



مهار زیستی بیماری پوسیدگی سفید ساقه بادام زمینی با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست در استان گیلان

محمد رضا صفری مطلق* و مریم فرخزاد^۲

۱- *نویسنده مسوول: دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران (safarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir)

۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۰۳

چکیده

بیماری پوسیدگی سفید ساقه با عامل *Sclerotium rolfsii* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاک‌زاد بادام زمینی است که در سطح وسیعی از مزارع کشت بادام زمینی استان گیلان به‌ویژه در زمان برداشت شایع می‌شود. به‌کارگیری میکروارگانیسم‌های مفید، روش جایگزین برای استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی است. در این پژوهش اثر سه جدایه از *Trichoderma spp.*، سه جدایه از *Penicillium spp.*، دو جدایه از *Aspergillus spp.* و یک جدایه از *Cladosporium cladosporioides* روی بیمارگر *S.rolfsii* با استفاده از روش‌های کشت متقابل، کشت روی اسلاید، متابولیت‌های فرار و متابولیت‌های غیر فرار در آزمایشگاه مورد بررسی قرار گرفت. در آزمایش‌های گلخانه‌ای، گیاهان بادام زمینی با این جدایه‌های قارچی همراه با *S. rolfsii* ماه‌زنی شدند و صفاتی مانند شدت بیماری، ارتفاع، وزن تر و وزن خشک گیاه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که در روش کشت متقابل، *T. harzianum* و *T. virens* به ترتیب با ۹۳/۵۸ درصد و ۹۲/۹۴ درصد بیشترین توانایی را در مهار رشد میسلیمیومی *S. rolfsii* داشتند. در روش کشت اسلاید، تمامی جدایه‌ها به‌جز *T. virens* و *T. viride* در مهار ریشه‌های *S. rolfsii* موفق بودند. در آزمون متابولیت فرار، *P. glabrum* و *A. flavus* به ترتیب با ۸۱/۲۵ درصد و ۷۵ درصد و در آزمون متابولیت غیر فرار *T. harzianum* و *T. viride* به ترتیب با ۹۷/۵ و ۹۳/۷۵ درصد بیشترین توانایی را در مهار رشد میسلیمیومی *S. rolfsii* نشان دادند. همچنین اثرات این قارچ‌ها روی میزان مهار بیمارگر *S. rolfsii* در مطالعات گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که *P. glabrum* با ۳۹/۴ درصد و *T. viride* با ۳۸/۸ درصد موثرترین قارچ‌ها در کاهش وقوع و شدت بیماری بودند. همچنین به‌کارگیری این قارچ‌های آنتاگونیست در شرایط گلخانه منجر به افزایش ارتفاع بوته، وزن تر و خشک اندام هوایی و ریشه در حضور قارچ عامل بیماری گردید. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین صفات با استفاده از روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، اختلاف معنی‌داری بین قارچ‌های مورد مطالعه در روش‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای را نشان داد. نتایج این تحقیق نشان‌دهنده این مطلب بود که قارچ‌های *A. flavus*، *P. glabrum*، *T. harzianum*، *T. viride* و *C. cladosporioides* موجود در زیستگاه طبیعی گیاه بادام زمینی خواص بالقوه‌ای برای مهار زیستی بیماری پوسیدگی سفید ساقه بادام زمینی از خود نشان می‌دهند.

کلید واژه‌ها: بادام زمینی، ترکیبات فرار، شاخص‌های فیزیولوژیکی، شدت بیماری، *Sclerotium rolfsii*

دبیر تخصصی: دکتر رضا مستوفی‌زاده قلمفرسا

مقدمه

بادام زمینی بعد از سویا، یکی از مهم‌ترین و اقتصادی‌ترین دانه‌های روغنی در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است که بیشتر به منظور تولید روغن (۴۳ تا ۵۵ درصد) و پروتئین (۲۵ تا ۲۸ درصد) کشت می‌شود. روغن دانه‌ی بادام زمینی سومین روغن مهم در جهان است و به عنوان بهترین روغن حاصل از دانه‌های روغنی که خاصیت فساد آن از سایر روغن‌ها کمتر است، شناخته شده است (Safarzadeh Vishgahi & Hosseinzadeh, 2009). سطح زیر کشت بادام زمینی در ایران هم اکنون در حدود ۵ هزار هکتار و میزان تولید آن ۲/۵ هزار تن دانه است. از این مقدار در حدود ۲۸۰۰ هکتار آن در استان گیلان و بقیه در استان‌های گلستان و خراسان شمالی واقع شده است (Safarzadeh Vishgahi & Hosseinzadeh, 2009; Anonymous, 2015).

بیماری پوسیدگی سفید طوقه و ساقه یکی از مهم‌ترین بیماری‌های بادام زمینی است که عامل آن یعنی *Sclerotium rolfsii* Sacc. خاکزاد بوده و سال‌ها به صورت سختینه در خاک باقی می‌ماند. علائم بیماری به صورت لکه‌های رنگ پریده در ناحیه طوقه پدیدار و به طور معمول در ساقه‌های آب‌دار به صورت لکه‌های قهوه‌ای تیره دقیقاً در زیر سطح خاک بروز می‌کند که این ساقه‌ها ممکن است فرو افتند. ابتدا برگ‌های پایین و سپس برگ‌های بالایی به سرعت زرد یا پژمرده می‌شوند و از بالا به پایین می‌خشکند. تخریب اغلب آوندها موجب پژمردگی قسمت‌های هوایی گیاه می‌شود. سختینه‌های تولید شده توسط قارچ مهم‌ترین عامل زمستان‌گذرانی آن می‌باشند (Agrios, 2005). در جنوب ایالات متحده آمریکا *S. rolfsii* یکی از مهم‌ترین بیمارگرهایی است که به بادام زمینی حمله می‌کند. خسارت این بیماری در آمریکای جنوبی ۱۰ الی ۵۰ درصد و در هندوستان منجر به کاهش ۲۷ درصدی و در استرالیا باعث ایجاد خسارت بالای ۲۵ درصد

در محصول نهایی برداشت شده می‌شود (Okhovat, 2006). این بیماری یکی از بیماری‌های محدودکننده کشت بادام زمینی در اواخر فصل رشد در استان گیلان به ویژه منطقه آستانه اشرفیه است (Ershad, 2009). در مزارعی که شدت آلودگی زیاد است، میزان خسارت از ۱۰ تا ۲۵ درصد متغیر و گاهی به بیش از ۸۰ درصد نیز می‌رسد. مهار این قارچ به دلیل دامنه میزبانی وسیع و تولید تعداد زیاد سختینه‌های زمستان‌گذران مقاوم مشکل است (Punja, 1985). از مهم‌ترین دلایل ناکارآمدی و یا عدم موفقیت روش‌های شیمیایی، زراعی و استفاده از ارقام مقاوم، تنوع ژنتیکی قارچ عامل بیماری است (McDonald & Linde, 2002) و بر این اساس اهمیت استفاده از روش‌های نوین و سازگار با محیط زیست در مهار بیماری‌های گیاهی مانند مهار زیستی نمود بیشتری پیدا می‌کند. روش‌های مهار بیماری‌های گیاهی سازگار با محیط زیست چنانچه درست و در زمان مناسب به کار گرفته شوند، از اثرات ناخوشایند استفاده از سموم شیمیایی و قارچ‌کش‌ها به طرز قابل توجهی می‌کاهند و تهدیدات کمتری را متوجه محیط زیست و دیگر میکروارگانیسم‌های مفید موجود در طبیعت می‌سازند (Punja & Grogan, 1983).

کارآیی جدایه *Trichoderma harzianum* Rifai روی سختینه‌های عامل بیماری پوسیدگی ساقه چغندر ناشی از *S. rolfsii* و چگونگی تلاشی نمودن آنها مورد بررسی قرار گرفت و با به کارگیری *T. harzianum* درون خاک مایه‌زنی شده با عامل بیماری، شدت بیماری در چغندر قند کاهش یافت و همین جدایه قارچی در شرایط آزمایشگاهی موجب تلاشی شدن میسلیم‌های *S. rolfsii* گردید (Upadhyay & Mukhyopadhyay, 1986). به کارگیری تناوب زراعی با استفاده از گیاهانی مانند پیاز و سیر و کاربرد هم‌زمان *T. harzianum* و افزودن ۰/۲ درصد قارچ‌کش کاربندازیم به خاک، به طرز چشمگیری

پوسیدگی طوقه و نیز افزایش درصد جوانه زنی بذر گوجه فرنگی تیمار شده گردید (Islam et al., 2016). جدایه‌هایی از گونه‌های *Trichoderma*، *Aspergillus* و *Penicillium* برای مهار *S. rolfii* مورد استفاده قرار گرفتند و بر این اساس جدایه *Trichoderma* spp. بیشترین بازدارندگی در رشد بیمارگر را نشان داد و پس از آن جدایه‌های *Aspergillus* spp. و *Penicillium* spp. قرار گرفتند (Bosah et al., 2010). مهار بیماری پوسیدگی سفید ساقه، تیمار بذر توسط جدایه *T. harzianum*، چند سویه از باکتری *Pseudomonas fluorescens* و قارچ کش کاپتان عملکرد متوسطی در مهار بیماری پوسیدگی سفید ساقه یا عامل *S. rolfii* داشت (Vikram & Hamzehzarghani, 2011).

گونه‌های *Trichoderma viride* (Bonord.) و *T. hamatum* Bain. در کاهش رشد میسلومی و نیز شدت بیماری پوسیدگی سفید ساقه فلفل ناشی از *S. rolfii* موثر بودند (Bindu Madhavi & Bhattiprolu, 2011). گونه‌های مختلف *Trichoderma* در کشت متقابل آزمایشگاهی نتایج متفاوتی را در مهار رشد شعاعی میسلوم‌ها و اجزای تشکیل دهنده سختینه *S. rolfii* از خود بروز دادند و در این میان متابولیت‌های فرار *T. viride* بیشترین تأثیر مهاری را از خود نشان دادند و همچنین *T. harzianum* و *T. viride* بالاترین میزان و *T. longibrachiatum* Rifai کمترین میزان مهار رشد شعاعی میسلوم بیمارگر در روش کشت متقابل را نشان دادند (Darvin & Kumari, 2013; Rekha et al., 2012). در آزمایشی دیگر در مهار زیستی بیماری پوسیدگی طوقه خیار با استفاده از پنج نوع کمپوست، مشخص شد که عصاره سترون نشده به‌جا مانده از کمپوست (حاوی جدایه‌های *Aspergillus* spp. و *Penicillium* spp. و *Cheatomium* spp.) دارای اثر بازدارندگی روی بیمارگر هستند (Sabet et al., 2013).

باعث جلوگیری از خسارت به بادام زمینی در اثر *S. rolfii* شد و جمعیت سختینه‌های قارچ نیز به میزان قابل توجهی کاهش یافت (Asghari & Maei, 1991). مطالعه مهار زیستی بیماری پوسیدگی طوقه و ساقه سویا با عامل *S. rolfii* با استفاده از *T. aureoviride* Rifai و قارچ کش تبوکونازول نشان داد که شدت بیماری در گیاهانی که در خاک تیمار شده با جدایه آنتاگونیست کاشته شده بودند، کاهش یافت. در روش تیمار تلفیقی نیز استفاده هم‌زمان عامل زیست‌مهار و قارچ کش در شرایط گلخانه میزان عملکرد و وزن هزار دانه سویا را افزایش داد (Dharmaputra, 1994). گونه‌ی *Trichoderma viride* در آزمایشگاه نسبت به دما و pHهای مختلف واکنش‌های متفاوتی در مهار رشد میسلومی *S. rolfii* از خود نشان داد به طوری که در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۴ = pH قادر به مهار *S. rolfii* بود و گونه‌های *T. harzianum* و *T. viride* نیز بیشترین تأثیر را در بازدارندگی رشد میسلومی *S. rolfii* در شرایط آزمایشگاهی دارا بودند (Radwan et al., 2006). در مطالعه‌ای تأثیر هم‌زمان قارچ *T. harzianum* و چند سویه از باکتری همزیست *Rhizobium* spp. روی *S. rolfii* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که هم قارچ و هم باکتری قدرت بازدارندگی قابل ملاحظه‌ای روی رشد بیمارگر داشتند و در شرایط گلخانه‌ای تیمار گیاه با ترکیبی از قارچ و باکتری به کاهش شدت بیماری و افزایش رشد گیاه منجر گردید (Gancsan et al., 2007). در بررسی مهار زیستی عامل بیماری سوختگی جنوبی گوجه فرنگی یعنی *S. rolfii* با استفاده از *T. koningii* Oudem. تیمار بذر گیاه با این قارچ و سپس کاشت آنها در گلدان، علائم بیماری و تعداد سختینه‌های بیمارگر را به طور معنی‌داری کاهش داد، هم‌چنان‌که تیمار بذر گوجه فرنگی با جدایه‌های مختلفی از *Trichoderma* موجب کاهش موثر شدت بیماری

برای جداسازی قارچ *S. rolfsii*، قطعاتی به طول ۵-۲ میلی‌متر از حد فاصل بین بافت آلوده و سالم در برگ، ساقه، میوه و غلاف تهیه گردید. ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت یک دقیقه و سپس سه بار شستشوی سطحی با آب مقطر سترون به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. پس از آبگیری، قطعات روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز، آگار (PDA) (Riker & Riker, 1936) در تشتک پتری قرار گرفتند و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس درون انکوباتور به مدت سه روز نگهداری شدند. خالص‌سازی جدایه‌ها به روش نوک ریشه انجام شد. سپس تشتک‌های پتری در ۲۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. حدود ۷-۱۰ روز پس از کشت، سختینه‌های قارچ تشکیل گردیدند. سپس این سختینه‌ها جمع‌آوری و پس از آبگیری روی کاغذ صافی، به میکروتیوب‌های سترون منتقل و در ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند (Mehri et al., 2013).

