دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۵، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (ص ۱۵۰-۱۳۹)

شناسایی گروه‌های آناستوموزی ریزوکتونیای سیب‌زمینی در استان‌های همدان و کردستان و بررسی امکان کنترل بیولوژیکی آنها با استفاده از گونه‌های تریکودرما

روشن محمدی[1] و دوستمراد ظفری[2*]
۱. دانش‌آموختهٔ کارشناسی ارشد، بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه زابل
۲. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه بوعلی سینا همدان
(تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۱۶ - تاریخ تصویب: ۹۳/۵/۱۷)

چکیده

در طی مطالعه دربارهٔ بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی در سال ۱۳۸۵، از مزارع و انبارهای سیب‌زمینی استان‌های همدان و کردستان، پنجاه جدایه با مشخصات قارچ *Rhizoctonia solani* از ساقه و ریشه و هشت جدایه از سختینه‌های موجود در سطح غده‌ها جداسازی شد. بعد از رنگ‌آمیزی هسته و بررسی‌های فیزیولوژیکی، تمام جدایه‌های تحت مطالعه با عنوان گونهٔ *R. solani* شناسایی شدند. برای تعیین گروه‌های آناستوموزی جدایه‌ها، عمل آناستوموز با جدایه‌های استاندارد انجام گرفت و در مجموع ۵۶ جدایه به‌عنوان گروه آناستوموزی ۳ و یک جدایه به‌عنوان گروه آناستوموزی ۴ شناسایی شد و یک جدایه با هیچ‌کدام از گروه‌های آناستوموزی موجود در این مطالعه آناستوموز نداد. آزمایش بیماری‌زایی ۲۵ جدایه، آنها را در گروه بیماری‌زا قرار داد. توانایی بیوکنترلی چهار گونه از جنس تریکودرما شامل *Trichoderma brevicompactum*، *T. koningiopsis*، *T. andinensis* و *T. virens* روی دو جدایه از بیمارگر (۶ و ۱۶) که در آزمایش‌های بیماری‌زایی، شدیدترین بیماری‌زایی را داشتند، در شرایط آزمایشگاه مطالعه شد. نتایج نشان داد که به جز گونهٔ *T. andinensis*، سایر گونه‌های تریکودرما بعد از متوقف کردن رشد بیمارگر شروع به پیشروی، استقرار و اسپورزایی روی پرگنهٔ آن کردند و ضمن پیچش به اطراف ریسه‌ها سبب تخریب آنها شدند. تأثیر متابولیت‌های فرّار تمام گونه‌های تریکودرما در کاهش رشد جدایه‌های ریزوکتونیا در مقایسه با تیمار شاهد معنادار بود و دراین میان گونه‌های *T. virens*، *T. koningiopsis* و *T. brevicompactum* به‌ترتیب دارای بیشترین تأثیر بودند. در بررسی تأثیر متابولیت‌های غیرفرّار نیز گونهٔ *T. brevicompactum* رشد جدایه‌های ریزوکتونیا را به‌طور کامل متوقف کرد.

واژه‌های کلیدی: کنترل بیولوژیک، *Rhizoctonia solani*، *Trichoderma* spp.

مقدمه

بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* Kühn یکی از بیماری‌های مهم سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) در تمامی مناطق تولید سیب‌زمینی جهان است (Carling *et al.*, 1989). این قارچ در اوایل فصل رشد سبب ایجاد شانکر روی ساقه و استولون و در انتهای فصل منجر به تشکیل توده‌های سیاه (سختینه‌ها) روی غده‌های دختری می‌شود. علاوه بر این *R. solani* موجب کاهش قدرت رشد گیاه و ترک خوردن یا بدشکل شدن غده‌ها می‌شود. عامل این بیماری غده‌زاد و خاک‌زاد است (Stevenson, *et al.*, 2004). در حال حاضر ۱۳ گروه آناستوموزی در منابع تشریح شده که شامل AG-1، AG-2، AG-3، AG-4، AG-5، AG-6، AG-7، AG-8، AG-9، AG-10، AG-11، AG-12 و AG-BI است. علاوه بر این AG-1، AG-2، AG-3، AG-4، AG-6، AG-8 و AG-9 نیز زیرگروه‌هایی دارند (Carling *et al.*, 2002). بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی، اغلب ناشی از *R. solani* AG-3 است، اما گروه‌های آناستوموزی دیگری از قبیل AG-1-1، AG-2-2، AG-4 و AG-5 نیز می‌توانند ساقه و

