ارزیابی دو گونه‌ی بومی *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma atroviride* علیه قارچ *Plenodomus lingam* عامل ساق سیاه کلزا در شرایط گلخانه

رحیمه اکبری[۱]، فاختک طلیعی[۲*]، کامران رهنما[۳] و زهرا وکیلی[۴]

۱- موسسه‌ی آموزش عالی غیر انتفاعی بهاران گرگان.
۲- گروه تولیدات گیاهی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبدکاووس.
۳- گروه گیاهپزشکی، دانشکده‌ی تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۴- دانش‌آموخته‌ی دکتری گروه گیاهپزشکی، دانشکده‌ی تولید گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
*نویسنده‌ی مسئول: Taliey.fa@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۵/۱۷ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۸

چکیده

در این تحقیق تاثیر قارچ‌های *Trichoderma harzianum* و *T. atroviride* علیه *P. lingam* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه بررسی شد. سنجش آزمایشگاهی به صورت آزمون‌های کشت متقابل و تولید ترکیبات فرار انجام گردید. برای سنجش گلخانه‌ای نیز از دو روش تیمار بذر با آنتاگونیست و مایه‌زنی اندام هوایی گیاهچه‌های کلزا با سوسپانسون اسپوری عوامل آنتاگونیست استفاده شد. آزمایش در قالب دو طرح کاملا تصادفی جداگانه با چهار تکرار انجام شد. درصد مرگ‌ومیر گیاهچه‌ها و شدت آلودگی حاصل تعیین گردید. نتایج نشان داد که هر دو گونه قارچ، توان آنتاگونیستی بالایی در برابر بیمارگر دارا بودند. در آزمون کشت متقابل، جدایه‌ها اثر آنتاگونیستی بالایی بر رشد میسلیوم *P. lingam* نشان دادند. دو جدایه‌ی *T. harzianum* و *T. atroviride* رشد قارچ را به ترتیب ۵۸/۶ و ۷۱/۴ درصد مهار کردند. درصد بازدارندگی از رشد دو جدایه، در آزمون ترکیبات فرار ۱۲۰ و ۲۴۰ ساعت پس از کشت، به ترتیب ۲۱-۱۵ و ۳۹-۳۱ درصد تعیین شد. در آزمون گلخانه‌ای هر دو گونه به طور معنی‌داری (P<۰/۰۱) شدت بیماری را نسبت به شاهد کاهش دادند. نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان داد که در روش تیمار بذر، جدایه‌های آنتاگونیست به ترتیب ۴۲/۵ و ۴۷ درصد بیماری را کاهش دادند. در تیمار اندام‌های هوایی با جدایه‌های *T. harzianum* و *T. atroviride*، شدت بیماری به ترتیب ۶۳/۱۳ و ۷۸/۷۹ درصد کاهش یافت. بنابراین هر دو گونه پتانسیل قابل توجهی برای مهار زیستی بیماری ساق سیاه کلزا دارند ولی در مجموع گونه *T. atroviride* موثرتر از گونه دیگر بر علیه این بیمارگر عمل کرد.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، کلزا، *Plenodomus lingam*، *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma atroviridae*.

مقدمه

شانکر ساقه یا ساق سیاه کلزا ناشی از *Leptosphaeria maculans* (Desm.)Ces. & de Not. (آنامورف: *Plenodomus lingam* (Tode) Desm) یک بیماری مهم کلزا در سرتاسر جهان است که به‌طور موثری در نواحی اصلی کشت کلزا شامل اروپا، استرالیا و آمریکای شمالی خسارت می‌زند (مارکرافت و همکاران ۲۰۱۲). همه‌گیری‌های ناشی از این قارچ، همواره زراعت کلزا را تحت تاثیر خود قرار داده است به طوری که در سال‌های ۹۵-۱۹۹۳ وقوع این بیماری سبب بروز خسارتی با ارزش ۳۰ میلیون دلار در انگلستان شده است (ویلیامز و فیت ۱۹۹۹). در ایران، این بیماری از استان‌های اردبیل، خوزستان، گیلان، گلستان، قزوین و مازندران گزارش شده است (زمان میرآبادی و همکاران ۲۰۱۰). همچنین گسترش بیماری سبب تشکیل

گروه‌های بیماری‌زایی جدید در شمال کشور و افزایش خسارت حاصل از آن‌ها شده است (افشاری‌آزاد و همکاران ۲۰۰۸؛ وکیلی و همکاران ۲۰۱۶). قارچ عامل بیماری در ابتدای فصل سبب بروز لکه برگی و همچنین شانکر ساقه و آلودگی غلاف و متعاقبا بذر در انتهای فصل می‌گردد (کازمارک و همکاران ۲۰۱۴). شدت بیماری[1] تا حد زیادی به شرایط آب و هوایی، منطقه‌ی جغرافیایی و نوع رقم کاشته شده بستگی دارد. خسارت متوسط ۱۰ درصد، در صورت توسعه بیماری تا ۵۰-۳۰ درصد افزایش می‌یابد (هوانگ و همکاران ۲۰۰۹). در صورتی که شرایط محیطی برای رشد عامل بیماری مساعد باشد، خسارت بیماری به ۹۰٪ نیز می‌رسد. بر اساس گزارشات، خسارت بیماری به ازای هر واحد افزایش در شدت بیماری، ۱۷/۲ درصد افزایش می‌یابد (ژانگ و همکاران ۲۰۱۴).

برای مهار این بیماری می‌توان از روش‌های زراعی مثل سوزاندن یا مدفون نمودن بقایای گیاهی، غرقاب کردن مزرعه، تناوب دو تا سه ساله با گیاهان غیر تیره‌ی چلیپائیان به ویژه غلات و کنترل علف‌های هرز (وست و همکاران ۲۰۰۱)، استفاده از ارقام مقاوم (دلورم و همکاران ۲۰۰۶)، کنترل زیستی (کاربانـدا و داهیا ۱۹۹۰) و کنترل شیمیایی (بالینگر و همکاران ۱۹۸۰) استفاده کرد. در حال حاضر کنترل بیماری اغلب به روش شیمیایی انجام می‌شود ولی سیاست جاری اتحادیه اروپا در مورد مدیریت تلفیقی آفات، بر کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی تاکید دارد (داویدزیک و همکاران ۲۰۱۶). با در نظر گرفتن مخاطرات زیست محیطی، کاربرد سموم شیمیایی در خاک و افزایش اقبال عمومی برای مصرف محصولات ارگانیک، مدیریت تلفیقی بیمارگرهای گیاهی و جایگزین نمودن یا در اولویت قراردادن روش‌های سالم و بی‌مخاطره مانند استفاده از عوامل بیوکنترل اهمیت بالایی پیدا می‌کند (خدایی و همتی ۲۰۱۶).

