P.S420	16.22	g	P.S420	7.61	fhg	P.S260	2.59	fe	P.CHECK	1.23	fde
P.S420	56.63	f	P.S272	15.05	gh	P.S272	7.31	hg	P.CHECK	2.46	f	P.A.S260	1.21	fe
P.CHECK	45.73	g	P.S418	13.10	h	P.S418	6.42	h	P.S418	2.09	f	P.S418	1.05	f

T: تیمارها، M1: ارتفاع، M2: وزن تر اندام هوایی، M3: وزن خشک اندام هوایی، M4: وزن تر ریشه، M5: وزن خشک ریشه. در همه موارد میانگین صفات بیان شده است و تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ٪۵ ندارند.

M1: height, M2: fresh weight of aerial, M3: dry weight of aerial, M4: fresh weight of root, M5: dry weight of root. In all cases, the average traits are expressed and treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at P=0.05 level.

تجزیه به مولفه‌های اصلی

برای تعیین نقش هر یک از صفات در تنوع موجود میان جدایه‌ها تجزیه به مولفه‌های اصلی انجام شد. مولفه‌های حاصل از تجزیه به مولفه‌های اصلی، شامل مقادیر ویژه، درصد واریانس و درصد واریانس تجمعی برای مولفه های ۱ و ۲ در جدول ۴ آمده است. مقادیر ویژه هر دو مولفه از ۱ بیشتر بود. نتایج حاصل از تجزیه به مولفه های اصلی نشان داد که دو مولفه اول در مجموع ۸۵/۸۰ درصد تنوع کل موجود بین داده ها را توجیه می نمایند (جدول ۴). سهم هر کدام از دو مولفه اول به ترتیب ۰/۷۶ و ۰/۰۹ بود و مجموعا حدود ۸۵ درصد از تنوع موجود در داده های اولیه را توجیه نمود. بزرگی این اعداد در تفکیک بهتر جدایه‌ها و اعتبار بالای روابط مشاهده شده تاثیر می‌گذارد. در صورتی که در بین جدایه‌ها همبستگی یا مشابهت‌هایی وجود داشته باشد این مولفه‌ها قادر خواهند بود تا گروه‌بندی مناسبی را به‌وجود آورده و جدایه‌های مشابه را در گروه‌های مجزا تفکیک نمایند. مقادیر نسبی ضرایب بردارهای ویژه در مولفه اول نشان داد که صفات وزن خشک اندام هوایی و وزن تر ریشه مهم‌ترین صفات در گروه‌بندی جدایه‌ها بودند. در مولفه دوم ارتفاع بوته مهم‌ترین صفت بود (جداول ۴ و ۵). جدول ۵ همبستگی بین هر صفت با صفات دیگر را نشان می‌دهد: به طور مثال وزن خشک اندام هوایی با ارتفاع بوته همبستگی مثبت در سطح آماری ۵ درصد داشت، بدین معنی که با افزایش ارتفاع بوته وزن خشک اندام هوایی افزایش پیدا کرده است. وزن تر اندام هوایی با وزن خشک اندام هوایی هبستگی مثبت در سطح آماری یک درصد داشته و معنی‌دار بود. در این جدول می‌توان دید که کدام دو صفت بیشترین همبستگی را با هم داشتند.

جدول٤- مقادیر ویژه، درصد واریانس، درصد واریانس تجمعی و ضرایب بردارهای ویژه مربوط به صفت‌های مورد مطالعه

Table 4. Eignvalue, Proportion, Cumulative and coefficients eigenvectors related to traits studied

Traits	Prin1	Prin2
Dry weight of aerial	0.30	-.27
Height	0.25	0.49
Fresh weight of aerial	0.30	-.19
Fresh weight of root	0.31	-.20
Dry weight of root	0.27	-.29
Eigenvalue	9.15	1.13
Proportion	0.76	0.09
Cumulative	0.76	0.85