تلفن: ۰۹۱۸۳۱۳۷۲۸۵
E-mail: zafari_d@yahoo.com

غده‌های سیب‌زمینی را آلوده کنند (Demirci *et al.*, 2009). کنترل بیولوژیکی قارچ ریزوکتونیا توسط تعدادی از قارچ‌ها از جمله گونه‌های تریکودرما، ریزوکتونیاهای دوهسته‌ای و باکتری‌ها گزارش شده است. علاوه بر این آمیب‌های قارچ‌خوار و نماتدها (از قبیل *Aphelenchus avenae* Bastian و *Aphelenchoides composticola* Franklin) و بندپایان ریز برای کنترل بیماری‌های ناشی از *R. solani* و سایر بیمارگرهای خاک‌زاد، توانایی زیادی دارند (Lootsma & Scholte, 1997). قارچ‌های متعلق به جنس تریکودرما (*Trichoderma* spp.) گسترش جهانی دارند و به‌آسانی از خاک، چوب‌های پوسیده و سایر اَشکال مواد آلی گیاهی جداسازی شده‌اند. رشد سریع در محیط کشت و تولید تعداد زیادی اسپور از مشخصات این جنس است. توانایی گونه‌های تریکودرما به‌عنوان عامل بیوکنترل بیمارگرهای گیاهی ابتدا در دهۀ ۱۹۳۰ شناسایی شد (Weindling, 1932). سازوکارهای معمول بیوکنترل گونه‌های تریکودرما شامل هیپرپارازیتیسم، آنتی‌بیوز و رقابت برای جا و غذا است. برخی از این توانایی‌ها با تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده از قبیل کیتیناز یا گلوکاناز در ارتباط است (Carsolio *et al.*, 1999). نقش این آنزیم‌ها شکستن پلی‌ساکاریدهای کیتین و β گلوکان است که عامل استحکام دیوارۀ سلولی قارچ‌ها هستند. علاوه بر موارد ذکرشده، برخی جدایه‌های تریکودرما قادرند از طریق تحریک واکنش‌های دفاعی در گیاه و محرک‌های جوانه‌زنی، خسارت بیمارگرهای گیاهی را کاهش دهند (Howell, 2003). این در حالی است که آزمایش‌های in vitro روش مفیدی برای شناسایی توانایی بیوکنترلی گونه‌های تریکودرما است (Hermosa *et al.*, 2000). در برخی از سیستم‌های بیماری‌زای گیاهی، کاربرد مواد شیمیایی نمی‌تواند به‌تنهایی به کنترل قابل قبول بیماری منتهی شود، بنابراین استفاده از روش‌های کنترلی مختلف برای تداوم تولید محصولات کشاورزی، امنیت غذایی و حفاظت محیط زیست ضروری به‌نظر می‌رسد. توانایی بیوکنترلی گونه‌های مختلف تریکودرما در کنترل بیمارگرهای گیاهی در ایران توسط محققان مختلف در سطح آزمایشگاه، گلخانه و مزرعه بررسی شده است (Peyghami, 2001; Soltani *et al.*, 2006; Zafari *et al.*, 2008). اما ازآنجا که قابلیت بیوکنترلی گونه‌های *T. brevicompactum*، *T. koningiopsis*، *T. virens* و *T. andinensis* روی بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی تا کنون در ایران ارزیابی نشده، در این تحقیق ضمن شناسایی گروه‌های آناستوموزی قارچ *R. solani* مرتبط با گیاه و غده‌های سیب‌زمینی، واکنش گونه‌های یادشدۀ تریکودرما با جدایه‌های قارچ *R. solani* بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

تهیۀ جدایه‌های بیمارگر

برای تهیۀ جدایه‌های بیمارگر قارچ *R. solani*، در سال زراعی ۱۳۸۵ از مزارع و انبارهای سیب‌زمینی استان‌های همدان و کردستان که نشانه‌های بیماری را بروز می‌دادند نمونه‌برداری شد (جدول ۱). نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل شده و براساس روش تشریح‌شده توسط Carling & Sumner (1993) قارچ از بافت‌های آلوده جداسازی شد. خالص‌سازی جدایه‌ها براساس روش نوک هیف انجام گرفت. شناسایی گونه‌ها در سطح گونه براساس مشخصات ارائه‌شده توسط Sneh *et al.*, (1991) صورت پذیرفت.