قارچ‌های هایپرپارازیت و آنتاگونیست نقش مهمی در مدیریت تلفیقی بیمارگرهای گیاهی و کاهش ورود سموم شیمیایی به طبیعت ایفا می‌کنند (واچوکا و همکاران ۲۰۱۳). عوامل آنتاگونیست، میکروارگانیسم‌هایی هستند که بر رشد، بقا و آلودگی گیاهان توسط بیمارگرها تاثیر می‌گذارند (چرمین و چت ۲۰۰۲) و جنس تریکودرما شناخته‌شده‌ترین جنس از قارچ‌های آنتاگونیست می‌باشد (بلازیک و همکاران ۲۰۱۴). گونه‌های تریکودرما منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه هستند که به عنوان قارچ‌کش و کودهای بیولوژیکی در گلخانه و مزرعه، با موفقیت مورد استفاده قرار می‌گیرند. این گونه‌ها، با سازوکارهای مایکوپارازیتیسم، آنتی بیوز و رقابت برای تامین مواد مغذی در تعاملات آنتاگونیستی ایفای نقش می‌کنند (آلووالیا و همکاران ۲۰۱۴). تولید آنزیم‌های خارج سلولی توسط گونه‌های مختلف این قارچ، نقش موثری در افزایش قدرت تهاجمی این قارچ‌ها علیه گونه‌های بیمارگر دارد (حبیبی و همکاران ۲۰۱۵). همچنین القای مقاومت سیستمیک در گیاه میزبان توسط جدایه‌های تریکودرما (علیزاده و سالاری ۲۰۱۶) و نقش موثر آن‌ها در کاهش جمعیت بیمارگر در بقایای گیاهی (طلیعی و همکاران ۲۰۱۲) مورد بررسی قرار گرفته است.

مطالعات متعددی در مورد کاربرد جدایه‌های تریکودرما در مهار زیستی بیمارگرهای قارچی مانند *Fusarium oxysporum* در خربزه (حبیبی و همکاران ۲۰۱۵)، *Phaeoacremonium minimum* در مو (نرمانی و همکاران ۲۰۱۷)، *Gaeumanomyces graminis* در گندم (آریان‌پور و همکاران ۲۰۱۵) و *Macrophomina phaseolina* در سویا (واصبی و همکاران ۲۰۱۲) انجام شده است. در مورد قارچ *Phoma* sp.، مطالعات مختار و دهیمات (۲۰۱۵) نشان داده است که گونه *T. harzianum* قادر است رشد میسلیومی جدایه‌های به دست آمده از گوجه‌فرنگی را ۳۹/۶ درصد کاهش دهد. همچنین داویدزیک و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که گونه‌های مختلف این قارچ با داشتن خاصیت سلولتیک بالا قادر به تجزیه‌ی بقایای گیاهی حاوی بیمارگر

[1]Disease severity

بوده و در عین حال مقاومت بالایی به قارچ‌کش فلوسینازول مورد استفاده در کنترل شیمیایی ساق سیاه کلزا دارند. بر اساس مطالعات انجام شده جدایه‌های تریکودرما قادرند در روش بذرمال ۵۶/۶-۱۶/۶ درصد و در تیمار اندام هوایی۷۶/۶-۶۰ درصد، مقدار بیماری ساق سیاه کلزا را کاهش دهند (پنجه‌که و همکاران ۲۰۱۱). به‌علاوه محصولات تجاری محتوی *T. asperellum* توانایی بالایی در کنترل بیماری‌های کلزا از جمله ساق سیاه کلزا داشته‌اند (مارکرافت و همکاران ۲۰۱۲). ولی مطالعات نشان داده است که توانایی گونه‌های مختلف آن در مهار بیمارگر متفاوت است (کوالسکا و رملین ۲۰۱۱) هدف از انجام این تحقیق بررسی تاثیر دو گونه‌ی بومی قارچ *T. harzianum* و *T. atroviride* علیه *P. lingam* جدا شده از استان گلستان در شرایط آزمایشگاه و گلخانه می‌باشد.

مواد و روش

تهیه‌ی جدایه‌های آنتاگونیست و جداسازی بیمارگر

جدایه‌های *T. harzianum* و *T. atroviride* از کلکسیون قارچ‌های آزمایشگاه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان دریافت شد. به منظور تهیه‌ی جدایه‌ی قارچ *P. lingam*، در طول فصل پائیز سال ۱۳۹۵ و بهار سال ۱۳۹۶ از مزارع کلزای استان گلستان بازدید به‌عمل آمد و بوته‌های دارای علائم تیپیک ساق سیاه نظیر لکه برگی و شانکر طوقه جمع‌آوری شد و پس از ضدعفونی سطحی در هیپوکلریت سدیم سه درصد و شستشو با آب مقطر استریل بر روی محیط کشت[1] PDA کشت و در دمای ۱±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند.

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ی به دست آمده بر روی رقم حساس هایولا ۴۰۱ به روش مایه‌زنی برگ‌های کوتیلدونی انجام شد. آزمایش در شرایط گلخانه و با استفاده از سوسپانسیون پیکنیدیوسپورهای قارچ با غلظت ۲×۱۰^{۷} انجام شد. برای مایه‌زنی گیاهان، ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپوری قارچ در محل زخم‌های کوچکی که بر روی کوتیلدون‌های ۱۵ روزه ایجاد شده بود، تلقیح شد و گلدان‌ها به زیر پوشش پلاستیکی منتقل گردیدند (مکناب و همکاران ۱۹۹۳). ارزیابی قدرت بیماری‌زایی با ثبت علائم کلروز، تولید پیکنیدیوم و نکروز رگبرگ و با توجه به معیار آلابووت و همکاران (۱۹۷۴) انجام شد.

بررسی آثار بازدارندگی عوامل آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه

۱- **آزمون کشت متقابل**: برای هرجفت از بیمارگر-آنتاگونیست، یک دیسک پنج میلی‌متری از حاشیه‌ی فعال پرگنه‌ی قارچ *Trichoderma* و *Plenodomus* در دو طرف تشتک پتری حاوی محیط کشت تغییر یافته‌ی PDA (۵۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم دکستروز و ۲۰ گرم آگار)، به فاصله‌ی یک سانتی‌متر از حاشیه‌ی تشتک کشت داده شدند. با توجه به سرعت پایین رشد قارچ *Plenodomus* و به منظور توسعه‌ی اولیه‌ی میسلیوم قارچ بیمارگر در محیط کشت، دیسک‌های حاوی میسلیوم این قارچ، چهار روز زودتر روی سطح محیط کشت قرار داده شدند. کشت‌ها در تاریکی و دمای ۲± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری شدند. تیمار شاهد شامل کشت هر یک از جدایه‌های بیمارگر و آنتاگونیست به تنهایی بود. خاصیت آنتاگونیستی جدایه‌ها، با استفاده از مقیاس صفر تا ۸+ پوپیل و همکاران (۲۰۰۸) تعیین شد که در آن صفر، بدون بازدارندگی و ۸+ بازدارندگی کامل از رشد بیمارگر توسط آنتاگونیست می‌باشد (شکل ۱). همچنین میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در مقایسه با شاهد، ۹۶ ساعت پس از شروع آزمایش، بر اساس رابطه‌ی زیر محاسبه گردید.

$$IG= [(C-T)/C] \times 100 \qquad [1]$$

که در آن IG درصد بازدارندگی از رشد میسیلیومی بیمارگر، C قطر پرگنه‌ی قارچی بیمارگر در شاهد و T قطر پرگنه‌ی قارچی بیمارگر در برابر آنتاگونیست می‌باشد. همچنین سرعت رشد هریک از جدایه‌های قارچی مورد بررسی به صورت روزانه اندازه‌گیری شد. آزمایش با

[1] Potato dextrose Agar

چهار تکرار انجام شد و دو بار تکرار گردید. نتایج با استفاده از آزمون t ($P<0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت.