جداسازی جدایه‌های آنتاگونیست مورد مطالعه، از بافت سالم برگ، ساقه، طوقه و میوه بیمار برش‌هایی به اندازه ۱-۰/۵ سانتی‌متر انجام شد. سپس این برش‌ها با آب مقطر سترون به مدت ۳۰ ثانیه شست‌و‌شو داده شدند و پس از آبگیری، به تشتک‌های پتری سترون حاوی PDA در زیر هود سترون انتقال یافتند. پس از نگهداری تشتک‌های پتری در انکوباتور ۲۶ درجه سلسیوس به مدت ۳-۲ روز، جداسازی پرگنه‌های قارچی انجام گرفت و قرصی از هر پرگنه به تشتک پتری دیگری حاوی محیط کشت PDA انتقال یافت. پس از انتقال مجدد به انکوباتور و نگهداری به مدت ۳-۲ روز، قطعه‌ای از پرگنه قارچی به محیط کشت آب-آگار ۱/۵ درصد (Booth, 1971) انتقال یافت و پس از ۳-۲ هفته و تولید اسپور، خالص‌سازی قارچ با روش تک‌اسپور کردن انجام شد. برای نگهداری جدایه‌های قارچی، از لوله‌های آزمایش مورب حاوی محیط کشت PDA استفاده شد.

گزارش گردید که گونه‌های *A. niger* Tiegh. و *Penicillium* sp. و نیز گونه‌هایی از *T. viride*، *Aspergillus niger*، *Curvularia* sp. *harzianum*، *T. virens* (J.H. Miller, Giddens)، *Fusarium* sp. *T. pseudokoningii* Rifai & A.A. Foster) Arx. در شرایط آزمایشگاهی از عوامل بازدارنده مؤثر در مهار رشد میسلیمی *S. rolfsii* محسوب می‌گردند (Basumatary et al., 2015; Nawar et al., 2013; Parmar et al., 2015). نتایج تحقیقات دیگری نشان داد که مایه‌زنی بذر بادام زمینی با قارچ‌ریشه‌های همزیست همراه با *T. viride* تأثیر زیادی در تحریک رشد و افزایش سطح جذب مواد مغذی در ناحیه فراریشه گیاه و نیز صدمات ناشی از بیماری پوسیدگی سفید ساقه دارد (Doley et al., 2016).

هدف از این تحقیق بررسی عملکرد جدایه‌های مختلف قارچ‌های آنتاگونیست جمع‌آوری شده از زیستگان طبیعی گیاه بادام زمینی از نظر میزان کارآیی و سودمندی در کاهش رشد میسلیمی و شدت بیماری پوسیدگی سفید ساقه بادام زمینی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای بود.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری، جداسازی و خالص‌سازی

کلیه نمونه‌برداری‌ها در این تحقیق از گیاهان بادام‌زمینی دارای علائم بیماری و سالم از مناطق عمده کشت بادام‌زمینی استان گیلان شامل آستانه اشرفیه، کياشهر، لشت‌نشاء، تالش، لیسار و رضوانشهر انجام شد. نمونه‌های جمع‌آوری شده از اندام‌های آلوده گیاهی (ساقه، طوقه، برگ، میوه و غلاف) هر کدام به طور جداگانه درون کیسه پلاستیکی قرار داده شدند و با چسباندن برچسب (حاوی اطلاعات محل نمونه‌برداری و تاریخ جمع‌آوری)، به آزمایشگاه منتقل و در ۴-۵ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند.

شناسایی جدایه‌های قارچی

پس از جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها، شناسایی قارچ‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناختی انجام شد. برای این منظور خصوصیات ماکروسکوپی آنها همچون شکل و رنگ پرگنه و نحوه رشد روی محیط PDA مورد بررسی قرار گرفت. سپس خصوصیات میکروسکوپی آنها هم‌چون نحوه رشد میسلیم‌ها، منفرد یا گروهی بودن کنیدیوفورها، رنگ و ابعاد آنها، طول، عرض، تعداد دیواره‌های عرضی، شکل و اندازه کنیدیوم‌ها روی محیط کشت آب- آگار (WA) با تهیه اسلایدهای میکروسکوپی و با استفاده از کلیدهای معتبر شناسایی (Punja & Grogan 1983; Gams & Bisset, 1998; Pitt & Hocking, 2009; Amaike & Kelle, 2011; Bensch et al., 2012) انجام شد. در مرحله بعد و برای شناسایی مولکولی ابتدا DNA ژنومی براساس روش (Zhong and Steffenson 2001) استخراج شد. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) با استفاده از جفت آغازگر ITS1/ITS4 برای تکثیر ناحیه ITS-rDNA توسط دستگاه ترموسایکلر مدل Biorad- icycler انجام شد (White et al., 1990). برنامه دمایی PCR برای تکثیر ناحیه ژنومی rDNA-ITS بر اساس روش (White et al. 1990) به کار رفت و الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. محصولات تکثیر شده، برای خالص‌سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت بایونیر در کره جنوبی فرستاده شدند. ارزیابی تشابه توالی‌های به دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI GenBank) با استفاده از ابزار جستجوی BLAST انجام شد.

آزمون بیماری‌زایی

بررسی بیماری‌زایی ۱۶۶ جدایه قارچی به دست آمده در آزمایشگاه گیاه پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت انجام گرفت. برای این منظور مقداری خاک مزرعه و

کمپوست به نسبت مساوی پس از سترون‌سازی در در دستگاه اتوکلاو به گلدان‌های پلاستیکی با قطر ۱۵ سانتی‌متر انتقال داده شد. به دنبال آن مقداری بذر رقم NC2 بادام زمینی به مدت یک ساعت با کلراکس ۳۰ درصد ضدعفونی شد. در هر گلدان یک بذر جوانه‌دار شده بادام زمینی در عمق ۳ الی ۵ سانتی‌متری خاک سترون کاشته شد و گلدان‌ها آبیاری و داخل گلخانه قرار داده شدند. حدود ۱۴ الی ۱۶ روز پس از کشت بادام زمینی هنگامی که گیاهچه‌ها از نظر رشدی به مرحله چهار تا شش برگی رسیدند مایه‌زنی قارچ‌های آنتاگونیست به نسبت 4×10^6 اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر سترون از هر یک از قارچ‌های مذکور پس از اضافه کردن توئین -۲۰ به نسبت ۱٪، صورت گرفت. اطراف طوقه هر گیاه بادام زمینی در هر گلدان حدود ۱۰ عدد بذر سورگوم (مایه‌زنی شده با بیمارگر) قرار داده شد (Sennoi et al., 2012). علائم چشمی بیماری از یک هفته پس از مایه‌زنی تا اتمام دوره بلوغ گیاه به‌طور روزانه ثبت گردید. طیف دمایی گلخانه در طول آزمایش در دمای ۲۷ درجه سلسیوس و رطوبت بیش از ۹۰ درصد (رطوبت اشباع) بود و آبیاری متناسب با نیاز گیاه انجام شد (Yaqub & Shahzad, 2005). در نهایت ۱۶ جدایه قارچی که در گیاهان مورد آزمایش هیچ‌گونه علائم بیماری ایجاد نکردند به‌عنوان جدایه‌های منتخب آنتاگونیست و در مورد قارچ بیمارگر *S. rolfisii* نیز جدایه‌ای که روی گیاه بیشترین تأثیر را به‌واسطه بروز علائم ماکروسکوپی از خود نشان داد و دارای بالاترین شدت بیماری بود، برای مطالعات مهار زیستی انتخاب گردیدند.

مطالعات مهار زیستی در آزمایشگاه

روش کشت متقابل

در این روش یک قرص میسلیمی به قطر پنج میلی‌متر که از قسمت‌های حاشیه‌ای کشت پنج تا هفت روزه *S. rolfisii* گرفته شده بود در زیر هود سترون درون یک

کشت داده شدند و به مدت ۱۰ روز روی دستگاه لرزا با سرعت ۷۰ دور در دقیقه در ۲۶ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. سپس با استفاده از صافی‌های زیستی با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرومتر (Millipore England) و پمپ خلاء عصاره‌گیری انجام شد. این عصاره فیلترشده با رقت ۲۵ درصد به محیط کشت PDA اضافه شد. در تشتک‌های پتری شاهد، عصاره‌ای که به محیط کشت PDA اضافه شد، فاقد هرگونه قارچی بود. یک قرص میسلومی از کشت سه روزه *S. rolfsii* در مرکز تشتک‌های پتری تیمار و شاهد قرار گرفت. پس از هفت روز قرارگیری در ۲۶ درجه سلسیوس، رشد قطری بیمارگر در شاهد و تیمار اندازه‌گیری شد (Dennis & Webster, 1971b).

روش کشت قارچ روی لام

ابتدا یک لام آزمایشگاهی (اسلاید) تمیز روی دو میله شیشه‌ای L شکل در درون یک تشتک پتری ۱۲ سانتی‌متری قرار داده شد و سترون گردید. سپس مقداری از محیط کشت آب آگار دو درصد مذاب روی اسلاید ریخته شد تا یک لایه‌ی نازک آگار روی آن تشکیل شود. قرص‌های میسلومی کوچکی از قارچ آنتاگونیست مورد نظر و *S. rolfsii* در فاصله‌ی دو سانتی‌متری از یکدیگر روی اسلاید قرار داده شدند. برای هر جدایه آنتاگونیست سه تکرار در نظر گرفته شد و سپس تشتک‌های پتری در ۲۶ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از هفت روز و در زیر میکروسکوپ نوری، ویژگی‌هایی همچون رسیدن ریشه‌های قارچی به یکدیگر و تأثیر متقابل آن‌ها روی یکدیگر مورد مطالعه قرار گرفت (Sivakumar et al., 2000).

مطالعات مهار زیستی در گلخانه

مقداری بذر بادام زمینی از رقم NC2 (اهدایی مدیریت حفظ نباتات جهادکشاورزی شهرستان آستانه اشرفیه)، به مدت یک ساعت در کلراکس ۳۰ درصد ضدعفونی و با

تشتک پتری هشت سانتی‌متری حاوی PDA به فاصله دو سانتی‌متری از دیواره تشتک پتری قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت نگهداری در انکوباتور ۲۶ درجه‌ی سلسیوس، یک قرص میسلومی به قطر پنج میلی‌متر که از کناره‌های کشت ۵-۷ روزه قارچ‌های آنتاگونیست گرفته شده بود، در فاصله سه سانتی‌متری از قارچ بیماری‌زا قرار گرفت. تشتک‌های پتری در دمای ۲۶ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند و اندازه‌گیری رشد میسلومی قارچ بعد از هفت روز انجام گرفت. در تشتک‌های شاهد، یک قرص میسلومی از کناره‌های کشت ۵-۷ روزه‌ی *S. rolfsii* در شرایط سترون در مرکز یک تشتک پتری هشت سانتی‌متری قرار گرفت و شرایط نگهداری مانند تیمارها بود (Sivakumar et al., 2000). در پایان دوره نگهداری، رشد قطری *S. rolfsii* در شاهد و تیمار اندازه‌گیری گردید. کاهش رشد قطری در مقایسه با شاهد بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهار رشد میسلومی} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

در این فرمول C میزان رشد قطری *S. rolfsii* در تشتک‌های پتری شاهد و T رشد قطری بیمارگر در حضور قارچ‌های مورد مطالعه بود (Sivakumar et al., 2000).

آزمون تأثیر متابولیت‌های فرار (گازی)

این آزمون بر اساس روش (Dennis and Webster 1971a) انجام شد و میزان بازداری از رشد بیمارگر توسط جدایه‌های قارچی مختلف مورد مطالعه محاسبه گردید.