بررسی وضعیت هسته و شناسایی گروه‌های آناستوموزی

برای تعیین وضعیت هسته و همچنین گروه‌های آناستوموزی جدایه‌های به‌دست‌آمده، از گروه‌های آناستوموزی استاندارد در دسترس، شامل AG-1-IB، AG-2-2-B، AG-3، AG-4، AG-5، AG-6، AG-8، AG-9، AG-10، AG-11 و AG-13 استفاده شد. ازآنجا که گروه آناستوموزی ۳ بارها در مورد گیاه و غده‌های سیب‌زمینی گزارش شده است، ابتدا تمام جدایه‌های به‌دست‌آمده براساس تکنیک اسلاید تمیز، تشریح‌شده توسط Kronland & Stanghellini (1988)، با گروه آناستوموزی استاندارد ۳ واکنش داده شدند و در نهایت جدایه‌هایی که قادر به آناستوموز با AG-3 نبودند با سایر گروه‌های آناستوموزی استاندارد جفت شدند. همزمان با رنگ‌آمیزی محل تقابل پرگنه‌های مجهول و استاندارد با استفاده از رنگ سافرانین اُ (Safranin O)، تعداد هسته‌های موجود در سلول‌های جوان جدایه‌های مجهول شمارش شد.

تهیهٔ جدایه‌های *Trichoderma* spp.

از بین گونه‌های در دسترس تریکودرما سه گونه به‌نسبت جدید برای میکوفلور ایران شامل *T. brevicompactum*، *T. koningiopsis* و *T. andinensis* و گونهٔ مؤثر در کنترل بیولوژیک *T. virens* از گروه گیاه‌پزشکی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه بوعلی سینای همدان تهیه شد.