۲- آزمون متابولیت‌های فرار: در این آزمون بر اساس روش دنیس و وبستر (۱۹۷۱) از روش تشتک‌های روی هم استفاده شد و دور تشتک‌ها با پارافیلم به‌خوبی مسدود شد تا از خروج ترکیبات فرار به خارج جلوگیری گردد. در تیمارهای شاهد نیز به‌جای استفاده از جدایه‌ی تریکودرما از دیسک دارای محیط غذایی PDA استفاده شد. کشت قارچ بیمارگر، چهار روز زودتر از آنتاگونیست انجام شد. ظروف تشتک در انکوباتور با دمای ۱± ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شده و قطر پرگنه‌ی قارچ بیمارگر ۱۲۰ و ۲۴۰ ساعت پس از شروع آزمایش، اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر براساس فرمول یک محاسبه و یادداشت شد. آزمایش با چهار تکرار انجام شد و نتایج با استفاده از آزمون t ($P<0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت.

۳- بررسی میکروسکوپی نحوه‌ی تأثیر جدایه‌های تریکودرما بر روی *P. lingam*: نحوه‌ی ارتباط بین ریسه‌ی جدایه‌های آنتاگونیست و بیمارگر، با کشت متقابل بیمارگر و دو گونه‌ی تریکودرما به صورت جداگانه، روی لام میکروسکوپی حاوی محیط کشت PDA در داخل تشتک‌های پتری سترون با سه تکرار بررسی شد (برگس و هپورس ۱۹۹۶) و با استفاده از میکروسکوپ نوری با بزرگ‌نمایی ۴۰ مورد بررسی قرار گرفت.

بررسی آثار بازدارندگی عوامل آنتاگونیست در گلخانه

۱- تیمار اندام‌های هوایی کلزا با عوامل آنتاگونیست: این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار برای هر گونه آنتاگونیست اجرا شد. ابتدا بذرهای کلزا در گلدان‌های محتوی ماسه در گلخانه با دمای ۳ ±۲۵ ^{o}C کشت شدند. در مرحله‌ی ۶-۴ برگی، ابتدا سوسپانسیون اسپوری عوامل آنتاگونیست با غلظت $۱۰^{۶}$ با آب‌پاش بر روی گیاهچه‌های کلزا پاشیده شد. بعد از حدود ۳-۲ ساعت که سطح برگ‌ها خشک شد، سوسپانسیون عامل بیماری‌زا با غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور بر میلی‌لیتر بر روی گیاهچه‌های کلزا پاشیده و سپس سطح گلدان‌ها با استفاده از کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شدند. در تیمار شاهد، گیاهچه‌ها فقط با سوسپانسیون اسپور قارچ عامل بیماری مایه‌زنی شدند و از آنتاگونیست استفاده نشد. پس از گذشت دو هفته، ضمن شمارش گیاهچه‌های سالم و آلوده، شاخص شدت آلودگی بر اساس مقیاس الابووت و همکاران (۱۹۷۴) محاسبه شد. همچنین میزان تأثیر عوامل آنتاگونیست براساس درصد کاهش بیماری نسبت به شاهد تعیین گردید. نتایج به دست آمده با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال ۱٪ ارزیابی شد.

۲- تیمار بذرهای کلزا با عوامل آنتاگونیست: در این روش مایه‌زنی خاک با استفاده از بذور گندم آلوده به *P. lingam* انجام شد. به این منظور ابتدا قارچ بیمارگر در ارلن‌های محتوی گندم سترون کشت داده شد. پس از ۱۴ روز، تعداد ۱۰ بذر گندم آلوده به فوما به‌طور پراکنده در هر گلدان محتوی ماسه سترون فرو برده شد. پس از یک هفته که میسلیوم‌های قارچ از سطح بذور گندم به داخل ماسه پیشروی کرد، بذور کلزای آغشته به آنتاگونیست‌ها کشت گردید. بذرهای کلزا پس از ضدعفونی سطحی در محلول هیپوکلریت سدیم یک درصد و شستشو با آب مقطر سترون، با سوسپانسیون به غلظت $۱۰^{۶}$ اسپور دو گونه آنتاگونیست *T. harzianum* و *T. atroviride* در میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی پودر ژلاتین آغشته شدند. سپس بذرها روی کاغذ صافی سترون در زیر هود لامینار با جزیان هوای سترون خشک شدند و هر بذر آغشته در مجاورت یک بذر گندم آلوده در ماسه قرار گرفت. در تیمار شاهد از بذرهای کلزای ضدعفونی شده استفاده شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار برای هر گونه آنتاگونیست اجرا شد. پس از گذشت دو هفته، میزان وقوع بیماری بر اساس درصد گیاهچه‌های آلوده ثبت گردید و میزان کاهش بیماری نسبت به شاهد تعیین شد. نتایج با استفاده از آزمون LSD در سطح احتمال یک درصد مورد تفسیر قرار گرفت.

نتایج

آزمون کشت متقابل

رشد میسلیومی قارچ بیمارگر، در کشت متقابل در برابر هر دو گونه تریکودرما کاهش یافت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اختلاف معنی‌داری ($P<0.05$) از نظر درصد بازدارندگی از رشد قارچ *P. lingam* بین دو گونه آنتاگونیست وجود دارد (جدول۱). هر دو گونه آنتاگونیست توانستند به طور موفقیت آمیزی رشد بیمارگر را بعد از هفت روز کاهش دهند. اما بیشترین درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر نسبت به شاهد در قارچ *T. atroviride* برابر با ۷۱/۴ درصد مشاهده شد در حالی که این مقدار برای قارچ *T. harzianum* برابر با ۵۸/۶ درصد بود (جدول ۲).

جدول ۱– نتایج آزمون t برای اثر بازدارندگی گونه‌های تریکودرما بر رشد هیف قارچ *Plenodomus lingam* در آزمون کشت متقابل و ترکیبات فرار (پنج و ۱۰ روز بعد).

تیمار	درجه آزادی	خطای استاندارد	آماره t
کشت متقابل	۶	۳/۷۷۹	-۳/۴۰۲*
متابولیت‌های فرار (روز پنجم)	۶	۲/۸۹۸	-۲/۲۱۵ ns
متابولیت‌های فرار (روز دهم)	۶	۲/۰۰۱	-۳/۷۱۱*

ns و * به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد می‌باشند.