بررسی اثر بازدارندگی رشد ترکیبات غیرفرار (عصاره کشت)

در این آزمون در فلاسک‌های ارلن ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت Potato Dextrose Broth (PDB) (Burgess & Hepworth, 1996) جدایه‌هایی از قارچ‌های مورد آزمایش (آنتاگونیست)

شد که در آن اثر نه قارچ آنتاگونیست با *S. rolfsii* بررسی شد. علاوه بر آن سه تیمار شاهد وجود داشت که شامل آب مقطر، قارچ بیمارگر و قارچ‌های آنتاگونیست بود. تغییرات و علائم چشمی ایجاد شده توسط *S. rolfsii* یک هفته تا ۱۰ روز پس از مایه‌زنی روی گیاه به صورت روزانه ثبت گردید (Yaqub & Shahzad, 2005). برای تعیین شدت بیماری از مقیاس هورسفال و بارت (Horsfall & Barrat, 1945) با اندکی تغییرات استفاده شد. برای تعیین شدت بیماری در هر گیاه از شاخص شدت بیماری استفاده گردید (Le et al., 2012) و در مرحله بعد، شدت بیماری با استفاده از فرمول زیر کمی گردید:

$$\text{شدت بیماری} = \frac{(N1 \times 1) + (N2 \times 2) + \dots + (Nt \times t)}{N1 + N2 + \dots + Nt}$$

که در این فرمول N بیانگر تعداد طوقه (ساقه) در هر یک از درجات شدت بیماری بود (Bertrand & Gottwald, 1997).

برای تعیین میزان وقوع یا درصد آلودگی بیماری که بیانگر تعداد بوته‌ها و ساقه (طوقه) بیمار نسبت به کل بوته‌ها و ساقه‌های بررسی شده است از فرمول زیر استفاده شد:

$$I = \sum X / N$$

که در این فرمول I بیانگر میزان وقوع بیماری، X بیانگر تعداد بوته‌ها و ساقه یا طوقه بیمار و N بیانگر تعداد کل بوته‌های ارزیابی شده بود (Cardoso et al., 2004).

تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مربوط به مطالعات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در قالب فایل اکسل تنظیم و تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش حداقل اختلاف معنی‌دار LSD صورت گرفت.

آب مقطر سترون سه بار شست و شو داده شد. به‌منظور جوانه‌زنی بذور، بذور به مدت ۷۲ ساعت در محیط مرطوب با دمای 25 ± 2 سلسیوس قرار گرفتند. ۱۳۰ عدد گلدان پلاستیکی با قطر ۱۵ سانتی‌متر تهیه و درون آنها به نسبت مساوی خاک مزرعه و کمپوست ریخته شد. در هر گلدان یک بذر جوانه‌دار شده بادام زمینی کاشته شد و گلدان‌ها آبیاری و داخل گلخانه قرار داده شدند. دمای گلخانه در طول مدت انجام آزمایش ۲۷-۳۱ درجه سلسیوس و میزان رطوبت ۵۰ تا ۷۰ درصد بود و آبیاری به صورت منظم انجام شد. حدود ۱۴ الی ۱۶ روز پس از کشت بادام زمینی هنگامی که گیاهچه‌ها از نظر رشدی به مرحله چهار تا شش برگی رسیدند مایه‌زنی قارچ‌های آنتاگونیست روی آنها صورت گرفت (Sennoi et al., 2012).

برای تهیه مایه تلقیح *S. rolfsii* از روش Sennoi et al. (2012) استفاده شد. برای تهیه مایه‌ی تلقیح قارچ‌های آنتاگونیست ابتدا با استفاده از اسلاید گلوبول‌شمار، سوسپانسیون اسپوری شامل 10^8 ، 10^6 ، 10^4 و 10^2 اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر سترون به ترتیب برای جدایه‌های گونه‌های *Penicillium Aspergillus Trichoderma* و *C. cladosporioides* تهیه گردید که به‌منظور مایه‌زنی مصنوعی روی گیاه مورد استفاده قرار گرفت. بعد از اسپورپاشی گلدان‌های هر قطعه به‌طور جداگانه توسط پوشش پلاستیکی پوشانده شد. مایه‌زنی قارچ‌های آنتاگونیست بلافاصله پس از مایه‌زنی بیمارگر انجام گرفت و برای افزایش جذب سطحی نیز توئین ۲۰ به نسبت یک درصد به کار رفت. به‌منظور اندازه‌گیری میزان شدت، وقوع بیماری و همچنین کاهش شدت بیماری از طرح کاملاً تصادفی با نه تیمار (در چهارسطح) و سه تکرار استفاده گردید. اندازه‌گیری صفات ریخت‌شناختی گیاه یعنی ارتفاع، وزن تر و وزن خشک نیز بر پایه طرح کاملاً تصادفی انجام

نتایج

ارزیابی وضعیت تاکسونومیکی جدایه‌های قارچی بر اساس صفات ریخت‌شناختی و مولکولی

پس از شناسایی مقدماتی، از مجموع ۱۶۶ جدایه قارچی به دست آمده در سطح جنس، تعداد ۱۶ جدایه قارچی که در آزمایش بیماری‌زایی در بادام زمینی بیماری ایجاد نکردند برای مطالعات بیماری‌زایی و مهار زیستی در آزمایشگاه انتخاب و از میان این جدایه‌ها، نه جدایه برتر برای مطالعات گلخانه‌ای انتخاب گردیدند و مورد شناسایی در سطح گونه با استفاده از روش‌های ریخت‌شناختی و مولکولی قرار گرفتند. جدایه‌های شناسایی شده در ۱۰ گروه قارچی به ترتیب زیر قرار گرفتند (جدول ۱):

Sclerotium rolfsii (GCA_000988865.1)
Trichoderma viride, *Trichoderma harzianum*
Trichoderma virens (GCA_007896495.1)
 (GCA_002901145.1), (GCA_001835465.1)
Cladosporium cladosporioides Link (Fresen.)
Aspergillus niger (GCA_000002855.2)
Aspergillus flavus Link (GCA_001576635.1)
Penicillium glabrum (Wehmer) Westling
Zalessky و *Penicillium fellutanum* Biourge
Penicillium waksmanii

مطالعات مهار زیستی در شرایط آزمایشگاهی

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس بین تیمارهای مورد مطالعه، از نظر درصد مهار رشد میسلیمی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ در آزمون‌های کشت متقابل، متابولیت‌های فرار و متابولیت‌های غیرفرار وجود داشت. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیمی در کشت متقابل به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، جدایه‌های *T. harzianum* و *T.*

virens به ترتیب با ۹۳/۵۸ درصد و ۹۲/۹۴ درصد بیشترین توانایی را در مهار رشد میسلیمی *S. rolfsii* داشتند و کمترین درصد مهار رشد مربوط به *P. waksmanii* بود که با *P. fellutanum* و *C. cladosporioides* اختلاف معنی‌داری نداشت اما با سایر قارچ‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول ۲ و شکل ۱). در آزمون متابولیت‌های فرار، *P. glabrum* با ۸۱/۲۵ درصد مهار، بیشترین توانایی را در مهار رشد میسلیمی *S. rolfsii* داشت و کمترین مقدار درصد مهار رشد نیز مربوط به *P. waksmanii* بود (جدول ۲ و شکل ۲). در آزمون متابولیت‌های غیرفرار، *T. harzianum* با میانگین ۹۷/۵ درصد بیشترین توانایی را در مهار رشد میسلیمی بیمارگر داشت و کمترین مقدار درصد مهار رشد نیز مربوط به *C. cladosporioides* بود (جدول ۲ و شکل ۳). در روش کشت قارچ روی لام، ریشه‌های *C. cladosporioides* به درون ریشه‌های *S. rolfsii* نفوذ و به طرف ریشه‌های آن با حرکت مارپیچی پیشروی نمودند و در نقاطی با ایجاد کلاف و قلاب در ریشه بیمارگر بدشکلی شدید و در مواردی نیز باعث تجزیه دیواره‌های ریشه قارچ بیمارگر و قطعه‌قطعه شدن آنها شدند. ریشه‌های *P. waksmanii* به ریشه‌های بیمارگر رسیده و با پیچیدن به دور آن به خصوص در نقاط تلاقی، قلاب‌هایی ایجاد نمودند که باعث قطع شدن ریشه‌ها و فروپاشی آنها شد. ریشه‌های *A. flavus* به ریشه‌های *S. rolfsii* رسیدند و با پیچیدن به دور ریشه بیمارگر و گاهی نیز با اتصالات گیره‌مانندی به درون ریشه بیمارگر نفوذ کرده و با ایجاد موانع کلافی شکل منجر به توقف رشد ریشه، تخریب دیواره آن و در مواردی نیز با تولید اسپورهای فراوان باعث پارازیته کردن ریشه‌های آن شدند.

ریشه‌های *P. fellutanum* در امتداد ریشه بیمارگر پیشروی و در برخی موارد با ایجاد قلاب و حلقه‌هایی درون آن نفوذ کرده و با حرکت مارپیچی درون ریشه *S. rolfsii* منجر به توقف رشد ریشه و تخریب دیواره آن شدند و گاهی با تولید

هیچ گونه علائمی مشاهده نشد (شکل ۴-ا). در گیاهان شاهدهی که فقط با *S. rolfsii* مایه زنی شده بودند اولین علائم بیماری، چهار الی هفت روز پس از مایه زنی به صورت رشد ریشه ها در اطراف طوقه گیاه و بروز لکه های رنگ پریده در این ناحیه مشخص شد. سپس با گسترش آلودگی در اطراف ساقه و بروز علائم پژمردگی شدید در قسمت های هوایی، گیاه از قسمت طوقه کاملاً خشک شد و از بین رفت (شکل ۴-ب). در گیاهانی که با *P. glabrum* و *S. rolfsii* تیمار شده بودند اولین علائم بیماری شش روز پس از مایه زنی به صورت رشد و توسعه ریشه های عامل بیماری در سطح خاک مشاهده شد. به مرور این ریشه ها به سمت طوقه گیاه پیشروی و در پای بوته بادام زمینی توده میسلیمی ایجاد کردند. با گذشت زمان لکه های رنگ پریده ای در ناحیه طوقه پدیدار شدند که این لکه ها به مرور تیره تر شده و به زخم های شکافمانندی در ساقه گیاه تبدیل شدند و سپس به طرف قسمت های هوایی گیاه پیشروی کردند ولی ساقه ها با وجود علائم پژمردگی، مقاومت خود را حفظ نموده و طوقه بر نشدند (شکل ۴-ج).

اسپوره های فراوان، ریشه ها را پارازیته نمودند. ریشه های *T. harzianum* به موازات ریشه های میزبان رشد کردند و در برخی موارد به طور مستقیم و گاهی نیز با ایجاد انشعابات حلقه-مانند به درون ریشه *S. rolfsii* نفوذ کردند و سپس باعث بدشکلی ریشه و فروپاشی آنها شدند. در موارد معدودی ریشه های *A. niger* با ایجاد حلقه به درون ریشه های *S. rolfsii* نفوذ کرده و با به وجود آوردن تغییراتی در ساختار ریشه بیمارگر باعث از هم گسیختگی آنها شدند. ریشه های *P. glabrum* و بیمارگر به هم رسیدند و سپس با ایجاد انشعابات قلاب مانند به دیواره ریشه *S. rolfsii* متصل شدند و با رخنه در درون آن تغییراتی را در ساختمان ریشه بیمارگر به وجود آوردند. ریشه های *T. viride* و بیمارگر به هم نرسیدند و بدین ترتیب هیچ گونه تأثیر متقابلی روی یکدیگر نداشتند و این موضوع در مورد *T. virens* نیز صادق بود.