جدول ۱. مشخصات جدایه‌های جمع‌آوری‌شده از اندام‌های سیب‌زمینی آلوده به ریزوکتونیا

شمارهٔ جدایه	اندام	محل	تاریخ	شمارهٔ جدایه	اندام	محل	تاریخ
۱	سختینه روی غده	انبار بهار	فروردین ۸۵	۳۱	ساقه و ریشه	صالح‌آباد –بهار	اردیبهشت ۸۵
۲	سختینه روی غده	انبار بهار	فروردین ۸۵	۳۲	ساقه و ریشه	صالح‌آباد –بهار	اردیبهشت ۸۵
۳	سختینه روی غده	انبار بهار	فروردین ۸۵	۳۳	ساقه و ریشه	لالجین –بهار	اردیبهشت ۸۵
۴	سختینه روی غده	انبار قروه*	فروردین ۸۵	۳۴	ساقه و ریشه	لالجین- بهار	اردیبهشت ۸۵
۵	سختینه روی غده	انبار بهار	فروردین ۸۵	۳۵	ساقه و ریشه	قروه –همدان*	خرداد ۸۵
۶	سختینه روی غده	انبار قهاوند	فروردین ۸۵	۳۶	ساقه و ریشه	قروه –همدان*	خرداد ۸۵
۷	سختینه روی غده	انبار رزن	فروردین ۸۵	۳۷	ساقه و ریشه	قروه –همدان*	خرداد ۸۵
۸	سختینه روی غده	انبار قهاوند	فروردین ۸۵	۳۸	ساقه و ریشه	قروه –همدان*	خرداد ۸۵
۹	ساقه و ریشه	همدان –بهار	اردیبهشت ۸۵	۳۹	ساقه و ریشه	قروه –همدان*	خرداد ۸۵
۱۰	ساقه و ریشه	همدان –بهار	اردیبهشت ۸۵	۴۰	ساقه و ریشه	نهاوند–دهقان آباد	خرداد ۸۵
۱۱	ساقه و ریشه	بهار –بیجار	اردیبهشت ۸۵	۴۱	ساقه و ریشه	نهاوند–دهقان آباد	خرداد ۸۵
۱۲	ساقه و ریشه	همدان –بهار	اردیبهشت ۸۵	۴۲	ساقه و ریشه	دهگلان –قروه*	تیر ۸۵
۱۳	ساقه و ریشه	بهار - یکن آباد	اردیبهشت ۸۵	۴۳	ساقه و ریشه	دهگلان –قروه*	تیر ۸۵
۱۴	ساقه و ریشه	بهار - یکن آباد	اردیبهشت ۸۵	۴۴	ساقه و ریشه	دهگلان –قروه*	تیر ۸۵
۱۵	ساقه و ریشه	بهار - یکن آباد	اردیبهشت ۸۵	۴۵	ساقه و ریشه	دهگلان –قروه*	تیر ۸۵
۱۶	ساقه و ریشه	بهار - یکن آباد	اردیبهشت ۸۵	۴۶	ساقه و ریشه	دهگلان –قروه*	تیر ۸۵
۱۷	ساقه و ریشه	بهار - یکن آباد	اردیبهشت ۸۵	۴۷	ساقه و ریشه	دهگلان –قروه*	تیر ۸۵
۱۸	ساقه و ریشه	بهار - یکن آباد	اردیبهشت ۸۵	۴۸	ساقه و ریشه	دهگلان –قروه*	تیر ۸۵
۲۰	ساقه و ریشه	بهار –بیجار	اردیبهشت ۸۵	۴۹	ساقه و ریشه	دهگلان –قروه*	تیر ۸۵
۲۱	ساقه و ریشه	بهار –بیجار	اردیبهشت ۸۵	۵۰	ساقه و ریشه	قروه –همدان*	تیر ۸۵
۲۲	ساقه و ریشه	بهار –بیجار	اردیبهشت ۸۵	۵۱	ساقه و ریشه	قروه –همدان*	تیر ۸۵
۲۳	ساقه و ریشه	بهار –بیجار	اردیبهشت ۸۵	۵۲	ساقه و ریشه	قروه –همدان*	تیر ۸۵
۲۴	ساقه و ریشه	بهار –بیجار	اردیبهشت ۸۵	۵۳	ساقه و ریشه	اسدآباد-چهاردولی	تیر ۸۵
۲۵	ساقه و ریشه	لالجین –یکن یجه	اردیبهشت ۸۵	۵۴	ساقه و ریشه	کبودرآهنگ	مرداد ۸۵
۲۶	ساقه و ریشه	لالجین –یکن یجه	اردیبهشت ۸۵	۵۵	ساقه و ریشه	کبودرآهنگ-کیتو	مرداد ۸۵
۲۷	ساقه و ریشه	لالجین–یکن یجه	اردیبهشت ۸۵	۵۶	ساقه و ریشه	کبودرآهنگ-کیتو	مرداد ۸۵
۲۸	ساقه و ریشه	لالجین–یکن یجه	اردیبهشت ۸۵	۵۷	ساقه و ریشه	کبودرآهنگ-کیتو	مرداد ۸۵
۲۹	ساقه و ریشه	صالح‌آباد- بهار	اردیبهشت ۸۵	۵۸	ساقه و ریشه	قروه درجزین–رزن	مرداد ۸۵
۳۰	ساقه و ریشه	صالح‌آباد–بهار	اردیبهشت ۸۵	۵۹	ساقه و ریشه	قروه درجزین-رزن	مرداد ۸۵

جدایه‌های جمع‌آوری‌شده از استان کردستان با * نشان داده شده است. سایر جدایه‌ها مربوط به استان همدان است.

مطالعهٔ بیماری‌زایی جدایه‌ها

آزمایش بیماری‌زایی جدایه‌های *R. solani* براساس روش Carling & Leiner (1986) در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام گرفت. ازآنجا که به‌دلیل محدودیت امکانات گلخانه‌ای بررسی بیماری‌زایی تمامی جدایه‌های جمع‌آوری‌شده امکان‌پذیر نبود، هشت جدایهٔ به‌دست‌آمده از غده‌های انباری و ۱۷ جدایهٔ به‌دست‌آمده از ساقه و ریشه آزمایش شدند، به‌طوری که از هر کدام از مناطق نمونه‌برداری نماینده‌ای وجود داشته باشد. بعد از گذشت ۳۵ روز، شدت بیماری‌زایی روی ساقه‌های جوان گیاهان سیب‌زمینی براساس مقیاس Carling & Leiner (1986) ارزیابی شد.