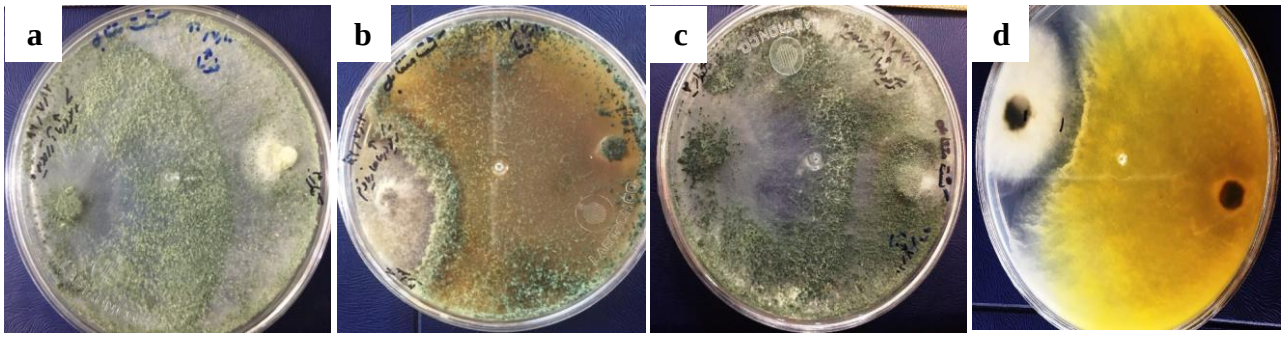
تشکیل هاله‌ی بازدارندگی با شعاع چند میلی‌متر توسط جدایه‌ی آنتاگونیست *T. harzianum* در کشت متقابل، نشان دهنده‌ی تولید آنتی‌بیوتیک توسط این گونه است. از بین دو گونه‌ی آنتاگونیست مورد بررسی، جدایه‌ی قارچ *T. atroviride* در محیط کشت PDA پس از متوقف نمودن رشد پرگنه‌های قارچ عامل بیماری شروع به پیش‌روی و کلنیزاسیون ریسه‌های قارچ *P. lingam* نمود. هم‌چنین پس از گذشت ۱۰ روز تنها جدایه‌ی قارچ *T. atroviride* موفق به اسپورزایی روی پرگنه‌های قارچ عامل بیماری شد (جدول ۲، شکل ۲).

جدول۲- سرعت رشد شعاعی دو گونه قارچ *Trichoderma* و درصد بازدارندگی از رشد *Plenodomus lingam* در کشت متقابل با آن‌ها.

آنتاگونیست	سرعت رشد شعاعی (mm/day ± SE)	درصد بازدارندگی از رشد *P. lingam*	مقیاس کشت متقابل
Trichoderma harzianum	۲۳/۰۳±۰/۰۱	۵۸/۵۷ b	+۴
Trichoderma atroviride	۲۹/۳۳±۰/۰۲	۷۱/۴۳ a	+۸

- نتایج میانگین چهار تکرار می‌باشند.
- حروف متفاوت در ستون نشان دهنده‌ی وجود اختلاف معنی‌دار در آزمون t ($P<0.05$) می‌باشند.

بررسی میانگین رشد شعاعی پرگنه‌ی قارچ‌های آنتاگونیست نشان داد که هر دو گونه دارای سرعت رشد بالاتری نسبت به بیمارگر بودند. بیشترین سرعت رشد در مورد قارچ *T. atroviride* مشاهده شد که برابر ۲۹ میلی‌متر بر روز بود. سرعت متوسط رشد روزانه برای *T. harzianum* برابر ۲۳ میلی‌متر بر روز تعیین شد. قارچ بیمارگر، قارچی کند رشد با متوسط رشد روزانه‌ی سه میلی‌متر بود.

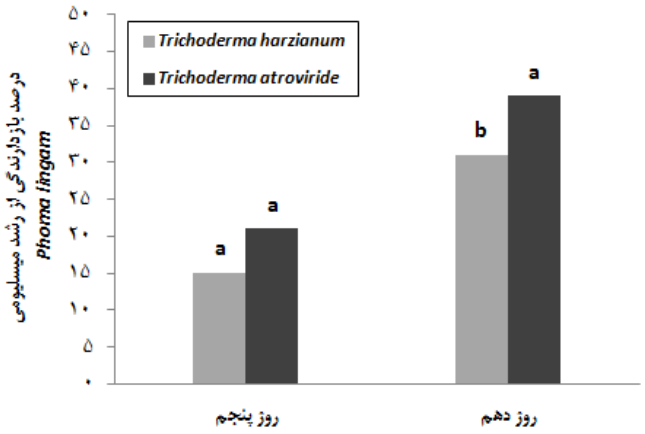


شکل ۲- کشت متقابل جدایه *P. lingam* (دیسک سمت راست در تصویر a و سمت چپ در تصویر b) در برابر *T. atroviride* (دیسک سمت چپ در a) و *T. harzianum* (دیسک سمت راست در b). (تصاویر مربوط به کشت ده روزه در محیط PDA تغییر یافته می‌باشد). C) پوشیده شدن کامل بیمارگر توسط جدایه آنتاگونیست *T. atroviride*، d) تشکیل هاله بازدارنده **توسط قارچ *T. harzianum*.**

آزمون ترکیبات فرار

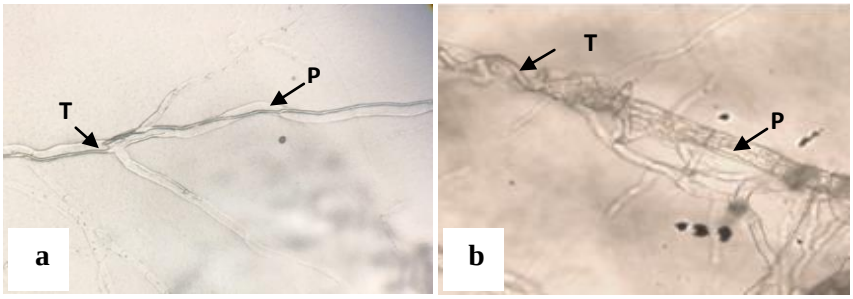
نتایج نشان داد که با گذشت زمان و مسن شدن کلنی آنتاگونیست، میزان تولید متابولیت‌های فرار و تاثیر آنها در بازداری رشد رویشی بیمارگر افزایش یافته است. بین درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی عامل بیماری توسط متابولیت‌های فرار جدایه‌های آنتاگونیست مورد آزمون، ده روز پس از شروع آزمایش، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد مشاهده شد (جدول ۱). بیشترین اثر بازدارندگی ۱۰ روز پس از شروع آزمایش و با *T. atroviride* (۳۹/۱۱ درصد) مشخص شد. در حالی که این میزان در مورد *T. harzianum* برابر ۳۱/۶ درصد بود (شکل ۳). میزان بازدارندگی از رشد *P. lingam* در روز پنجم پس از شروع آزمایش برای دو گونه‌ی مورد بررسی به ترتیب برابر ۲۱/۷ و ۱۵ درصد بود که اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نشان نداد.

نتایج آزمون کشت متقابل قارچ بیمارگر و گونه‌های آنتاگونیست روی لام نشان داد که جدایه‌های قارچ *Trichoderma*، رشد میسلیومی قارچ *P. lingam* را به میزان قابل توجهی کاهش دادند. در بررسی‌های میکروسکوپی مشخص گردید که هیف‌های تریکودرما در مراحل اولیه‌ی برخورد با هیف‌های بیمارگر، علائمی از تماس و پیچیدگی میسلیومی به دور میسلیوم‌های *P. lingam* را نشان می‌دهند. میسلیوم‌های بیمارگر نیز در مواجه با جدایه‌های آنتاگونیست دچار اختلالاتی شدند. انقباض، تغییرشکل و رنگ و متلاشی شدن از جمله این اختلالات است. همچنین پدیده‌ی لیزشدگی، پس از هفت روز ظاهر شد و در محل برخورد میسلیوم‌های دو قارچ، مقدار زیادی از محتویات میسلیوم *P. lingam* به بیرون تراوش کرده و در اطراف آن جمع گردید (شکل ۴).