مطالعات مهار زیستی در شرایط گلخانه ای

در گیاهان شاهدهی که با آب مقطر و هر یک از قارچ های آنتاگونیست مورد مطالعه به تنهایی مایه زنی شده بودند

جدول ۱- جدایه های قارچی جداسازی شده از بافت های گیاهان بادام زمینی در مناطق مختلف استان گیلان

Table 1. Fungal isolates recovered from tissues of peanut plants in different regions of Guilan province

Fungal names	Isolates codes	Sampling Date	Sampling location	Geographic coordinates according to (UTM)
<i>Sclerotium rolfsii</i>	SrNd-2-5	19.8.2018	Astaneh-ye Ashrafiyeh (Noqreh Deh)	X= 37.299982 Y= 49.9119098
<i>Penicillium glabrum</i>	RS-5	14.9.2018	Rezvanshahr (Rudbarsara)	X= 37.458889 Y= 49.0656639
<i>Trichoderma viride</i>	RS-2-2	14.9.2018	Rezvanshahr (Rudbarsara)	X= 37.458089 Y= 49.0652155
<i>Aspergillus flavus</i>	MG-8-1	18.8.2018	Astaneh-ye Ashrafiyeh (Noqreh Deh)	X= 37.299982 Y= 49.9119098
<i>Trichoderma harzianum</i>	MD-7-23	19.8.2018	Kiashahr (Dehsar)	X= 37.332975 Y= 49.9510256
<i>Penicillium waksmanii</i>	RS-4	14.9.2018	Rezvanshahr (Rudbarsara)	X= 37.300198 Y= 49.6633039
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	SL-6-4	11.9.2018	Talesh (Subast - Lisar)	X= 37.483141 Y= 54.5555140
<i>Aspergillus niger</i>	MKh-4-2	15.10.2018	Astaneh-ye Ashrafiyeh (Khoshkarvandan)	X= 37.163116 Y= 49.5427663
<i>Penicillium fellutanum</i>	MA-3-1	19.8.2018	Astaneh-ye Ashrafiyeh (Amshal)	X= 37.249090 Y= 49.9101587
<i>Trichoderma virens</i>	ML-2-2	20.9.2018	Lasht-e Nesha	X= 37.210244 Y= 49.5043330

به تدریج توسط توده میسلیمی سفیدرنگی پوشیده شدند. این ساقه در قسمت پایه همچنان مقاومت خود را حفظ نمود، در حالی که ساقه‌های مجاور کاملاً طوقه‌بر شده و از بین رفتند (شکل ۵- b).

در گیاهان مایه‌زنی شده با *A. niger* و *S. rolfisii* پنج روز پس از مایه‌زنی، ریشه‌های بیمارگر در سطح خاک و سپس اطراف ساقه‌های گیاه تشکیل شده و باعث زردی و پژمردگی آن شدند ولی با وجود زخم‌های متوسط و در مواردی نسبتاً بزرگ در اطراف ساقه، گیاه از بین نرفت (شکل ۵- c).

در گیاهان تیمار شده با *P. fellutanum* و بیمارگر، اولین علائم چهار الی پنج روز بعد از مایه‌زنی با رشد ریشه‌های قارچ در سطح خاک و اطراف طوقه گیاه مشاهده شد. به تدریج گیاه از نظر ظاهری پژمرده شد و ساقه مرکزی آن از بین رفت. ساقه‌های مجاور آن نیز طی ۱۰ روز خشک شدند و سختینه‌های قارچ در بقایای ساقه‌های بیمار قابل رؤیت بودند (شکل ۵- d).

در گیاهان تیمار شده با *T. virens* و بیمارگر، بروز علائم و توسعه آنها مشابه تیمار با *P. fellutanum* بود (شکل ۵- e).

بر اساس تجزیه واریانس بین تیمارهای مورد مطالعه از نظر شدت بیماری اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود داشت. در روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) بین قارچ‌های مورد مطالعه در این آزمایش، کمترین شدت بیماری متعلق به تیمارهای *P. glabrum* به میزان (۳/۰۳) و *T. viride* به میزان (۳/۰۶) بود و بیشترین شدت بیماری ایجاد شده مربوط به شاهد *S. rolfisii* و تیمار *T. virens* بود. براین اساس، تیمارهای *P. glabrum* و *T. viride* کارآیی مؤثری در مهار شدت بیماری ناشی از *T. A. flavus* داشتند و پس از آن تیمارهای *harzianum* و *P. waksmanii* در مراتب بعدی قرار گرفتند (جدول ۳).

در گیاهان تیمار شده با *T. viride* و بیمارگر، علائم بیماری چهار الی هفت روز پس از مایه‌زنی به صورت رشد ریشه‌های عامل بیماری در سطح خاک و اطراف طوقه گیاه ظاهر شدند. ریشه‌های بیمارگر اطراف ساقه گیاه را پوشانده و لکه‌های رنگ پریده‌ای را در محل آلودگی به وجود آوردند اما ساقه گیاه آلوده همچنان پایدار بود و شادابی خود را حفظ نمود (شکل ۴- d).

در گیاهان مایه‌زنی شده با *A. flavus* و *S. rolfisii* علائم بیماری چهار روز پس از مایه‌زنی به صورت رشد ریشه‌های بیمارگر در اطراف طوقه گیاه ظاهر شد. به مرور با نفوذ ریشه‌ها به بافت طوقه ابتدا لکه‌های رنگ پریده‌ای در این ناحیه ایجاد و پس از ۱۰ روز زخم‌هایی در محیط اطراف ساقه مرکزی به وجود آمد که تا قسمت بالای ساقه پیشروی نمودند اما در طوقه‌های مجاور زخمی تشکیل نشد (شکل ۴- e).

در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* و *S. rolfisii* علائم بیماری حدود پنج روز بعد از مایه‌زنی ابتدا به صورت رشد ریشه‌های عامل بیماری در سطح خاک و اطراف طوقه گیاه و سپس به صورت لکه‌هایی در قسمت‌های بالای طوقه گیاه ظاهر شد و زخم‌های نسبتاً بزرگی به وجود آمد که تا بالاتر از محل طوقه نیز ادامه داشت (شکل ۴- f).

در گیاهان تیمار شده با *P. waksmanii* و بیمارگر، اولین علائم بیماری چهار روز بعد از مایه‌زنی به صورت رشد ریشه‌های بیمارگر در سطح خاک و اطراف طوقه گیاه مشاهده شد که به تدریج این لکه‌ها تیره‌تر شده و روی دو ساقه از گیاه تبدیل به زخم‌هایی شدند و به دنبال آن، ساقه‌ها در اثر ضعف و پژمردگی شدید ناشی از بیماری، از ناحیه طوقه منهدم شدند (شکل ۵- a).

در گیاهان تیمار شده با *C. cladosporioides* و بیمارگر، علائم بیماری پنج روز بعد از مایه‌زنی به صورت رشد ریشه‌های بیمارگر در اطراف طوقه گیاه ظاهر شد و سپس زخم‌هایی اطراف ساقه مرکزی گیاه به وجود آمد که

ارتفاع متعلق به *T. virens* بود (جدول ۳). بیشترین مقدار ارتفاع بوته بدون ریشه متعلق به تیمارهای *P. glabrum* و *T. viride* بود و تیمارهای *P. fellutanum* و *T. virens* کمترین میزان ارتفاع را داشتند (جدول ۴).

بیشترین میزان وزن تر بوته با ریشه، متعلق به تیمار *T. viride* و کمترین میزان وزن تر بوته با ریشه مربوط به تیمار *T. virens* بود که با تمامی تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۳). بیشترین میزان وزن تر بوته بدون ریشه متعلق به *T. viride* و کمترین میزان مربوط به *T. virens* بود (جدول ۳). بالاترین میزان وزن تر ریشه، متعلق به تیمارهای *A. flavus* و *P. glabrum* و کمترین میزان وزن ریشه مربوط به *T. virens* بود (جدول ۴).

بر اساس نتایج تجزیه واریانس صفات ریخت‌شناختی در گلخانه بین تیمارهای مورد مطالعه از نظر وزن خشک بوته با ریشه، وزن خشک بدون ریشه و وزن خشک ریشه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد وجود داشت.

بر اساس تجزیه واریانس بین تیمارهای مورد مطالعه از نظر میزان وقوع بیماری ناشی از *S. rolfsii* اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد وجود داشت. در روش LSD، کمترین میزان وقوع بیماری مربوط به *P. glabrum* (۵۸/۳۳ درصد) و *A. flavus* (۶۰/۳۳ درصد) و بیشترین میزان وقوع بیماری مربوط به تیمارهای *T. virens* و *P. fellutanum* بود (جدول ۳).

بر اساس تجزیه واریانس صفات ریخت‌شناختی، بین تیمارهای مورد مطالعه از نظر ارتفاع بوته، ارتفاع ساقه، وزن تر بوته با ریشه، وزن تر بدون ریشه و وزن تر ریشه اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱ درصد و ۵ درصد وجود داشت. در بررسی اثر متقابل بین قارچ و تیمار در صفت ارتفاع بوته بدون ریشه و وزن تر ریشه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد.

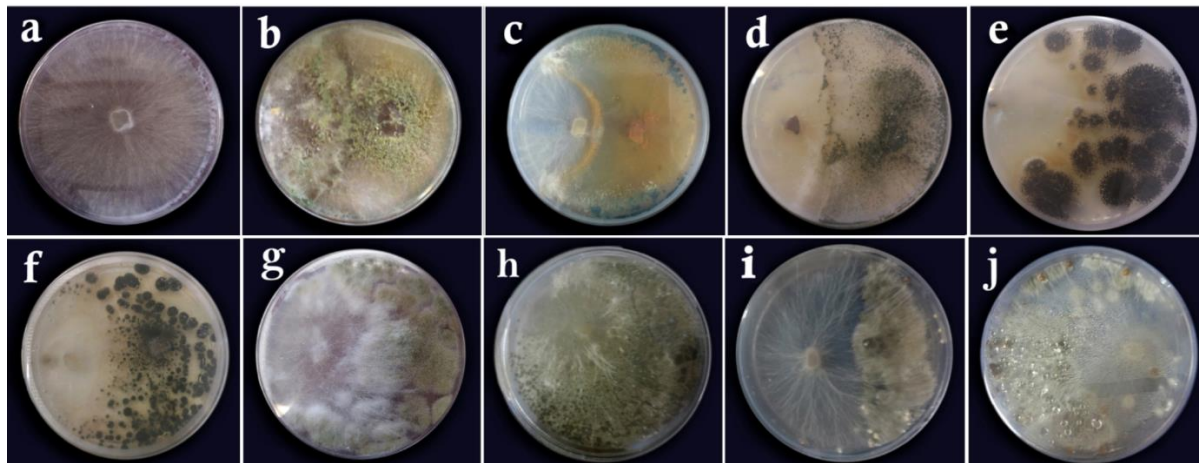
بر اساس LSD، بیشترین ارتفاع بوته با ریشه، متعلق به تیمارهای *P. glabrum* و *T. viride* و کمترین میزان

جدول ۲- مقایسه میانگین مهار رشد میسلیومی *Scrotium rolfsii* به وسیله قارچ‌های مورد مطالعه در آزمون‌های کشت متقابل، متابولیت‌های فرار و متابولیت‌های غیر فرار

Table 2. The mean (\pm SE) comparison of mycelium growth inhibition of *Scrotium rolfsii* by the studied fungi in dual culture, volatile metabolites and non-volatile metabolites methods

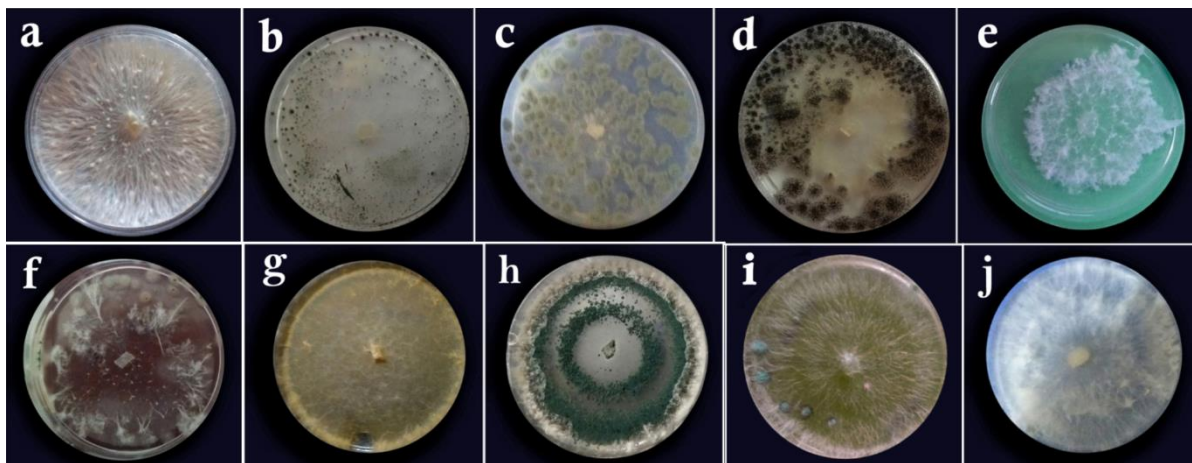
Treatments	Growth inhibition (%) Dual culture	Growth inhibition (%) Volatile metabolites	Growth inhibition (%) Non-volatile metabolites
<i>Penicillium glabrum</i>	67.17 \pm 0.00 ^b	81.25 \pm 0.00 ^a	93.12 \pm 0.00 ^c
<i>Trichoderma viride</i>	67.94 \pm 0.00 ^b	0.00 \pm 0.00 ^f	93.75 \pm 0.00 ^b
<i>Aspergillus flavus</i>	44.48 \pm 0.01 ^d	75.00 \pm 0.01 ^b	0.00 \pm 0.01 ^e
<i>Trichoderma harzianum</i>	93.58 \pm 0.00 ^a	37.5 \pm 0.00 ^d	97.5 \pm 0.01 ^a
<i>Penicillium waksmanii</i>	0.00 \pm 0.01 ^e	0.00 \pm 0.01 ^f	0.00 \pm 0.01 ^e
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	0.00 \pm 0.00 ^e	0.00 \pm 0.00 ^f	0.00 \pm 0.00 ^e
<i>Aspergillus niger</i>	49.61 \pm 0.00 ^c	50.00 \pm 0.00 ^c	86.25 \pm 0.00 ^d
<i>Penicillium fellutanum</i>	0.00 \pm 0.00 ^e	6.25 \pm 0.00 ^e	0.00 \pm 0.00 ^e
<i>Trichoderma virens</i>	92.94 \pm 0.03 ^a	0.00 \pm 0.00 ^f	0.00 \pm 0.00 ^e