جدول ۵- ضرایب همبستگی بین صفت‌های مورد بررسی در شرایط گلخانه‌ای

Table 5. Correlation coefficients between traits studied in greenhouse condition

Traits	Dry weight of aerial	Height	Fresh weight of aerial	Fresh weight of root	Dry weight of root
Dry weight of aerial	1				
Height	0.54*	1			
Fresh weight of aerial	0.95**	0.56*	1		
Fresh weight of root	0.93**	0.60*	0.91**	1	
Dry weight of root	0.90**	0.51*	0.78**	0.84**	1

n.s., * and **: not significance, significance at the 5% and 1% probability level, respectively

بحث

در این تحقیق، جدایه‌های تریکودرما در آزمون کشت متقابل باعث بازدارندگی از رشد بیمارگر *S. sclerotiorum* به میزان ۴۰ الی ۹۰ درصد شدند که این بازدارندگی از رشد به ترتیب مربوط به جدایه‌های ARCTr354 (*T. viride*) و ARCTr281 (*T. harzianum*) بود. این نتایج مشابه یافته‌های تحقیقات Radwan et al. (2006) و Kucuk and Kivanc (2004) بود. وجود هاله شفاف در آزمون‌های کشت متقابل جدایه‌های آنتاگونیست و بیمارگر در زمان‌های مختلف آزمایش حاکی از بازداری رشد رویشی *S. sclerotiorum*، پیش‌روی، کلونیزه‌کردن و اسپورزایی جدایه‌های تریکودرما در سطح پرگنه بیمارگر در اثر میکوپارازیتیسم بود.

Merat et al. (2005) در سطح آزمایشگاهی در مورد مکانیزم کنترل *S. sclerotiorum* عامل خشکیدگی سرشاخه‌ها و جوانه‌های توت، مطالعاتی انجام دادند و مشخص گردید *T. harzianum* در آزمایش اثر کشت متقابل در کنترل قارچ عامل بیماری، از نظر تولید بیشتر متابولیت‌های فرار در جلوگیری از رشد پرگنه عامل بیماری و تاثیر لیزکنندگی سختینه‌ها، نسبت به سایر گونه‌های تریکودرما کارآیی بهتری داشت. طبق تحقیقات Tu (1980) گونه‌ها و جدایه‌های مختلف تریکودرما دارای قدرت رقابتی ساپروفیتی مناسبی در برابر گونه‌های مختلف *Sclerotinia* بوده و از این طریق از رشد پرگنه آن جلوگیری کرده و شروع به اسپورزایی روی هیف‌ها نموده و مانع از تشکیل سختینه‌های این قارچ می‌شوند، همان‌طور که در پژوهش حاضر در روش کشت متقابل، جدایه‌های *T. harzianum* از رشد پرگنه *S. sclerotiorum* جلوگیری کردند.

در روش کشت روی اسلاید، پیش‌روی ریسه‌های *Trichoderma* در امتداد ریسه‌های بیمارگر مشاهده گردید که دارای کشش و تروپیسم مثبت بودند که این کشش را می‌توان به وجود مواد شیمیایی در دیواره ریسه قارچ بیمارگر نسبت داد، پیچش به دور ریسه‌ها، حلقه‌های به‌دام اندازنده و نفوذ به درون سلول‌های آن، تشخیص لکتین موجود در دیواره سلولی بیمارگر و همچنین لیز شدن

سلول‌های هیفی بیمارگر مشاهده گردید. Abdullah et al. (2008) فعالیت میکوپارازیتی گونه *T. harzianum* را علیه *S. sclerotiorum* با استفاده از میکروسکوپ الکترونی (SEM) در ناحیه تقابل ریسه‌ای بررسی کردند و مشخص شد که این قارچ با تولید ساختارهای قلاب مانند[1] به داخل سلول‌های هیفی بیمارگر نفوذ کرده و آن‌ها را منهدم می‌کند که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد. Elad et al. (1980) وجود چنین ساختارهایی را در جدایه آنتاگونیست *T. harzianum* شناسایی کردند.