مکانیسم کنترل *P. lingam* توسط جدایه‌های تریکودرما

شکل ۳- درصد بازدارندگی از رشد شعاعی قارچ *P. lingam* توسط دو گونه تریکودرما در آزمون ترکیبات فرار.



شکل ۴- بررسی میکروسکوپی (40×) سازوکار پارازیتیسم *P. lingam* (P) توسط گونه‌های قارچ تریکودرما (T).
a - حرکت ریسه تریکودرما در موازات ریسه بیمارگر،:b- نفوذ از طریق ایجاد انشعاب و پیچش ریسه باریک تریکودرما دور ریسه بیمارگر.

بررسی اثر بیوکنترلی گونه‌های تریکودرما در گلخانه

در هر دو روش تیمار بذر و اندام هوایی، شاخص شدت بیماری، بین تیمارهای مختلف اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد نشان داد (جدول ۲). در تیمار بذور کلزا با اسپورهای گونه‌های *Trichoderma*، بیشترین مقدار وقوع بیماری (۸۲/۵ درصد) در تیمار شاهد بدون آنتاگونیست مشاهده شد که اختلاف معنی‌داری با کاربرد تریکودرما داشت. اما از نظر درصد گیاهچه‌های دارای علایم بیماری، اختلاف معنی‌داری بین دو گونه تریکودرما مشاهده نشد (شکل ۴).

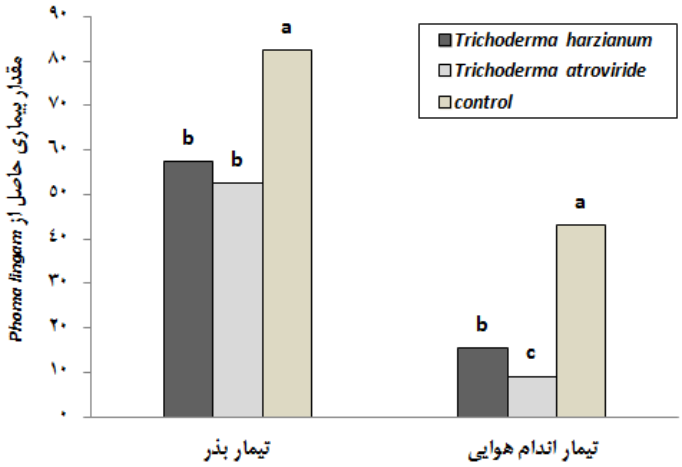
در تیمار اندام‌های هوایی گیاه با بیمارگر و آنتاگونیست نیز اختلاف معنی‌داری (P <۰/۰۱) بین تیمارها مشاهده شد (جدول ۲). بیشترین میزان شاخص بیماری در تیمار شاهد بدون آنتاگونیست مشاهده شد به عبارت دیگر کاربرد دو گونه *T. atroviride* و *T. harzianum* تاثیر معنی‌داری بر کاهش شاخص بیماری داشت. در بین دو گونه‌ی مورد مطالعه، شاخص بیماری حاصل از تیمار با *T. atroviride* به طور معنی‌داری (P <۰/۰۱) کمتر از گونه‌ی دیگر بود. مقدار شاخص بیماری در دو گونه‌ی مذکور به ترتیب ۹/۱ و ۱۵/۵ درصد بود (شکل ۵).

جدول۳- تجزیه واریانس تاثیر گونه‌های تریکودرما بر مقدار بیماری حاصل از قارچ *Plenodomus lingam* در دو روش تیمار بذر و اندام‌های هوایی در نمونه‌های تیمار شده و شاهد در شرایط گلخانه.

		میانگین مربعات	
	درجه‌ی آزادی	تیمار بذر	تیمار اندام‌های هوایی[a]
تیمار	۳	۱۰۳۳/۳**	۰/۴۸**
خطا	۹	۴۷/۲	۰/۰۰۵
ضریب تغییرات		۲۳/۴	۲۴/۲

**: نشان‌دهنده‌ی معنی‌دار بودن در سطح احتمال ۱٪ می‌باشد.

a: داده‌ها با لگاریتم تبدیل شده‌اند.



شکل ۵- اثر دو روش تیمار بذر و اندام هوایی کلزا توسط دو گونه قارچ تریکودرما بر مقدار بیماری حاصل از قارچ *P. lingam* در آزمون گلخانه‌ای.

بحث

این تحقیق روی جدایه‌ی *P. lingam* جدا شده از مزارع کلزای آلوده‌ی استان گلستان صورت گرفت. نتایج آزمون بیماری‌زایی بر روی کوتیلدون‌های رقم حساس هایولا ۴۰۱ نشان داد که جدایه‌ی مزبور لکه‌هایی با قطر ۱۸ میلی‌متر و متوسط هشت پیکنیدیوم در هر لکه، تولید نمود. متوسط درجه‌ی بیماری‌زایی برای این جدایه ۶/۶ به دست آمد که مطابق با گزارشات (زمان میرآبادی و همکاران ۲۰۱۰)، دارای قدرت بیماری‌زایی بالایی می‌باشد. این جدایه در هر دو روش آزمایش (مایه‌زنی بذر و اندام هوایی) توان بیماری‌زایی بالایی نشان داد.

نتایج این تحقیق نشان داد که هر دو گونه‌ی قارچ تریکودرما توانایی کنترل قارچ عامل شانکر ساقه کلزا را دارند. علی‌رغم اینکه گونه *T. harzianum* در کشت متقابل ناحیه بازدارنده نشان داد که موید وجود خاصیت آنتی‌بیوز توسط این گونه‌ی قارچی است، اما نتایج نشان داد که گونه *T. atroviride* بیشترین درصد بازدارندگی را ایجاد می‌کند. همچنین گونه‌ی اخیر قادر است پس از متوقف نمودن رشد پرگنه‌های بیمارگر، ریسه‌های قارچ *P. lingam* را کلونیزه نموده و پس از هفت روز روی پرگنه‌های آن اسپورزایی نماید. قدرت بیشتر این گونه در بازداری از رشد عامل بیماری را می‌توان به سرعت رشد بیشتر آن در محیط کشت و برخورد سریع‌تر با ریسه‌های بیمارگر نسبت داد به طوری‌که بدون حضور بیمارگر در مدت سه روز، سطح تشتک پتری را پوشاند به همین علت در حضور بیمارگر نیز، به علت سرعت رشد بالا و برخورد با ریسه بیمارگر از رشد آن ممانعت نمود. پنجه‌که و همکاران (۲۰۱۱) نشان دادند که در آزمون کشت متقابل، از بین ۱۵ جدایه‌ی *Trichoderma*، تنها یک جدایه قادر به رشد و اسپورزایی روی پرگنه‌ی قارچ *P. lingam* بود که این جدایه بیشترین تاثیر بازدارندگی از رشد بیمارگر را نشان داد. همچنین داویدزیک و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که گونه *T. atroviride* قادر است هر دو گونه *L. maculans* و *L. biglobosa* را در آزمون کشت متقابل به خوبی مهار نماید ولی دو گونه *T. harzianum* و *T. hamatum* تاثیر بیشتری بر کنترل رشد میسلیومی *L. biglobosa* داشتند.