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at $P > 0.0$



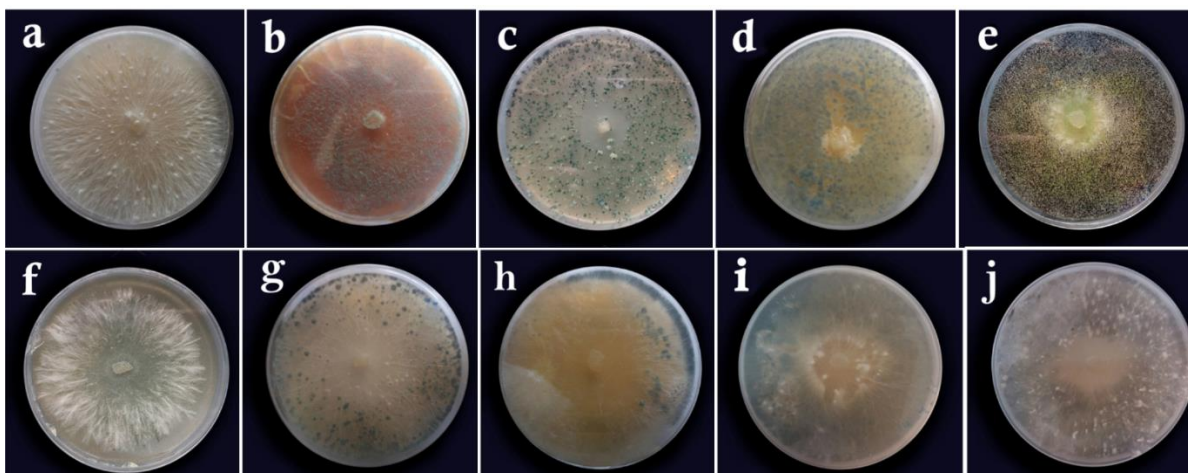
شکل ۱- آزمون کشت متقابل *Sclerotium rolfii* در مقابل قارچ‌های مورد مطالعه: (a) شاهد *Sclerotium rolfii* (b) *Trichoderma harzianum* (c) *Trichoderma virens* (d) *Trichoderma viride* (e) *Aspergillus niger* (f) *Penicillium glabrum* (g) *Aspergillus flavus* (h) *Penicillium fellutanum* (i) *Cladosporium cladosporioides* (j) *Penicillium waksmanii*

Figure 1. Dual culture test of *Sclerotium rolfii* versus the studied fungi: (a) *Sclerotium rolfii* control, (b) *Trichoderma harzianum*, (c) *Trichoderma virens*, (d) *Trichoderma viride*, (e) *Aspergillus niger*, (f) *Penicillium glabrum*, (g) *Aspergillus flavus*, (h) *Penicillium fellutanum*, (i) *Cladosporium cladosporioides*, (j) *Penicillium waksmanii*.



شکل ۲- آزمون متابولیت‌های فرار *Sclerotium rolfii* در مقابل قارچ‌های مورد مطالعه: (a) شاهد *Sclerotium rolfii* (b) *Penicillium glabrum* (c) *Aspergillus flavus* (d) *Aspergillus niger* (e) *Trichoderma harzianum* (f) *Penicillium fellutanum* (g) *Trichoderma virens* (h) *Trichoderma viride* (i) *Cladosporium cladosporioides* (j) *Penicillium waksmanii*

Figure 2. Volatile metabolites test of *Sclerotium rolfii* versus the studied fungi: (a) *Sclerotium rolfii* (control), (b) *Penicillium glabrum*, (c) *Aspergillus flavus*, (d) *Aspergillus niger*, (e) *Trichoderma harzianum*, (f) *Penicillium fellutanum*, (g) *Trichoderma virens*, (h) *Trichoderma viride*, (i) *Cladosporium cladosporioides*, (j) *Penicillium waksmanii*.



شکل ۳- آزمون متابولیت‌های غیرفرار *Sclerotium rolfsii* در مقابل قارچ‌های مورد مطالعه: (a) شاهد *Sclerotium rolfsii* (b) *Trichoderma harzianum* (c) *Trichoderma viride* (d) *Penicillium glabrum* (e) *Aspergillus niger* (f) *Trichoderma virens* (g) *Penicillium waksmanii* (h) *Aspergillus flavus* (i) *Penicillium fellutanum* (j) *Cladosporium cladosporioides*

Figure 3. Nonvolatile metabolites test of *Sclerotium rolfsii* versus the studied fungi. (a) *Sclerotium rolfsii* (control), (b) *Trichoderma harzianum*, (c) *Trichoderma viride*, (d) *Penicillium glabrum*, (e) *Aspergillus niger*, (f) *Trichoderma virens*, (g) *Penicillium waksmanii*, (h) *Aspergillus flavus*, (i) *Penicillium fellutanum*, (j) *Cladosporium cladosporioides*.

بازدارندگی را در مهار رشد میسلیمی *S. rolfsii* داشتند. از آنجایی که *S. rolfsii* در روش کشت متقابل روی محیط کشت PDA رشد سریع تری داشت، این احتمال وجود دارد که قارچ‌های مورد مطالعه، در استفاده از مواد غذایی موجود در محیط کشت یا به عبارتی دیگر رقابت برای غذا و فضای بیشتر، سریع‌تر عمل نمایند و بنابراین کمبود مواد غذایی و فضای مناسب و همچنین تولید مواد سمی (آنتی‌بیوتیک و مواد شبه‌آنتی‌بیوتیک) توسط قارچ‌های مورد مطالعه در این روش نقش اصلی در کارآیی جدایه‌ها را داشتند که با مطالعه Basumatary et al. (2015) درباره کارآیی جدایه‌های *Penicillium sp.* و *T. viride*، *T. harzianum* در مهار رشد میسلیمی *S. rolfsii* در کشت متقابل سازگار بود. در پژوهش حاضر جدایه‌های *T. viride*، *Penicillium sp.* و *A. niger* قابلیت بازدارندگی بالایی در مهار بیمارگر داشتند که یا مطالعات دیگری در این زمینه هم‌خوانی داشت (Prasad & Dwivedi, 2017; Akram et al., 2016).

بر پایه LSD، بیشترین میزان وزن خشک بوته با ریشه، متعلق به تیمار *P. glabrum* و کمترین میزان مربوط به تیمار *T. virens* بود (جدول ۳). بیشترین میزان وزن خشک بوته بدون ریشه متعلق به تیمار *T. viride* بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین میزان مربوط به تیمار *T. virens* بود (جدول ۳). بالاترین میزان وزن خشک ریشه، متعلق به تیمار *P. glabrum* بود که با تمامی تیمارها اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین وزن خشک ریشه مربوط به تیمار *T. virens* بود (جدول ۴).

بحث

در این پژوهش، در روش کشت متقابل *T. harzianum* بالاترین میزان بازدارندگی و پس از آن *T. virens*، *T. viride* و *P. glabrum* و *A. niger* قدرت بازدارندگی خوب تا متوسط و *P. waksmanii* پایین‌ترین میزان

مورد مطالعه (به استثنای *T. virens* و *T. viride*) به دلیل وجود مواد شیمیایی مانند لکتین در دیواره سلولی ریشه بیمارگر دارای گرایش مثبت بودند و به همین دلیل ریشه‌ی آن‌ها در امتداد ریشه بیمارگر پیشروی کرد و در مواردی با ایجاد چنگک، اندام‌های حلقه‌ای و یا قلابی شکل به درون بافت ریشه بیمارگر نفوذ کرد و بر این اساس جدایه‌های *C. cladosporioides*، *P. waksmani* و *T. harzianum* بیشترین و جدایه‌های *T. viride* و *virens* کمترین میزان کارآیی در فرآنگلی و تخریب ریشه بیمارگر داشتند. در مطالعه‌ی دیگری مشخص شد که *T. harzianum* به واسطه پیچش ریشه‌ای به دور ریشه *S. rolfisii* و تشکیل اندام مکینه‌مانند در درون آن باعث تجزیه و تخریب دیواره سلولی ریشه بیمارگر گردید (Radwan et al., 2006). نشان داده شد که *T. harzianum* با ترشح آنزیم‌هایی باعث قطعه قطعه شدن ریشه *S. rolfisii* می‌شود (Upadhye & Mukhyopadhyay, 1987).

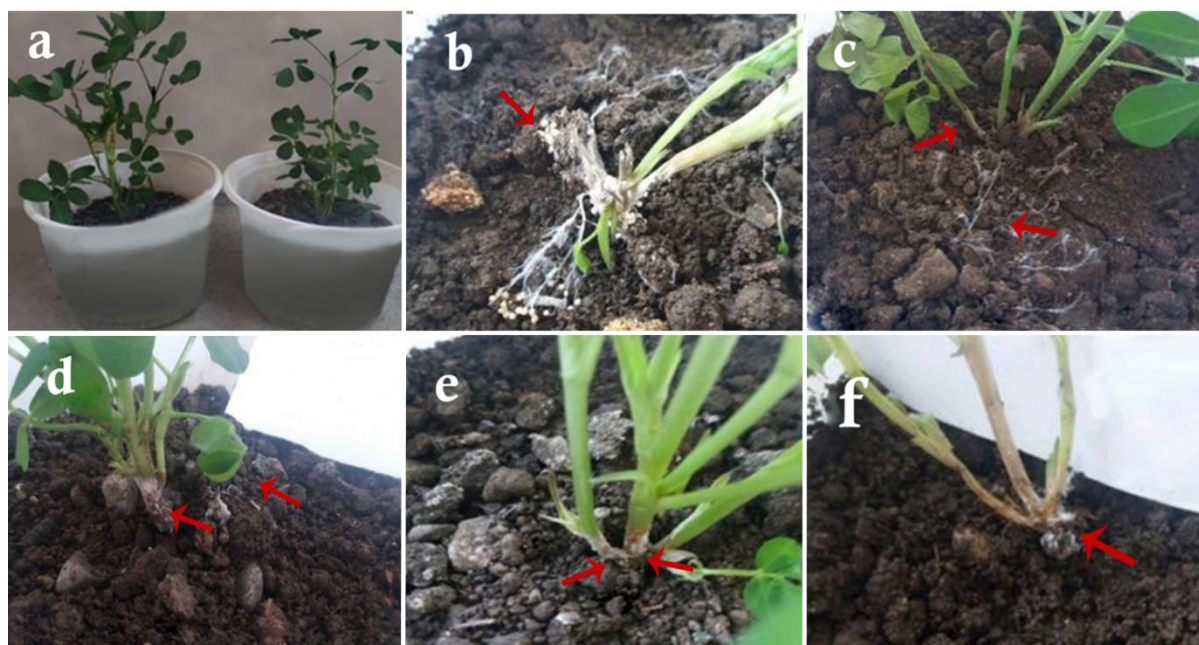
در آزمون متابولیت فرار *P. glabrum* بالاترین و *P. waksmani* پایین‌ترین کارآیی را در مهار رشد میسلومی *S. rolfisii* داشتند. بالا بودن درصد مهار رشد میسلومی توسط *P. glabrum* نسبت به سایر جدایه‌های مورد مطالعه را می‌توان به تولید بیشتر ترکیبات فرار توسط این جدایه نسبت داد که این یافته با مطالعه دیگری در این زمینه در مورد تأثیر جدایه‌های قارچی و روش کشت آنها در کمیت و کیفیت تولید متابولیت-های فرار، مطابقت داشت (Zappa et al., 1991). گونه‌های مختلف *Trichoderma* در آزمون‌های آزمایشگاهی مانند متابولیت فرار، توانایی‌های متفاوتی در میزان مهار رشد میسلوم-ها و اجزای تشکیل دهنده سختینه *S. rolfisii* از خود نشان می‌دهند (Rekha et al., 2012) که این موضوع با نتیجه مشاهدات آزمایشگاهی پژوهش حاضر در مورد گونه‌های *Trichoderma* مطابقت داشت. در روش کشت روی اسلاید ریشه‌های جدایه‌های آنتاگونیست