بررسی ماکروسکوپی و میکروسکوپی تعاملات بیمارگر و جدایه‌های تریکودرما

به‌منظور بررسی توانایی رقابتی جدایه‌های تریکودرما در سطح آزمایشگاه، گونه‌های تریکودرما و جدایه‌های ۶ و ۱۶ ریزوکتونیا براساس روش Morton & Stroube (1955) در سطح تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA روبه‌روی یکدیگر کشت شدند. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد و در تیمار شاهد به‌جای حلقه‌های تریکودرما از یک حلقهٔ PDA فاقد قارچ استفاده شد. تمامی تشتک‌های پتری در دمای ۱±۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند و ضمن یادداشت میزان رشد پرگنهٔ جدایه‌های ریزوکتونیا به‌صورت روزانه، درصد بازداری از رشد شعاعی آنها بعد از گذشت شش روز براساس فرمول زیر محاسبه شد.

۱۰۰ × (میزان رشد بیمارگر در تشتک تیمارشده – میزان رشد بیمارگر در تشتک شاهد)

میزان رشد بیمارگر در تشتک شاهد

برای مشاهدهٔ میکروسکوپی واکنش بین جدایه‌های تریکودرما و بیمارگر، ابتدا یک لایهٔ نازک از آب آگار دو درصد در سطح اسلایدهای شیشه‌ای سترون ریخته شد و اسلایدها در داخل تشتک‌های پتری سترون حاوی کاغذ صافی مرطوب قرار داده شدند. با توجه به رشد سریع پرگنه‌های تریکودرما، در ابتدا یک حلقهٔ پنج میلی‌متری از حاشیهٔ کشت‌های پنج‌روزهٔ جدایه‌های ریزوکتونیا در یک سمت اسلایدهای شیشه‌ای قرار داده شد و بعد از گذشت ۴۸ ساعت در دمای ۱±۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد، یک حلقهٔ پنج میلی‌متری از حاشیهٔ پرگنه‌های پنج‌روزهٔ گونه‌های تریکودرما نیز در فاصلهٔ سه سانتی‌متری حلقه‌های ریزوکتونیا قرار داده شد و مجدداً در دمای ۱±۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از گذشت ۴-۳ روز و تلاقی کامل پرگنه‌های آنتاگونیست با بیمارگر، حلقه‌های حاوی قارچ از روی اسلایدها حذف شدند و ناحیهٔ تقابل آنها با رنگ سافرانین اُ رنگ آمیزی و با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد.

تأثیر متابولیت‌های فرّار

از روش تشریح‌شده توسط Dennis & Webster (1971b)، برای بررسی تأثیر متابولیت‌های فرّار گونه‌های تریکودرما بر رشد پرگنه جدایه‌های ریزوکتونیا استفاده شد. در ابتدا یک حلقهٔ پنج میلی‌متری از حاشیهٔ کشت‌های هفت‌روزهٔ گونه‌های تریکودرما در وسط تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و بعد از دو روز نگهداری در دمای ۱±۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد، درِ تشتک‌های مذکور با قسمت زیرین تشتک‌های حاوی PDA تلقیح‌شده با حلقه‌های پنج میلی‌متری از حاشیهٔ پرگنه‌های پنج‌روزهٔ جدایه‌های ریزوکتونیا جابه‌جا شد. در تیمار شاهد به‌جای حلقهٔ تریکودرما از یک حلقهٔ PDA فاقد قارچ استفاده شد. به‌منظور نگه‌داشتن قسمت زیرین تشتک‌های پتری روی هم و جلوگیری از خروج متابولیت‌های فرّار، محل تماس لبهٔ تشتک‌های پتری با استفاده از نوار پارافیلم کاملاً مسدود شد. رشد شعاعی پرگنه‌ها بعد از گذشت سه روز یادداشت شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام گرفت. همچنین درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های ریزوکتونیا در مقایسه با تیمار شاهد بعد از گذشت شش روز براساس فرمول ذکرشده محاسبه شد.