در آزمون تولید ترکیبات فرار نیز گونه‌ی *T. atroviride* توانایی بازدارندگی بیشتری در برابر بیمارگر نشان داد که با افزایش سن پرگنه، میزان بازدارندگی افزایش یافت که این بیان‌گر افزایش تولید متابولیت‌های فرار بازدارنده بوسیله جدایه قارچ آنتاگونیست با مسن شدن پرگنه آنها می‌باشد. شهیری طبرستانی و همکاران (۲۰۱۷) نشان دادند که متابولیت‌های فرار تولید شده توسط قارچ *T. atroviride*، می‌توانند به خوبی رشد میسیلیومی و تولید اسکلروت

قارچهای بیمارگر *M. Phaseolina* و *Sclerotinia sclerotiorum* را کنترل نمایند. همچنین بیشتر نژادهای *Trichoderma* متابولیت‌های سمی فرار و غیرفرار تولید می‌کنند که از کلونیزه شدن محیط اطراف خود بوسیله میکروارگانیسم‌های دیگر جلوگیری می‌کند (ویناله و همکاران ۲۰۰۶). بر اساس تحقیقات انجام شده، تأثیر متابولیت‌های فرار گونه‌های مختلف تریکودرما و درصد بازدارندگی آن‌ها روی بیمارگرهای خاک‌زاد با افزایش مدت تأخیر کشت بیمارگر نسبت به جدایه‌های تریکودرما افزایش می‌یابد (حاجی‌اقراری و همکاران ۲۰۰۸). به دلیل تولید مواد بازدارنده با فشار بخار بالا و تبخیر سریع آنها و امکان نفوذ آن در خلل و فرج خاک، این گونه اهمیت بالایی در کنترل عوامل بیماری‌زای خاک‌زاد دارد (نرمانی و همکاران ۲۰۱۷).

بررسی ساز و کار کنترلی قارچهای آنتاگونیست در برابر بیمارگر نیز نشان داد که هر دو گونه قادرند به روش‌های مختلف، رشد میسلیومی بیمارگر را مهار نمایند. تحقیقات نشان داده است که ریسه‌های تریکودرما قادرند با رشد بر روی میسلیوم‌های *P. lingam* و پیچیدن به دور آن، سبب تخریب ریسه های بیمارگر شوند (مختار و دهیمات ۲۰۱۵). جدایه‌های تریکودرما با تولید آنزیم‌های گلوکاناز و کیتیناز سبب لیز شدن ریسه در قارچهای مختلف می‌گردند (دنیس و وبستر ۱۹۷۱). مایکوپارازیتیسم یکی از سازوکارهای اصلی آنتاگونیستی قارچ تریکودرما به عنوان عامل بیوکنترلی است. تحقیقات نشان داده است که گونه‌های *Trichoderma* spp قدرت تغذیه‌ای و رقابتی بالایی در محیط کشت و خاک دارند و به این ترتیب رشد بسیاری از بیمارگرهای قارچی گیاهان را متوقف کرده یا کاهش می‌دهند. همچنین تولید طیف وسیعی از مواد فرار و غیرفرار (شامل آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها) علیه قارچهای مختلف توسط گونه‌های *Trichoderma* spp گزارش شده است (اعتباریان ۲۰۰۶). به علاوه وجود آنزیم‌های مختلف تجزیه‌کننده‌ی دیواره‌ی سلولی بیمارگر و بافت گیاهی مانند سلولاز، لامیناریناز، β-۱و۳ گلوکاناز، کیتیناز و کیتوبیاز در ترشحات تریکودرما باعث می‌شود که علاوه بر تخریب میسلیوم بیمارگرهای قارچی، بافت‌های گیاهی نیز با سرعت بیشتری تجزیه شوند (بولار و همکاران ۲۰۰۰).

روش کاربرد گونه‌های تریکودرما در گلخانه و مزرعه نیز حایز اهمیت بوده و این مسئله در قدرت و مدت پایداری این عوامل در خاک تأثیر گذار است (سینگ و همکاران ۲۰۰۷). بررسی تاثیر عوامل آنتاگونیست در شرایط گلخانه نشان داد که در روش تیمار بذر از آنجا که زادمایه‌ی عامل بیماری در خاک زودتر از کاشت بذور کلزای تیمار شده با تریکودرما صورت گرفت، بنابراین بیمارگر فرصت کافی جهت استقرار در خاک را داشت. اگرچه درصد بالایی از بیماری ظاهر شد اما هر دو گونه آنتاگونیست موفق به کنترل بیماری شدند به طوری که دو گونه *T. atroviride* و *T. harzianum* درصد بیماری را به‌ترتیب ۴۷ و ۴۲/۵ کاهش دادند. همچنین در روش تیمار اندام‌های هوایی، نتایج نشان داد که دو گونه مزبور توانستند شدت بیماری حاصل را به ترتیب ۷۸/۷۹ و ۶۳/۱۳ درصد کاهش دهند. بر اساس مطالعات پنجه‌که و همکاران (۲۰۱۱) جدایه‌های مختلف تریکودرما قادرند به روش تیمار بذری، شدت بیماری ساق سیاه کلزا را ۱۰ تا ۵۶/۶ درصد و در روش تیمار اندام‌های هوایی ۱۷ تا ۶۰ درصد کاهش دهند. درصد کاهش بیماری در این تحقیق در روش تیمار اندام‌هوایی بیشتر از تیمار بذری بود که با نتایج ایشان مطابقت دارد.

بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که در هر دو روش مورد استفاده، قارچ *T. atroviride* توانایی بالاتری در مهار بیماری ایجاد شده دارد. داویدزیک و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که از بین چهار گونه‌ی تریکودرمای مورد مطالعه، هر دو گونه *T. atroviride* و *T. harzianum* قادرند شدت بیماری لکه برگی فوما را در کلزا کاهش دهند. اما میزان کاهش بیماری ایجاد شده توسط گونه‌های مختلف در ارقام مختلف کلزا متفاوت است. بنابراین به نظر می‌رسد با توجه به سرعت متفاوت رشد برگ و ریخت-شناسی (شکل و اندازه) آن و نیز درجات متفاوت مقاومت

ارقام مختلف به بیماری، بهترین روش، استفاده از مخلوطی از جدایه‌های آنتاگونیست در کنترل موثر این بیماری باشد.

اگرچه کنترل شیمیایی تنها روش کنترل بیماری‌های گیاهی نیست و امروزه تاثیر میکروارگانیسم‌های مختلف در کنترل زیستی بیمارگرهای مختلف کلزا اثبات شده است اما اطلاعات کافی در زمینه‌ی بیوکنترل *L. maculans* در ایران موجود نیست و تنها خاصیت آنتاگونیستی چند جدایه‌ی باکتری *Bacillus subtilis* و قارچ *Trichoderma* sp. مورد مطالعه قرار گرفته است (پنجه‌که و همکاران ۲۰۱۱) که پایداری با کتری‌های آنتاگونیست در مقایسه با قارچ‌ها در شرایط کاهش پتانسیل رطوبتی خاک ضعیف تر بوده و کاربرد عملی آن، همواره سوال برانگیز بوده است.