جدول ۳- مقایسه میانگین شدت بیماری، کاهش شدت بیماری و وقوع بیماری پوسیدگی سفید ساقه بادام زمینی در شرایط گلخانه

Table 3. The mean (\pm SE) comparison of disease severity, reduction of disease severity and incidence peanut white stem rot disease under greenhouse conditions

Treatments	Disease rating	Reduce severity of disease (%)	Disease incidence (%)
<i>Penicillium glabrum</i>	3.03 \pm 0.26 ^d	39.40 \pm 0.05 ^b	58.33 \pm 0.13 ^c
<i>Trichoderma viride</i>	3.06 \pm 0.29 ^d	38.80 \pm 0.06 ^b	78.33 \pm 0.12 ^{abc}
<i>Aspergillus flavus</i>	3.40 \pm 0.35 ^{cd}	32.00 \pm 0.07 ^b	60.33 \pm 0.10 ^c
<i>Trichoderma harzianum</i>	3.50 \pm 0.29 ^{cd}	30.00 \pm 0.06 ^{bc}	68.66 \pm 0.08 ^{ab}
<i>Penicillium waksmanii</i>	3.60 \pm 0.00 ^{cd}	28.00 \pm 0.00 ^{bc}	88.66 \pm 0.01 ^{ab}
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	3.90 \pm 0.37 ^{bc}	22.00 \pm 0.05 ^{cd}	68.66 \pm 0.11 ^{ab}
<i>Aspergillus niger</i>	4.00 \pm 0.00 ^{bc}	20.00 \pm 0.00 ^{cd}	88.66 \pm 0.06 ^c
<i>Penicillium fellutanum</i>	5.00 \pm 0.00 ^{ab}	0.00 \pm 0.00 ^e	100.00 \pm 0.00 ^a
<i>Trichoderma virens</i>	5.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.00 ^e	100.00 \pm 0.00 ^a
Distilled Water (control)	0.00 \pm 0.00 ^e	100.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.01 ^e
Antagonistic fungi (only)	0.00 \pm 0.00 ^e	100.00 \pm 0.00 ^a	0.00 \pm 0.01 ^e
<i>Scierotium rolfisii</i> (control)	5.00 \pm 0.01 ^a	0.00 \pm 0.01 ^e	100.00 \pm 0.00 ^a

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at $P > 0.05$



شکل ۴- علائم بیماری پوسیدگی سفید ساقه روی بادام زمینی: (a) شاهد آب مقطر (چپ) و شاهد *Sclerotium rolfsii* (راست). (b) پس از مایه زنی با *Sclerotium rolfsii*. (c) پس از مایه زنی با *Penicillium glabrum* و *Sclerotium rolfsii*. (d) پس از مایه زنی با *Trichoderma viride* و *Sclerotium rolfsii*. (e) پس از مایه زنی با *Aspergillus flavus* و *Sclerotium rolfsii*. (f) پس از مایه زنی با *Trichoderma harzianum* و *Sclerotium rolfsii*.

Figure 4. Symptoms of white stem rot disease on peanut: (a) Distilled water control (left) and *Sclerotium rolfsii* control (right), (b) After inoculation with *Sclerotium rolfsii*, (c) After inoculation with of *Penicillium glabrum* and *Sclerotium rolfsii*, (d) After inoculation with *Trichoderma viride* and *Sclerotium rolfsii*, (e) After inoculation with *Aspergillus flavus* and *Sclerotium rolfsii*, (f) After inoculation with *Trichoderma harzianum* and *Sclerotium rolfsii*.

ترکیبات و نیز مربوط به تفاوت‌های شیمیایی و بیوشیمیایی این ترکیبات باشد (Samavat et al., 2014). تأثیرات مختلف جدایه‌های گوناگون آنتاگونیست در آزمون‌های به‌کارگرفته شده در این پژوهش در میزان مهار رشد میسلومی *S. rolfsii* می‌تواند ناشی از خصوصیات ژنتیکی جدایه‌ها، تفاوت در جنس و گونه آنها و نیز گیاه میزبان و محل جمع‌آوری آنها باشد (Kakvan et al., 2013).

جدایه‌های *T. harzianum*، *T. virens* و *T. viride* دارای سازوکارهای متفاوتی همچون رقابت، پوده‌رستی، آنتی‌بیوز، قارچ‌انگلی (فرانگلی)، مقاومت القایی و پالایش‌کننده زیستی خاک هستند و به‌عنوان

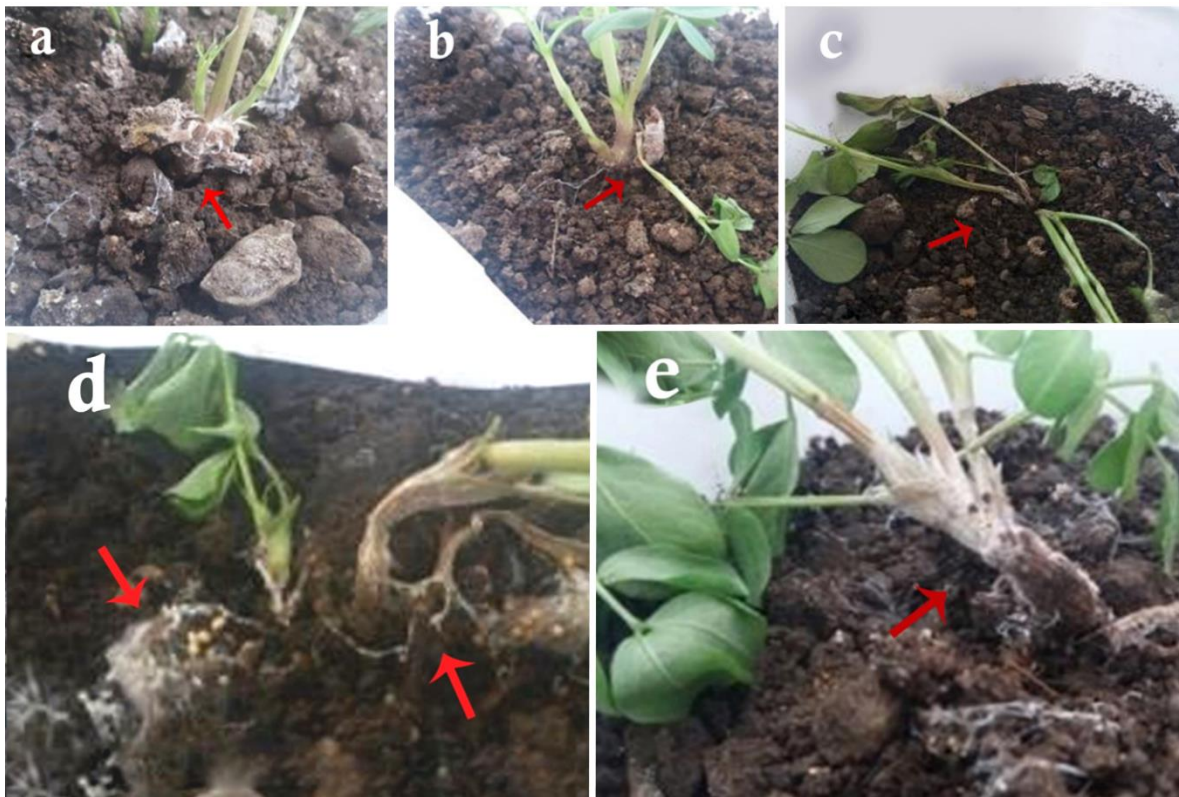
این امر به علت پیچش ریشه‌ی *T. harzianum* به دور ریشه بیمارگر در واکنش به سیگنال‌های بیوشیمیایی است که از *S. rolfsii* ترشح می‌شود و در مقابل جدایه آنتاگونیست نیز آنزیم‌های اختصاصی هیدرولیزکننده ترشح می‌کند که منجر به تجزیه دیواره سلولی ریشه عامل بیماری شده و آنگاه از محتویات سلولی آن به‌عنوان منبع غذایی استفاده می‌کند (Valed Saravi et al., 2011).

بر اساس پژوهش حاضر تأثیر ترکیبات غیرفرار تولید شده توسط قارچ‌های آنتاگونیست در مهار رشد میسلومی *S. rolfsii* نسبت به ترکیبات فرار بیشتر بود که می‌تواند ناشی از تفاوت در حساسیت قارچ بیماری‌زا نسبت به این

عامل پوسیدگی حنایی مغز بادام زمینی معرفی گردید (Mirhosseini Moghadam, 2009)، در حالی که این جدایه‌ها در پژوهش حاضر، روی بادام زمینی بیماری‌زا نبودند و در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای کارآیی خوب تا متوسطی در مهار *S. rolfsii* از خود نشان دادند که این ناسازگاری می‌تواند ناشی از تفاوت در شدت بیماری‌زایی جدایه‌های به کار رفته باشد، اما با توجه به بیماری‌زایی این گونه‌ها و نیز تولید توکسین توسط آنها در معرفی این جدایه‌ها به‌عنوان عوامل آنتاگونیست باید احتیاط نمود.

همزیست‌های فرصت‌طلب و غیربیماری‌زا در گیاهان عمل می‌کنند و در مواردی نیز موجب ایجاد مقاومت به عوامل زنده و غیرزنده می‌شوند (Vinale et al., 2008). بدین ترتیب این امکان وجود دارد که جدایه‌های *T. viride* و *T. harzianum* از سازوکار رقابت بر سر مواد غذایی، مقاومت القایی و ایجاد رابطه همزیستی با ریشه گیاه برای کاهش شدت بیماری در گلخانه استفاده کرده باشند.

در مطالعه‌ای، *A. niger* به‌عنوان عامل بیماری پوسیدگی سیاه طوقه و کپک سیاه بادام زمینی و *A. flavus* نیز به‌عنوان



شکل ۵- علائم بیماری پوسیدگی سفید ساقه روی بادام زمینی: (a) پس از مایه‌زنی با *Penicillium waksmanii* و *Sclerotium rolfsii*، (b) پس از مایه‌زنی با *Cladosporium cladosporioides* و *Sclerotium rolfsii*، (c) پس از مایه‌زنی با *Aspergillus niger* و *Sclerotium rolfsii*، (d) پس از مایه‌زنی با *Peicillium fellutanum* و *Sclerotium rolfsii*، (e) پس از مایه‌زنی با *Sclerotium rolfsii* و *Trichoderma virens*.

Figure 5. Symptoms of white stem rot disease on peanut: (a) After inoculation with *Penicillium waksmanii* and *Sclerotium rolfsii*, (b) After inoculation with *Cladosporium cladosporioides* and *Sclerotium rolfsii*, (c) After inoculation with of *Aspergillus niger* and *Sclerotium rolfsii*, (d) After inoculation with *Peicillium fellutanum* and *Sclerotium rolfsii*, (e) After inoculation with *Trichoderma virens* and *Sclerotium rolfsii*.