در این مطالعه، *S. sclerotiorum* روی کلزا بیماری‌زا بود و علائم ابتدا ۴۸ ساعت پس از مایه‌زنی در برگ‌ها مشاهده شد و به طور مداوم با گذشت زمان افزایش یافت که نتایج این آزمایش در مورد بیماری‌زایی مطابق با مشاهدات Garcia and Juliatti (2012) بود. جدایه‌های استفاده شده در سطح گلخانه، چهار جدایه از گونه *T. harzianum* و دو جدایه از گونه‌های *T. viride* و *T. reesei* بودند. در شرایط گلخانه تیمارهایی که به صورت دو مرحله‌ای استفاده شده بودند از کارآیی بیشتری نسبت به تیمارهای یک مرحله‌ای برخوردار بودند. در این مرحله تیمار با جدایه P.A.S281 از گونه *T. harzianum* به عنوان بهترین تیمار در کنترل درصد وقوع و شدت بیماری در برگ‌ها و ساقه بود که با شاهد قارچ‌کش تفاوت معنی‌داری نداشت. در اینجا بهترین و بدترین عملکرد در بین تیمارهای گلخانه در گونه *T. harzianum* مشاهده شد که این امر می‌تواند تأثیر متفاوت جدایه‌های مختلف از یک گونه را نشان دهد. بیشتر سویه‌های *Trichoderma* باعث افزایش ماده خشک اندام هوایی در آزمایش کنترل بیولوژیکی در حضور بیمارگر شدند. بنابراین، گیاهان کلزا در بستر آلوده *S. sclerotiorum* در حضور سویه‌های *Trichoderma* رشد بهتری داشتند که نشان‌دهنده پتانسیل این سویه‌ها در کاهش اثرات زیان‌آور بیمارگر بود. نتایج مشابهی توسط Ojaghian et al. (2009) به دست آمد که نشان داد که چندین گونه از *Trichoderma* باعث کاهش شدت بیماری ناشی از *S. sclerotiorum* روی سیب زمینی (*Solanum tuberosum* L.) در آزمایش گلخانه‌ای و همچنین کاهش بیماری در شرایط مزرعه‌ای شدند.

در بررسی‌های گلخانه‌ای، تیمار با جدایه‌های P.A.S281 و P.A.S.272 از گونه *T. harzianum* موجب افزایش ارتفاع، وزن‌تر و خشک اندام هوایی و ریشه، در حضور قارچ بیمارگر شد که صفت‌های اندازه‌گیری شده در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* در مواردی مانند ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام هوایی از شاهد منفی (گیاهان بدون بیماری) و شاهد قارچ‌کش عملکرد بهتری داشت که نشانگر خاصیت تحریک‌کنندگی *T. harzianum* در رشد اندام هوایی و عملکرد گیاه کلزا بود که این امر با تحقیقات Ousley et al. (1993) مطابقت داشت، این محققان مشاهده کردند که برخی از سویه‌های *Trichoderma* می‌توانند باعث افزایش جوانه‌زنی بذر کاهو و همچنین افزایش رشد گیاه شوند. به گفته این نویسندگان، نتایج به شدت به سویه، روش استفاده از مایه تلقیح و آماده‌سازی آن بستگی داشت. در مطالعه دیگری مشخص گردید که *S. sclerotiorum* می‌تواند به طور متوسط باعث کاهش ۴۶ درصدی ماده خشک اندام هوایی گیاهان سویا پس از تلقیح بذرها با پاتوژن شود (da Silva Botelho et al., 2013). با این حال، اثر مثبت گونه‌های *Trichoderma* بر رشد گیاهان سویا در حضور *S. sclerotiorum* توسط Guareschi et al. (2012) گزارش شده است که در تحقیق خود دریافتند که افزایش ماده خشک سیستم ریشه تا ۴۴/۹ درصد، ۶۰ روز پس از ظهور اتقاق افتاد. به‌علاوه گزارش‌هایی در مورد

1- Hook like

افزایش رشد توسط *Trichoderma* spp. در غیاب بیمارگرها برای سایر گونه‌های گیاهی مانند گوجه‌فرنگی (Fontenelle et al., 2011)، لوبیا معمولی، خیار و *Arabidopsis* sp. وجود دارد (Pedro et al., 2012).