نکته‌ی مهم در کاربرد آنتاگونیست‌ها در مدیریت بیماری‌های گیاهی، میزان کارایی آن ها در شرایط مزرعه‌ای می‌باشد. تحقیقات نشان داده است که کاربرد سوسپانسیون اسپورهای *Trichoderma* در شرایط مزرعه سبب کاهش معنی‌دار شدت و وقوع بیماری حاصل از *L. maculans* می‌شود (داویدزیک و همکاران ۲۰۱۶). همچنین مصرف یک فرآورده زیستی با نام تجاری سوپرسیویت که دارای اسپورهای قارچ *T. harzianum* به میزان ۵ گرم در هرکیلو کود معدنی است، شدت لکه برگی‌های ناشی از *P. lingam* در کلزا را تا ۱۰ درصد در شرایط مزرعه کاهش می‌دهد (هایسک و همکاران ۲۰۰۲). از سوی دیگر در کاربرد این قارچ آنتاگونیست، مقاومت آن‌ها به قارچ‌کش‌های سیستمیک گروه آزول نکته مهمی است (خان و شهزاد ۲۰۰۷). مطالعات نشان داده است که گونه‌های مختلف تریکودرما در محیط کشت مقاومت بالایی به قارچ‌کش فلوسینازول نشان می‌دهند در حالی که گونه‌های *Leptosphaeria* حساس به این ترکیب می‌باشند (داویدزیک و همکاران ۲۰۱۶). بنابراین امکان استفاده هم‌زمان از کنترل شیمیایی و زیستی، برای کنترل موثرتر این بیماری نیز فراهم می‌آید. بر اساس بررسی های گذشته کاربرد مقدار کمتر سموم شیمیایی سبب تضعیف بیمارگر و افزایش میزان حساسیت آن به عامل آنتاگونیست می‌گردد (هلجورد و ترانسو ۱۹۹۸). اجرای تحقیقات بیشتر در مورد شرایط اکولوژیکی مناسب برای این عوامل و بقای آنها در خاک و اندام‌های هوایی و همچنین نحوه کاربرد آنها در سطح مزرعه و کاربرد توامان آن‌ها با سموم شیمیایی مورد نیاز است.

منابع

Afshari Azad H, Dalili SR, Salati M, and Amini Khalaf MA, 2008. Distribution of canola blackleg disease in Iran. Proc. 18th Iranian. Plant Protection Congress, Hamedan, Iran. 199(Abst.).

Ahluwalia V, Waliaa S, Satib P, Kumara J, Kundua A, Shankara J., and Paulc Y.S. 2014. Isolation, characterisation of major secondary metabolites of the Himalayan *Trichoderma koningii* and their antifungal activity. Archives of Phytopathology and Plant Protection 47(9): 1063–1071.

Alabouvette C, Brunin B , and Louvet J 1974. Studies on rape disease caused by *Leptosphaeria maculans*. Pycnidiospore infectivity and varietal susceptibility. Ann. Phytopathology 6: 265-280.

Alizadeh H, and Salari KH. 2012. Induction of Systemic Resistance (ISR) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis* cucumerinum on Cucumber by Isolates of *Trichoderma* and Fluorescent Pseudomonads from Cucumber Rhizosphere. Applied Research in Plant Protection 5(2):215-225.

Arianpour A, Sadravi M, and Taghavi SM. 2015. Biological Control of Wheat Take-all Disease with Native Isolates of *Pseudomonas fluorescens* and *Trichoderma harzianum* from Fars Province. Applied Research in Plant Protection 5(1):159-168.

Ballinger DJ, Salisbury PA, Dennis JI, Kollmorgen JF and Potter TD, 1988. Evaluation of fungicides, applied at sowing, for control of blackleg in rapeseed. Australian Journal of Experimental Agriculture 28, 511–515.

Blaszczyk L, Siwulski M, Sobieralski K, Lisiecka J and Jedryczka M. 2014 *Trichoderma* spp. Application and prospects for use in organic farming and industry. Journal of Plant Protection Research 54:309–317

Bolar JP, Norelli JJ, Wong KW, Hayes CK, Harman EE and Aldwinckle HS, 2000. Expression of endochitinas from *Trichoderma hrzianum* in transgenic apple scab and reduced vigor. Phytopathology 90:72-77.

Burgess DR, and Hepworth G. 1996. Biocontrol of Sclerotinia stem rot (*Sclerotinia minor*) in sunflower by seed treatment with *Gliocladium virense*. Plant Pathology, 45: 58.

Chernin L, and Chet I. 2002. Microbial enzymes in biocontrol of plant pathogens and pests. In: Burns R, Dick R (eds.) Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications. Marcel Dekker Inc., New York, pp 171–225.

Dawidziuk A, Popiel D, Kaczmarek J, Strakowska J and Jedryczka M. 2016. Optimal *Trichoderma* strains for control of stem canker of brassicas: molecular basis of biocontrol properties and azole resistance. BioControl 61:755–768.

Delourme R, Chevre AM, Brun H, Rouxel T, Balesdent MH, Dias JS, Salisbury P, Renard M, and Rimmer S.R. 2006. Major gene and polygenic resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape *(Brassica napus)*. European Journal of Plant Pathology 114, 41-52.

Dennis C., and Webster J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. Production of volatile antibiotics. Transactions of British Mycological Society 57: 25-29.

Etebarian HR. 2006. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of charcoal stem rot in melon caused by *Macrophomina phaseolina*. Journal of Agricultural Science and Technology 8:243-250.

Habibi R, Rahnama K, and Taghi nasab M. 2015. Evaluating the effectiveness of Native *Trichoderma* Species in Production of Extracellular Enzymes during Interaction with Plant Pathogenic Fungus *Fusarium oxysporum*. Applied Research in Plant Protection. 4(2):73-85.

Hajiegharari B, Torabi-giglou M, Mohammadi MR, and Davari M. 2008. Biological potantial of some Iranian *Trichoderma* isolates in the control of soil borne plant pathogenic fungi. African Journal of Biotechnology, 7: 967- 972.

Hjeljord L and Tronsmo A. 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: Harman GE, Kubicek CP (eds.) *Trichoderma* and *Gliocladium* enzymes, biological control and commercial applications. Taylor and Francis Ltd, London, Great Britain, pp 131–151.

Huang YJ, Pirie EJ, Evans N, Delourme R, King GJ, and Fitt BDL. 2009. Quantitative resistance to symptomless growth of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) in *Brassica napus* (oilseed rape). Plant Pathology 58, 314-323.

Hysek J, Vach M, Brozova J, Sychrova E, Civinova M, Nedelnik J, and Hruby J. 2002. The influence of the application of mineral fertilizers with the biopreparation supresivit (*Trichoderma harzianum*) on the health and the yield of different crops. Archiv. Phytopathology Pflanzenschutz 35: 115-124.

Kaczmarek J, Brachaczek J and Jedryczka M. 2014. The effect of fungicide spray time on the incidence of stem canker of brassicas and seed yield of winter oilseed rape in Pomerania. Journal of Plant Disease Protection 121:58–63.