جدول ۴- مقایسه میانگین ارتفاع، وزن تر و خشک بادام زمینی تحت تاثیر قارچ‌های آنتاگونیست

Table 4. Comparison of mean (\pm SE) of height, fresh and dry weight of peanut under the influence of antagonist fungi

Treatments	Height With root (cm)	Height Without root (cm)	Fresh weight with root (g)	Fresh weight without root (g)	Fresh weight root (g)	Dry weight with root (g)	Dry weight without root (g)	Dry weight root (g)
<i>Penicillium glabrum</i>	62.50 \pm 0.33 ^a	19.13 \pm 0.00 ^a	5.72 \pm 0.52 ^a	4.51 \pm 0.43 ^{ab}	1.45 \pm 0.03 ^a	2.52 \pm 0.36 ^a	0.83 \pm 0.20 ^d	0.36 \pm 0.02 ^a
Only antagonist	71.00 \pm 1.00 ^a	25.00 \pm 0.00 ^a	5.22 \pm 1.67 ^a	6.67 \pm 1.88 ^{bc}	1.67 \pm 0.07 ^{ab}	1.22 \pm 0.09 ^c	1.01 \pm 0.06 ^c	0.40 \pm 0.06 ^a
<i>Trichoderma viride</i>	62.50 \pm 1.53 ^a	18.71 \pm 0.31 ^a	6.29 \pm 1.71 ^a	5.36 \pm 1.23 ^a	0.62 \pm 0.05 ^b	2.02 \pm 1.30 ^a	2.29 \pm 1.28 ^a	0.25 \pm 0.03 ^b
Only antagonist	70.00 \pm 0.58 ^a	23.00 \pm 0.58 ^a	7.33 \pm 0.73 ^a	8.32 \pm 1.35 ^a	0.91 \pm 0.10 ^c	3.57 \pm 0.00 ^a	3.06 \pm 0.03 ^a	0.12 \pm 0.01 ^b
<i>Aspergillus flavus</i>	49.33 \pm 3.38 ^b	16.70 \pm 0.88 ^b	5.66 \pm 0.73 ^{ab}	4.13 \pm 1.25 ^{bc}	1.51 \pm 0.17 ^a	0.83 \pm 0.02 ^{cd}	0.50 \pm 0.26 ^{de}	0.19 \pm 0.08 ^{cd}
Only antagonist	55.00 \pm 2.89 ^b	19.67 \pm 0.88 ^b	5.02 \pm 2.31 ^{ab}	6.57 \pm 1.61 ^{bc}	1.81 \pm 0.11 ^a	0.83 \pm 0.09 ^{cd}	0.58 \pm 0.02 ^{de}	0.20 \pm 0.08 ^b
<i>Trichoderma harzianum</i>	48.00 \pm 4.98 ^b	16.01 \pm 0.29 ^c	5.32 \pm 0.68 ^{ab}	3.80 \pm 1.25 ^{bc}	1.26 \pm 0.45 ^a	1.73 \pm 0.05 ^b	1.32 \pm 0.58 ^c	0.27 \pm 0.01 ^b
Only antagonist	54.67 \pm 5.17 ^b	18.67 \pm 0.88 ^c	5.09 \pm 0.63 ^{ab}	7.93 \pm 1.52 ^{ab}	1.81 \pm 0.92 ^a	1.84 \pm 0.12 ^c	1.63 \pm 0.13 ^b	0.07 \pm 0.01 ^c
<i>Penicillium waksmanii</i>	46.00 \pm 3.38 ^b	15.58 \pm 0.17 ^c	5.22 \pm 0.21 ^{ab}	4.32 \pm 1.30 ^{bc}	1.14 \pm 0.27 ^a	2.25 \pm 0.15 ^a	1.84 \pm 0.14 ^b	0.24 \pm 0.01 ^{bc}
Only antagonist	49.33 \pm 2.96 ^b	18.67 \pm 0.88 ^c	5.16 \pm 0.17 ^{ab}	6.97 \pm 0.27 ^{bc}	0.97 \pm 0.01 ^b	2.02 \pm 0.67 ^b	1.66 \pm 0.09 ^b	0.19 \pm 0.01 ^b
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	46.41 \pm 9.96 ^b	15.50 \pm 0.83 ^c	3.52 \pm 0.33 ^c	2.29 \pm 0.70 ^d	1.15 \pm 0.21 ^a	0.64 \pm 0.01 ^{cd}	0.47 \pm 0.08 ^{de}	0.24 \pm 0.02 ^{bc}
Only antagonist	47.67 \pm 5.04 ^c	17.50 \pm 1.26 ^c	2.79 \pm 0.75 ^c	3.45 \pm 1.31 ^d	1.71 \pm 0.25 ^{ab}	0.93 \pm 0.31 ^{cd}	0.84 \pm 0.32 ^d	0.40 \pm 0.00 ^a
<i>Aspergillus niger</i>	44.00 \pm 4.93 ^c	14.70 \pm 0.29 ^d	4.87 \pm 0.48 ^b	3.52 \pm 0.12 ^c	1.28 \pm 0.61 ^a	1.04 \pm 0.12 ^c	0.76 \pm 0.04 ^d	0.18 \pm 0.05 ^d
Only antagonist	49.33 \pm 3.38 ^b	17.00 \pm 0.29 ^d	4.59 \pm 0.23 ^b	5.00 \pm 0.23 ^c	1.39 \pm 0.13 ^b	1.24 \pm 0.08 ^c	0.93 \pm 0.04 ^d	0.21 \pm 0.01 ^b
<i>Penicillium fellutanum</i>	27.58 \pm 0.50 ^d	14.58 \pm 0.67 ^d	2.86 \pm 0.77 ^c	2.10 \pm 0.69 ^{de}	0.67 \pm 0.03 ^b	0.81 \pm 0.03 ^{cd}	0.61 \pm 0.01 ^{de}	0.26 \pm 0.06 ^b
Only antagonist	28.50 \pm 0.29 ^d	17.13 \pm 0.09 ^d	1.77 \pm 0.15 ^c	2.45 \pm 0.13 ^e	0.78 \pm 0.02 ^c	1.09 \pm 0.06 ^c	1.11 \pm 0.07 ^c	0.36 \pm 0.02 ^a
<i>Trichoderma virens</i>	24.33 \pm 0.33 ^d	14.16 \pm 0.00 ^d	1.61 \pm 0.30 ^d	1.27 \pm 0.17 ^e	0.34 \pm 0.01 ^b	0.55 \pm 0.01 ^d	0.28 \pm 0.03 ^e	0.03 \pm 0.03 ^e
Only antagonist	25.67 \pm 0.33 ^d	17.33 \pm 0.00 ^d	1.57 \pm 0.15 ^c	2.35 \pm 0.18 ^e	0.77 \pm 0.28 ^c	0.67 \pm 0.12 ^d	0.49 \pm 0.01 ^e	0.02 \pm 0.00 ^c
Distilled Water control)	48.88 \pm 1.26 ^b	16.40 \pm 0.26 ^c	4.38 \pm 0.37 ^b	3.02 \pm 0.32 ^c	0.98 \pm 0.13 ^b	1.21 \pm 0.18 ^c	0.9 \pm 0.08 ^e	0.15 \pm 0.01 ^d
<i>Scierotium rolfsii</i> (control)	34.87 \pm 1.94 ^c	14.46 \pm 0.26 ^d	1.54 \pm 0.24 ^e	1.05 \pm 0.17 ^e	0.44 \pm 0.04 ^b	0.62 \pm 0.04 ^{cd}	0.34 \pm 0.02 ^{de}	0.20 \pm 0.01 ^{bc}

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at $P > 0.05$

در *Cladosporium* sp. گونه *S. sclerotiorum* شرایط آزمایشگاه باعث کاهش جوانه‌زنی اسپور بیمارگر و رشد میسلیم آن گردید (Boland & Hall, 1994) که با پژوهش حاضر مطابقت داشت. تأثیرات مثبت و خاصیت تحریک‌کنندگی فاکتورهای رویشی گیاه مانند افزایش ارتفاع و بهبود عملکردهای آن

جدایه *C. cladosporioides* از جمله قارچ‌های پوده-رُست و هوابرد است (Pitt & Hocking, 2009) که در پژوهش حاضر در روش کشت روی اسلاید به‌واسطه‌ی سازوکار فرآنگلی در مهار ریشه بیمارگر کارآیی خوبی داشت و در شرایط گلخانه کارآیی متوسطی از خود نشان داد. در مهار زیستی بیماری پوسیدگی اسکروتینیایی کلزانشی از

گزارش گردید (Sabet et al., 2013). (Doley et al. نشان دادند که تیمار گیاه بادام زمینی با قارچ‌ریشه‌های همزیست و *T. viride* تأثیر زیادی در تحریک رشد و افزایش سطح جذب مواد مغذی گیاه دارد و از طرفی این قارچ‌ها در کاهش صدمات ناشی از *S. rolfisii* نیز کارآیی مؤثری دارند. نتایج این یافته‌ها مؤید نتایج تحقیق حاضر است. نتایج کلی پژوهش حاضر در دو بخش آزمایشگاهی و گلخانه نشان‌دهنده این بود که بیماری پوسیدگی سفید ساقه بادام زمینی با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست موجود در زیستگان طبیعی گیاه بادام زمینی از جمله *P. glabrum*، *T. viride* و *A. flavus* قابل مهار است. طبق نتایج این پژوهش، *P. glabrum* هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در شرایط گلخانه‌ای مؤثرترین جدایه در مهار بیمارگر بود. این پژوهش بعد از انجام بررسی‌های لازم در شرایط مزرعه طی تحقیقات آتی می‌تواند نویدبخش به کارگیری این عوامل زیست‌مهار به‌عنوان یکی از اجزای مهم در مدیریت تلفیقی بیماری مذکور به‌شمار آید.

سپاس‌گزاری

بدینوسیله از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت در حمایت از پژوهش حاضر قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

- Agrios, G. (2005). *Plant Pathology*. 5th ed, Academic Press.
- Akram, A., Shaheen, I., Akhund, S., Nayyar, B. G., & Seerat, W. (2016). *In vitro* antifungal activity of *Pongamia pinnata* against collar rot pathogen (*Sclerotium rolfisii*) of chickpea. *Pure and Applied Biology*, 5(3), 520-528. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2016.50066>
- Amaike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49, 107-133. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095221>
- Anonymous. (2015). *Agricultural Statistics*. Jihad-e-Agriculture Organization of Guilan province, Crop Year 2014-2015 (in Farsi).
- Asghari, M., & Maei, S. D. (1991). Comparison of the effects of several control methods on stem and peanut pod rot disease. *Proceedings of the 10th Iranian Plant Protection Congress*, p. 215. Iran (in Farsi with English summary).

توسط *Talaromyces flavus* و *T. harzianum* در مهار زیستی پوسیدگی سفید سیر ناشی از *S. cepivorum* طی مطالعات گلخانه‌ای و مزرعه‌ای به اثبات رسید (Naraghi et al., 2016). پژوهش حاضر نیز به لحاظ افزایش ارتفاع بوته، وزن تر و خشک بوته بادام زمینی پس از کاربرد جدایه‌های *T. harzianum*، *T. viride* و *A. flavus* روی گیاه نتایج مشابهی را نشان داد. قارچ‌های *A. flavus*، *Penicillium citrium niger* و *P. spimulorum* باعث القاء و تولید متابولیت‌های ثانویه آلکالوئیدی در گیاه می‌شوند (Tang et al., 2011). این دسته از ترکیبات در حفاظت گیاهان مقابل عوامل بیماری‌زای میکروبی و نیز در رقابت گیاهان با یکدیگر و همزیستی گیاهان با میکروب‌ها نقش دارند (Wink, 2010). به‌نظر می‌رسد که قارچ‌های زیست‌مهار بحث حاضر نیز با اعمال روش‌هایی مشابه پس از استقرار روی گیاه و سپس با ایجاد تغییرات فیزیوشیمیایی در ساختار آن عملکرد مشابهی در مهار عامل بیماری و بهینه‌سازی صفات ریخت‌شناختی گیاه داشتند. در مطالعه‌ای در بوته‌های خیاری که با *Penicillium* و *Cheatomium* همراه با *S. rolfisii* به‌صورت هم‌زمان مایه‌زنی شده بودند، کاهش میزان شدت و درصد وقوع بیماری پوسیدگی طوقه خیار و نیز افزایش در ارتفاع، طول و حجم ریشه و وزن تر و خشک بوته

- Basumatary, M., Dutta, B. K., Singha, D. M., & Das, N. (2015). Some *in vitro* observations on the biological control of *Sclerotium rolfsii*, a serious pathogen of various agricultural crop plants. *Journal of Agriculture and Veterinary Science*, 8(2), 87-94. <https://doi.org/10.9790/2380-08228794>
- Bensch, K., Groenewald, J. Z., Dijksterhuis, J., Starink-Willemsse, M., Andersen, B., Summerell, B.A., Shin, H. D., Dugan, F. M., Schroers, H. J., Braun, U., & Crous, P. W. (2010). Species and ecological diversity within the *Cladosporium cladosporioides* complex (Davidiellaceae, Capnodiales). *Studies in Mycology*, 67, 1-94. <https://doi.org/10.3114/sim.2010.67.01>
- Bertrand, P. F., & Gottwald, T. R. (1997). Evaluation of fungicides for pecan disease control. In: K. D. Hickey, (ed.), *Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens*. (pp. 179-181). Oxford and IHB Publisher.
- Bindu Madhavi, G., & Bhattiprolu, S. L. (2011). Integrated disease management of dry root rot of chilli incited by *Sclerotium rolfsii* Sacc. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*, 1(2), 31-37. <https://www.researchgate.net/publication/259753683>
- Boland, G. J., & Hall, R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 16(2), 93-108. <https://doi.org/10.1080/07060669409500766>
- Booth, C. 1971. *Methods in microbiology*. Academic Press, New York.
- Bosah, O., Igalek, C. A., & Omorusi, V. I. (2010). *In vitro* microbial control of pathogenic *Sclerotium rolfsii*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 12(3), 474-476. <https://www.researchgate.net/publication/268063022>
- Burgess, D. R., & Hepworth, G. (1996). Biocontrol of *Sclerotinia* stem rot (*Sclerotinia minor*) in sunflower by seed treatment with *Gliocladium virens*. *Plant Pathology*, 45, 583-592. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.1996.d01-145.x>
- Cardoso, J. E., Santos, A. A., Rossetti, A. G., & Vidal, J. C. (2004). Relationship between incidence and severity of cashew gummosis in semiarid north-eastern Brazil. *Plant Pathology*, 53(3), 363-367. <https://doi.org/10.1111/j.0032-0862.2004.01007.x>
- Darvin, G., & Kumari, V. P. (2013). Effect of bio-control agents on radial growth of *Sclerotium rolfsii* *in vitro*. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 4(4), 61-64. <https://www.fortunejournals.com/ijabpt/pdf/24009-G.%20Darvin.pdf>
- Dennis, C., & Webster, J. (1971) (a). Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 41-48. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80078-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80078-5)

Dennis, C., & Webster, J. (1971) (b). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 25-39. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80077-3)

Dharmaputra, S. (1994). The possibility of controlling *Sclerotium rolfsii* on soybean using by *Trichoderma* and tebuconazole. *Biotropia*, 7, 18-29. <https://doi.org/10.11598/btb.1994.0.7.113>

Doley, K., Dudhane, M., & Borde, M. (2017). Biocontrol of *Sclerotium rolfsii* in groundnut by using microbial inoculants. *Notulae Scientia Biologicae*, 9(1), 124-130. <https://doi.org/10.15835/nsb.9.1.19992>

Ershad. J. (2009). *Iranian fungi*. Agricultural Research and Extension Organization Publications (in Farsi).