دو جدایه ARCTr282 و ARCTr272 متعلق به گونه *T. harzianum* علاوه بر تاثیر خوب در روش‌های آزمایشگاهی، بهترین عملکرد را در کاهش میزان وقوع و شدت بیماری در برگ‌ها و ساقه کلزا داشته‌اند که جدایه ARCTr282 از نظر کاهش میزان وقوع و شدت نسبی بیماری در برگ‌ها به ترتیب به میزان ۳۷ درصد و ۸ درصد و کاهش میزان وقوع و شدت بیماری در ساقه به میزان ۳۶ درصد و ۴ درصد بیشترین کارآیی را در کاهش شدت بیماری داشت و به عنوان بهترین جدایه در سطح آزمایشگاه و گلخانه معرفی می‌گردد. نتایج مربوط به این بررسی و مطالعات انجام شده توسط سایر محققان بیانگر این است که میزان تاثیر جدایه‌های مختلف تریکودرما روی قارچ اسکلروتینیا در شرایط آزمایشگاه و گلخانه متفاوت بود که این اختلاف می‌تواند مربوط به نوع گونه، منشاء جغرافیایی و تنوع ژنتیکی جدایه‌های مورد آزمایش باشد.

سپاس‌گزاری

بدین وسیله از موسسه غیرانتفاعی دیلمان لاهیجان و دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت برای حمایت‌های لازم از این تحقیق قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Abassi, S., Safaie, N., Shamsbakhsh, M., and Shahbazi, S. 2014. Evaluation of antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* mutants against some plant pathogenic fungi *in vitro*. Journal of Plant Protection, 37(4): 91-102.

Abdollahzadeh, J., Mohammadi Golpteh, A. and Rouhani, H. 2006. Investigation of biocontrol of crown and root rot of sunflower (*Sclerotinia sclerotiorum*) by *Trichoderma* species in laboratory condition. Journal of Agricultural Science, 12 (1): 43-55. (in Farsi with English abstract).

Abdullah, M, T., Ali, N, Y., and Suleman, P. 2008. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary with *Trichoderma harzianum* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Crop Protection, 27(2): 1354-1359.

Aghajani, M. A., Safaei, N., and Alizadeh, A. 2008. Temporal study of *Sclerotinia* stem rot of canola in Golestan province. Proceeding of the 18th Iranian Plant Protection Congress, Hamedan, Iran. P. 51.

Alavi Rad, S. 2016. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of tobacco collar rot by antagonistic fungi in Guilan province. M.Sc. Thesis, Daylaman University of Lahijan. Iran.

Almomani, F., Alhawatema, M., and Hameed, K. 2013. Detection, identification and morphological characteristic of *Macrophomina phaseolina*: the charcoal rot disease

pathogens isolated from infected plants in Northern Jordan. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 46(9): 1005-1014.

Barari, H., and Dalili, A. 2016. Antagonistic effects of *Trichoderma* spp. in the control of *Sclerotinia sclerotiorum* and in comparison with chemical fungicides. Journal of Plant Diseases, 4(2): 13-26. (in Farsi with English summary).

Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sec. nov. Canadian Journal of Botany, 62(5): 924-931.

Bradley, C. A., Endres, G., Hanson, B., Henson, B., McKay, K., Halvorson, M., Porter, P., and LeGare, D. 2003. Evaluations of fungicides for control of *Sclerotinia* stem rot of canola in North Dakota and Minnesota. NDSU Extension Service.

Cardoso, J. E., Santos, A. A., Rossetti, A. G., and Vidal, J. C. 2004. Relationship between incidence and severity of cashew guminosis in semiarid north-eastern Brazil. Plant Pathology, 53: 363-367.

da Silva Botelho, L., Antonio Zancan, W. L., da Cruz Machado, J., and Noly Barrocas, E. 2013. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Seed Science, 35(2):153-160.

Dennis, C., and Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III, hyphal interaction. Transactions of the British Mycological Society Journal, 57(3): 363-369.

Elad, Y., Chet, I., and Katan, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: A biocontrol agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 70(2): 119-121.