Karbanda PD, and Dahiya JS. 1990. A metabolite of *Penicillium verrucosum* inhibitory to growth of *Leptosphaeria maculans* and *Rhizoctonia solani*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12, 335-338.

Khan MO and Shahzad S. 2007. Screening of *Trichoderma* species for tolerance to fungicides. Pakistan Journal of Botany 39:945–951.

Khodaei M, and Hemmati R. 2016. Investigation of *Trichoderma* isolates efficiency in biological control of Rhizoctonia root rot of bean in Zanjan. Journal of Plant Protection 29(4): 471-480.

Kowalska J and Remlein-Starosta D. 2011. Research of nonchemical methods of winter oilseed rape protection in Poland. Journal Research Applied Agricultural Engineering 56:220–223.

Marcroft SJ, Van de Wouw AP, Salisbury PA, Potter TD and Howlett, BJ. 2012. Rotation of canola (*Brassica napus*) cultivars with different complements of blackleg resistance genes decreases disease severity. Plant Pathology 61(5):934-944.

McNabb W, Van Den Berg CGJ, and Rimmer SR. 1993. Comparison of inoculation methods for selection of plants resistant to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. Canadian Journal of Plant Science 73: 1199-1207.

Mokhtar H, and Dehimat L. 2015. In vitro and In vivo Efficiency of *Trichoderma harzianum* against *Phoma* and *Glocladium* Soft Rot Occurred on Tomato Fruits (*Lycopersicon esculentum*). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 4(8): 141-147.

Narmani A, Arzanlou M, and Babei Ahari A. 2017. Antagonistic Effect of Endophytic and Commercial *Trichoderma* Isolates on *Phaeoacremonium minimum*, the Causal Agent of Leaf Stripe Disease of Grapevine. Applied Research in Plant Protection 7(1):151-169.

Panjehkeh N, Saberyan A, Afshari Azad H,and Salari M. 2011. Biological control of *Phoma lingam*, the causal agent of rapeseed blackleg by *Trichoderma* and *Bacillus subtilis* isolates. Iranian Journal Plant Pathology 47(1): 3-5.

Popiel D, Kwasna H, Chelkowski J, Stepien L, and Laskowska M. 2008. Impact of selected antagonistic fungi on *Fusarium* species—toxigenic cereal pathogens. Acta Mycologica 43:29–40.

Shahiri Tabarestani M, Rahnama K, Jahanshahi M, Nasrollahnejad S and Fatemi MH. 2017. Extraction and determination of *Trichoderma atroviridae* (6022) secondary metabolites and their antifungal effects. Journal of Plant Protection 31(1):131-141.

Singh A, Srivastava S, and Singh HB. 2007. Effect of substrates on growth and shelf life of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. Bioresource Technology 68: 470-473.

Taliei F, Safaie N, and Aghajani MA. 2012. Survival of *Macrophomina phaseolina* and Associated Mycobiota on Soybean Residuals and the Effect of *Trichoderma harzianum* on Their Population Dynamics. Applied Research in Plant Protection. 1(1):1-13.

Vakili Z, Rahnama K, Nasrollahnezhad S, and Yamchi A. 2016. First report of pathogenicity group 3 and 4 *Leptosphaeria maculans*, the causal agent of blackleg disease of oilseed rape in Northern Iran. Iranian Journal Plant Pathology 52(4): 551-554.

Vasebi Y, Alizadeh A, and Safaie N. 2012. Biological Control of Soybean Charcoal Rot Caused by *Macrophomina Phaseolina* Using *Trichoderma harzianum*. Agricultural science and sustainable production 22 (1):41-54.

Vinale F, Marra R, Scala F, Ghisalberti EL, Lorito M and Sivasithamparam K, 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Letters in Applied Microbiology 43: 143-8.

Wachowska U, Irzykowski W, Jedryczka M, Stasiulewicz- Paluch AD and Glowacka K. 2013. Biological control of winter wheat pathogens with the use of antagonistic *Sphingomonas* bacteria under greenhouse conditions. Biocontrol Science and Technology 23:1100–1122.

West JS, Kharbanda PD, Barbetti MJ, and Fitt BDL. 2001. Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (phoma stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. Plant Pathology 50:10–27

Williams PH, and Fitt BDL. 1999. Differentiating A and B groups of *Leptosphaeria maculans,* causal agent of stem canker (blackleg) of oilseed rape. Plant Pathology 48: 161-175.

Zaman Mirabadi A, Rahnama K, Sadravi M, and Salati M. 2010. Identification, distribution and symptomology of the causal agents of rapeseed blackleg (*Leptosphaeria maculans* and *Leptosphaeria biglobosa*) in Mazandaran and Golestan provinces and determination of three common rapeseed cultivars susceptibility reaction. Iran. Journal of Plant Pathology 45(4): 75-78

Zhang X., White R.P., Demir E, Jedryczka M, Lange RM, Islam M, Li ZQ., Huang Y.J., Hall A. M., Zhou G., Wang Z., Cai X., Skelsey P. and Fitt B.D.L. 2014. *Leptosphaeria* spp., phoma stem canker and potential spread of *L. maculans* on oilseed rape crops in China. Plant Pathology 63:598-612.

Evaluation of Two Native Isolates of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma atroviride* against *Plenodomus lingam*, the Causal Agent of Rapeseed Blackleg Under Greenhouse Conditions

R Akbari[1], F Taliei[2*], K Rahnma[3] and Z Vakili[4]

[1]Baharan Higher Educational Institute, Gorgan.
[2]Department of Plant Production, Gonbad Kavoos University.
[3]Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
[4]Ph.D. Student, Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
.*Corresponding author: Taliey.fa@gmail.com

Received: 8 August 2018 Accepted:28 January 2019

Abstract

In this research, the effect of *Trichoderma harzianum* and *T. atroviride* against *P. lingam* was investigated in the laboratory and greenhouse conditions. Laboratory tests were followed as dual cultures and testing of the fungal volatile compounds. In the greenhouse, the antagonistic effects of the isolates were tested through treating rapeseed seeds and rapeseed above-ground parts with the spore suspension of the isolates in 10^6 spore per ml. The experiments were conducted in complete randomized design with four replications. Percent of plant mortality and disease severity were assessed. Both isolates showed antagonistic activities against the fungal phytopathogen. The two isolates *T. harzianum* and *T. atroviride* could inhibit the growth of the pathogen by 58.6 and 71.4 respectively in dual culture. In volatile compound phase, percent of growth inhibition were 15-21% and 31-39% in 120 and 240 hours after culture. In greenhouse experiments, antagonistic species could significantly ($P<0.01$) reduce disease severity compared to control. The greenhouse results revealed that in the seed treatment experiment, *Trichoderma* isolates decreased the rapeseed blackleg to 42.5 and 47.5%, respectively after two weeks. Treating the above-ground parts with isolates *T. harzianum* and *T. atroviride* were significantly decreased the disease rate to 63.13 and 78.79%, respectively. So both *Trichoderma* species can biologically inhibit canola black leg, but *T. atroviride* was for the first time more effective than another one.

Keywords: Antagonists, Canola, *Plenodomus lingam, Trichoderma harzianum* ،*Trichoderma atroviride*