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

Gancsan, S., Ganesh Kuppusamy, R., & Sekar, R. (2007). Integrated management of stem rot disease (*Sclerotium rolfsii*) of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) using *Rhizobium* and *Trichoderma harzianum* (ITCC-4572). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 31(2), 103-108. <https://www.researchgate.net/publication/288556555>

Horsfall, J. G., & Barratt, R. W. (1945). An improved grading system for measuring plant Disease. *Phytopathology*, 35, 655.

Islam, M. M., Hossain, D. M., Nonaka, M., & Harada, N. (2016). Biological control of tomato collar rot induced by *Sclerotium rolfsii* using by *Trichoderma* species isolated in Bangladesh. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 50(3-4), 109-116. <https://doi.org/10.1080/03235408.2016.1265243>

Kakvan, N., Heydari, A., Zamanizadeh, H. R., Rezaee, S., & Naraghi, L. (2013). Development of new bioformulations using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal antagonists for biological control of sugarbeet damping-off disease. *Crop Protection*, 53, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.06.009>

Le, C. N., Kruijt, M., & Raaijmakers, J. M. (2012). Involvement of phenazines and lipopeptides in interactions between *Pseudomonas* species and *Sclerotium rolfsii*, causal agent of stem rot disease on groundnut. *Journal of Applied Microbiology*, 112, 390-403. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05205.x>.

McDonald, B. A., & Linde, C. (2002). Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 40, 349-379. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120501.101443>.

Mehri, Z., Khodaparast, S. A., & Mosa Nejad, S. (2013). Genetic diversity in *Sclerotium rolfsii* population based on mycelial compatibility groups in Guilan province, Iran. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 49(3), 317-324 (in Farsi with English summary).

Mirhosseini Moghadam, S. A. (2009). The most important fungal diseases of peanut in Guilan province and their control method. *Technical-Extension Journal of Guilan Jihad Agricultural Organization Publications*. pp.1-8 (in Farsi with English summary).

Mirhosseini Moghadam, S. A., Izadyar, M., & Rouhani, H. (1998). Antagonistic effect of *Trichoderma* and *Gliocladium* species on *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of peanut stem rot. *Proceedings of the 13th Iranian Plant Protection Congress*, pp. 404. Iran (in Farsi with English summary).

Naraghi, M. R., Heidari, A., Zamanizadeh, H., & Rezaei, S. (2016). Evaluation of biological control of *Sclerotium cepivorum* using *Trichoderma* and *Talaromyces* isolates in laboratory, greenhouse and field. *Proceedings of the 22th Iranian Plant Protection Congress*, p. 404. Iran (in Farsi with English summary).

Nawar, L. S. (2013). *In vitro* efficacy of some fungicides, bioagents and culture filtrates of selected saprophytic fungi against *Sclerotium rolfsii*. *Life Science Journal*, 10(4), 2222-2228. <https://b2n.ir/k32037>

Okhovat, S. M. (2006). Diseases of industrial grains. University of Tehran Press (In Farsi).

Parmar, H. J., Hassan, M. M., Bodar, N. P., Umrana, V. V., Patel, S. V., & Lakhani, H. N. (2015). *In vitro* antagonism between phytopathogenic fungi *Sclerotium rolfsii* and *Trichoderma* strains. *International Journal Applied Science*, 3(1), 16-19. <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v3i1.11845>

Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). Fungi and Food Spoilage. Springer.

Prasad, G., & Dwivedi, S. K. (2017). Efficacy of some bioagents *Sclerotium rolfsii* sacc. Causing root rot *Zea mays* L. crop. *European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 4(7), 478-481. <https://www.researchgate.net/publication/326519004>

Punja, Z. K. (1985). The biology, ecology and control of *Sclerotium rolfsii*. *Annual Reviews of Phytopathology*, 23, 97-127. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.23.090185.000525>

Punja, Z. K., & Grogan, R. G. (1983). Basidiocarp induction, nuclear condition variability and heterokaryon incompatibility in *Athelia (Sclerotium) rolfsii*. *Phytopathology*, 73, 1273-1278. <https://doi.org/10.1094/phyto-73-1273>

Radwan, M. B., Fadel, A. M., & 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. <https://www.hebron.edu/images/stories/hu-centers/pdf/Biological%20control%20of%20Sclerotium.pdf>

Rekha, D., Patil, M. B., Shridhar Shetty, P., Swamy, K. M., & Gamanagatti, R. B. (2012). *In vitro* screening of native *Trichoderma* isolates against *Sclerotium rolfsii* causing collar rot of groundnut. *International Journal of Science and Nature*, 3(1), 117-120. <https://b2n.ir/f13416>

Riker, A. J., & Riker, R. S. (1936). Introduction to research on plant diseases: A guide to the principles and practice for studying various plant-disease problems. (John S. Swift Co.: St Louis).

Sabet, K. K., Saber, M. M., El-Naggar, M. M., El-Mougy, N. S., El-Deeb, H. M., El-Saied, G., & El-Shahawy, I. (2013). Using commercial compost as control measures against cucumber root-rot disease. *Journal of Mycology*, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/324570>.

Safarzadeh Vishgahi, M. N., & Hosseinzadeh, G. (2009). The effect of method and amount of iron consumption on growth and yield of peanuts in Gilan. *Proceedings of the 1th National Conference on Oilseeds*, pp. 1-5. Iran (in Farsi with English summary).

Samavat, S., Heydari, A., Zamanizadeh, H. R., Rezaee, S., & Alizadehaliabadi, A. (2014). Comparison between *Pseudomonas aureofaciens* (chlororaphis) and *P. fluorescens* in biological control of cotton seedling damping-off disease. *Journal of Plant Protection Research*, *54*(2), 115-121. <https://doi.org/10.2478/jppr-2014-0019>

Sennoi, R., Jogloy, S., Saksirriat, W., Kesmla, T., Singkham, N., & Patanothai, A. (2012). Levels of *Sclerotium rolfsii* inoculums influence identification of resistant genotypes in *Jerusalem artichoke*. *African Journal of Microbiology Research*, *6*(38), 6755-6760. <https://doi.org/10.5897/AJMR12.1449>

Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R. S., Wijesundera, R. L. C., Marikar, F. M. T., & Abeyesekere, M. (2000). Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). *Phytoparasitica*, *28*(3), 240-247. <https://doi.org/10.1007/BF02981802>

Tang, Z., Rao, L., Peng, G., Zhou, M., Shi, G., & Liang, Y. (2011). Effects of endophytic fungus and its elicitors on cell status and alkaloid synthesis in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, *5*(11), 2192-2200. <https://doi.org/10.5897/JMPR.9000520>

Upadhyay, J. P., & Mukhyopadhyay, A. N. (1986). Biological control of *Sclerotium rolfsii* by *Trichoderma harzianum* in sugar beet. *Indian Phytopathology*, *39*, 394-396. <https://doi.org/10.1080/09670878609371066>

Valed Saravi, Z., Sadravi, M., & Bahrami, M. (2011). The effect of three biological products on rice leaf pod blight in the field. *Journal of Plant Protection*, *25*(1), 44-49 (in Farsi with English summary). <https://doi.org/10.22067/jpp.v25i1.9590>

Vikram, A., & Hamzehzarghani, H. (2011). Integrated management of *Sclerotium rollfsii* in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) under pot culture conditions. *Pest Technology*, *5*(1), 33-38.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., and Lorito, M. (2008). *Trichoderma*-plant pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry*, *40*, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. V. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: M.A Innis, D.H. Gelfand, J.J. Sninsky, T.J. White (Eds.), *PCR Protocols: A guide to methods and applications*, (pp. 315-322). Academic Press.

Wink, M. (2010). *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. Annual Plant Reviews Volume 39: Second edition, Blackwell Publishing Ltd.

Yaqub, F., & Shahzad, S. (2005). Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different crops and effect of inoculums density on colonization of mungbea and sunflower roots. *Pakistan Journal of Botany*, 37(1), 175-180. <https://www.researchgate.net/publication/266468138>

Zhong, S., & Steffenson, B. J. (2001). Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology*, 91(5), 469–476. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-18-2103>



© 2022 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/>).



Biological control of peanut white stem rot disease by antagonistic fungi in Guilan province

M. R. Safari Motlagh^{1*} and M. Farokhzad²

1. ***Corresponding Author:** Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran (ssafarimotlagh@yahoo.com; afarimotlagh@iaurasht.ac.ir)
2. M.Sc. Graduate student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran

Received: 25 September 2021

Accepted: 9 November 2021

Abstract

Background and Objectives

White stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* is a soilborne disease which is extensively common across the groundnut farms of Guilan province, especially during the harvest period. Using the beneficial microbial agents is an alternative method for applying the chemical fungicides.

Materials and Methods

To find the appropriate fungal antagonistic isolates for the biological control of peanut white stem rot, the effect of three isolates of *Trichoderma* spp., three isolates of *Penicillium* spp., two isolates of *Aspergillus* spp. and one isolate of *Cladosporium cladosporioides* were studied on *S. rolfsii* *in vitro* using dual culture, slide culture, volatile metabolites and non-volatile metabolites. Peanut plants were inoculated with these fungal isolates as well as *S. rolfsii* in greenhouse experiments, and parameters including disease severity, height, fresh weight, and dry weight of the plant were measured.

Results

The results showed that in the dual culture method, *T. harzianum* and *T. virens* were most capable of suppressing the mycelial growth of *S. rolfsii* with a suppression capability of 93.58% and 92.94%, respectively. In the slide culture method, all isolates turned out to be effective in suppressing the mycelia growth of *S. rolfsii*, except for *T. virens* and *T. viride*. In the volatile metabolite assay, *P. glabrum* and *A. flavus* with 81.25% and 75%, respectively and in the non-volatile metabolite method, *T. harzianum* and *T. viride* with 93.75% and 97.5% respectively showed the greatest ability to inhibit *S. rolfsii* mycelial growth. Moreover, the effects of these fungi on the control of *S. rolfsii* pathogen were explored in greenhouse trials. The results revealed that *P. glabrum* was 39.4% effective and *T. viride* was 38.8% effective in reducing the extent and intensity of the disease. Under the presence of the pathogen, the treatment of these antagonistic fungi in greenhouse conditions enhanced plant height, shoot and root fresh and dry weight. In the *in vitro* and greenhouse approaches, an analysis of

variance and a comparison of means of the attributes using the least significant difference (LSD) indicated significant differences ($P \leq 0.01$ and $P \leq 0.05$) among the examined fungi.

Discussion

The results of the *in vitro* and greenhouse trials showed that *T. viride*, *T. harzianum*, *P. glabrum*, *A. flavus*, and *C. cladosporioides*, which are present in the natural flora of groundnuts, have the potential capability of the biological control of *S. rolfisii* as the pathogen of groundnut stem white rot.

Keywords: *Disease severity, Groundnut, Physiological factors, Sclerotium rolfisii, Volatile metabolites*

Associate editor: R. Mostowfizadeh-Ghalamfarsa (Prof.)

Citation: Safari Motlagh, M. R., & Farokhzad, M. (2022). Biological control of peanut white stem rot disease by antagonistic fungi in Guilan province. *Plant Protection (Scientific Journal of Agriculture)*, 44(4): 53-75. <https://doi.org/10.22055/ppr.2021.17146>