Fontenelle, A. D. B., Guzzo, S. D., Lucon, C. M. M., and Harakava, R. 2011. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. Crop Protection, 30(11): 1492-1500.

Gams, W., and Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. In: Kubicek, C. P., Harman, G. E., (eds), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Volume 1: Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor and Francis Ltd., London. pp. 3-34.

Garcia, R. A., and Juliatti, F. C. 2012. Evaluation of the resistance of soybean to *Sclerotinia sclerotiorum* in different phenological stages and periods of exposure to the inoculum. Tropical Plant Pathology, 37(3): 196-203.

Guareschi, R. F., Perin, A., Macagnan, D., Tramontini, A., and Gazolla, P. R. 2012. Employment of *Trichoderma* spp. in the control of *Sclerotinia sclerotiorum* and in the promotion of vegetative growth in the sunflower and soybean crops. Global Science and Technology, 5: 1-8.

Haddad, P. E., Leite, L. G., Mantovanello Lucon, C. M., and Harakava, R. 2017. Selection of *Trichoderma* spp. strains for control of *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 52(12): 1140-1148.

Huang, H. C., and Erickson, R. S. 2007. Biological control of *Sclerotinia* stem rot of canola using *Ulocladium atrum*. Plant Pathology Bulletin, 16: 55-59.

Huang, H. C., Bremer, E., Hynes, R. K., and Erickson, R. S., 2000. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Biological Control, 18: 270 – 276.

Jones, D., Gordon, A. H., and Bacon, J. S. D. 1974. Cooperative from parasitic, Fungi in the degradation of cell wall glucans of. Biochemical Journal, 140: 47-55.

Kohn, L. M. 1979. Delimitation of economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. Phytopathology, 69: 881-886.

Kucuk, C., and Kivanc, M. 2004. *In vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum.* Turkish Journal of Biology, 28: 111-115.

Li, G. Q., Huang, H. C., and Acharya, S. N. 2003. Antagonism and biocontrol potential of *Ulocladium atrum* on *Sclerotinia sclerotiorum*. Biological Control, 28(1): 11-18.

Li, G. Q., Huang, H. C., Miao, H. J., Erickson, R. S., Jiang, D. H., and Xiao, Y. N. 2006. Biological control of *Sclerotinia* diseases of rapeseed by aerial applications of the mycoparasite, *Coniothyrium minitans*. European Journal of Plant Pathology, 114(4): 345-355.

Mahdi Alamdarloo, R., and Gharagozloo, K. 2003. Stem white rot of canola. Proceeding of the 1th Congress on Research and Development of Canola, Gorgan, Iran. P. 34.

Matroudi, S., Zamani, M. R., and Motallebi, M. 2009. Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. Egyptian Journal of Biology, 11: 37-44.

Merat, A., Moghaddam, S. A. M., and Rohani, H. 2005. Study on antagonistic effect of *Trichoderma* spp. from Guilan province (Iran) on *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of bud and twig die-back of mulberry trees. Proceeding of the 14th Iranian Plant Protection Congress, Isfahan, Iran. P. 402.

Mohammadzadeh, J. 2015. Study of the effect of solvent and enzymatic extraction methods on the quality of rapeseed oil and protein. Iranian Journal of Oilseed Plants, 4(1): 23-32. (in Farsi with English abstract).

Mordue, J. E. M., and Holliday, P. 1976. *Sclerotinia sclerotiorum*. Descriptions of pathogenic fungi and bacteria, CMI, Kew, Surrey, UK.

Ojaghian, S. M. R., Zafari, D., and Khodakaramian, G. 2009. Biological control of *Sclerotinia sclerotiorum*, the causal agent of potato white mold by different *Trichoderma* spp. and *Coniothyrium minitans*. Journal of Sustainable Agricultural Science, 2(1): 107-119. (in Farsi with English summary).

Ousley, M. A., Lynch, J. M., and Whipps, J. M. 1993. Effect of *Trichoderma* on plant growth: a balance between inhibition and growth promotion. Microbial Ecology, 26(3): 277-285.

Pedro, E. A., de S Harakava, R., Lucon, C. M. M., and Guzzo, S. D. 2012. Promotion of bean growth and control of anthracnose by *Trichoderma* spp. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 47(11): 1589-1595.

Phillips, A. J. L. 1990. Fungi associated with sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* in South Africa and their effects on the pathogen. Review of Plant Pathology, 69(4): 17-70.

Radwan, M. B., Fadel, A. M., and Mohammad, I. A. M. 2006. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine. Hebron University Research Journal, 2(2): 27- 47.

Saharan, G. S., and Mehta, N. 2008. *Sclerotinia* disease of crop plants: Biology, ecology and disease management. Springer Netherlands.

Samuels, G. J., Chaverri, P., Farr, D. F., and McCray, E. B. 2010. *Trichoderma*, Online, Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. http://nt.ars-grin.gov/taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm.

Steadman, J. R. 1979. Control of plant diseases caused by *Sclerotinia* species. Phytopathology, 69: 904-907.

Trutmann, P., and Keane, P. J. 1990. *Trichoderma koningii* as a biocontrol agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in southern Australia. Soil Biology and Biochemistry, 22(1): 43-50.

Tu, J. C. 1980. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasites of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathology, 70(7): 670-674.

© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/).

Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture), 42(2), Summer, 2019

Biological control of crown rot disease of canola by isolates of *Trichoderma in vitro* and under greenhouse conditions

M. R. Safari Motlagh[1]* and M. Abolghasemi[2]

1. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran (ssafarimotlagh@yahoo.com, safarimotlagh@iaurasht.ac.ir)
2. Former M.Sc. student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Deylaman Institute for Higher Education, Lahijan, Iran

(DOI): 10.22055/ppr.2019.14743

Received: 23 December 2018 Accepted: 9 June 2019

Abstract

Background and Objectives

Crown rot disease caused by *Sclerotinia sclerotiorum*, is one of the major diseases of canola worldwide. Biological control is a control method in agriculture for living organisms, especially fungi and bacteria, and is used in order to control plant damages caused by harmful factors.

Materials and Methods

In this research, we evaluated the effect of seventy one isolates of *Trichoderma* spp. against *S. sclerotiorum* using various *in vitro* methods including dual culture and slide culture methods. Based on the obtained results of *in vitro* studies, six *Trichoderma* isolates and Tebuconazole fungicide were selected in order to study their potentials for controlling the crown rot disease in greenhouse. For this purpose, rapeseed petals were inoculated with *S. sclerotiorum* and inoculation of suspensions of *Trichoderma* isolates was done after inoculation of pathogen and also before and after its inoculation and then the severity of the disease was determined in the studied treatments.

Results

Based on obtained results, in dual culture, ARCTr281 (*T. harzianum*) was the most effective isolate for inhibition of mycelial growth. In hyperparasitism test, all isolates of *T. harzianum* hade successful performance in controlling the pathogen and coiling of *Trichoderma* was observed around the hyphae of *S. sclerotiorum*. Lowest disease incidence and severity of disease was observed in the negative control (without *Sclerotinia* and *Trichoderma*). Inoculated fungi in two stages, effectively were able to reduce the incidence and severity of disease in leaves and stems that ARCTr281 (*T. harzianum*) was the most effective fungus under greenhouse conditions. Also, the use of *Trichoderma* isolates in two stages in presence of pathogen caused an increase in height, fresh and dry weight of the shoot and root under greenhouse conditions. Analysis of variance and comparing the average characters by Least Significant Difference (LSD), Duncan and nonparametric method showed significant difference between used fungi in dual culture and greenhouse studies.

Discussion

According to the results of biocontrol studies under laboratory and greenhouse conditions, ARCTr281 and ARCTr272 fungal isolates belonging to *T. harzianum* were the most effective antagonists for control of canola's crown rot disease. The results of this study indicated that different isolates of *Trichoderma* can be considered as potential antagonists for the management of canola's crown rot disease.

Keywords: Biological control, crown rot, Sclerotinia sclerotiorum, canola, Trichoderma isolates