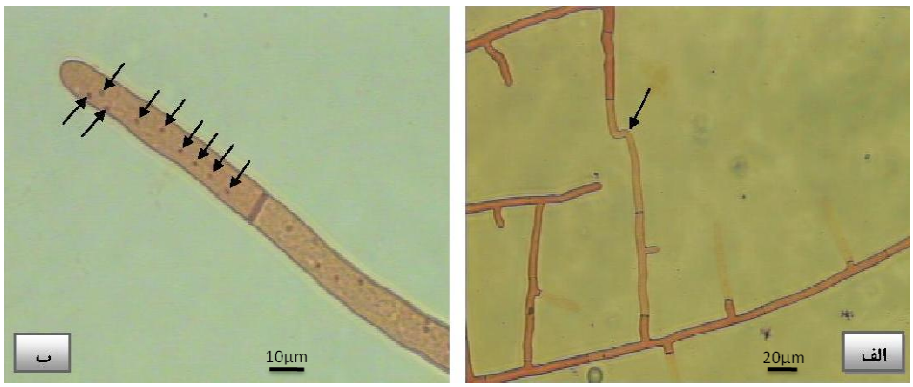
تأثیر متابولیت‌های غیرفرّار

ابتدا از حاشیهٔ پرگنه‌های پنج‌روزه گونه‌های تریکودرمای رشدیافته روی محیط کشت PDA به‌ازای هر گونه، چهار حلقهٔ پنج میلی‌متری برداشته شد و به فلاسک‌های حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط مایع سترون‌شده MYP (Malt Yeast Pepton) منتقل شد. فلاسک‌ها به‌مدت ۱۵ روز در داخل دستگاه شیکر انکوباتور در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد در تاریکی، با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه، قرار داده شدند. بعد از گذشت این مدت، محیط مایع از فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده شد. ۱۵ میلی‌لیتر از این عصاره به ارلن‌های حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA با ۲۵ درصد آگار اضافی در دمای ۴۵ درجهٔ

سانتی‌گراد افزوده شد. در تیمار شاهد مقدار ۱۵ میلی-لیتر آب مقطر سترون به ارلن‌های حاوی محیط کشت PDA افزوده شد. در هر تشتک پتری مقدار ۲۰ میلی-لیتر از محیط مذکور ریخته شد و بعد از گذشت یک ساعت، یک حلقهٔ پنج میلی‌متری از حاشیهٔ کشت‌های پنج‌روزهٔ جدایه‌های ریزوکتونیا در حاشیهٔ آنها قرار داده شد و تشتک‌ها در دمای ۱±۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند (Dennis & Webster, 1971a; Kucuk & Kivanc, 2003; Kucuk & Kivanc, 2004). رشد شعاعی پرگنه‌های بیمارگر بعد از گذشت سه روز یادداشت شد. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و با سه تکرار انجام گرفت. همچنین درصد بازدارندگی جدایه‌های ریزوکتونیا در مقایسه با تیمار شاهد با استفاده از فرمول ذکرشده در بالا محاسبه شد.

نتایج و بحث

در این بررسی هشت جدایه از سختینه‌های موجود در سطح غده‌های انبارشدهٔ سیب‌زمینی و ۵۰ جدایه از ساقه‌های آلودهٔ سیب‌زمینی که نشانه‌های بیماری *R. solani* را بروز می‌دادند، جدا و خالص‌سازی شد. براساس مشخصات تشریح‌شده توسط Sneh *et al.* (1991) تمامی جدایه‌های جمع‌آوری‌شده چندهسته‌ای و به‌عنوان *R. solani* شناسایی شدند (شکل ۱). از میان این جدایه‌ها، ۵۶ جدایه متعلق به AG-3 و یک جدایه متعلق به AG-4 بود و یک جدایه با هیچ کدام از گروه‌های آناستوموزی استاندارد موجود در این آزمایش واکنش نداد. با توجه به اینکه بیش از ۹۶ درصد جدایه‌ها به گروه آناستوموزی سه تعلق داشتند، نتایج به‌دست‌آمده با یافته‌های Campion *et al.*, (2003) مبنی بر ارتباط *R. solani* AG-3 با سیب‌زمینی در مناطق خنک، به‌دلیل مقاومت بیشتر به دماهای کم نسبت به سایر گروه‌های آناستوموزی، مطابقت دارد. بنابراین به‌نظر می‌رسد جدایهٔ AG-4 که از سختینه‌های سطح غده‌ها جداسازی شده بود، در انتهای فصل و همزمان با افزایش دمای خاک فعال شده و روی غده‌های دختری تولید سختینه کرده است.

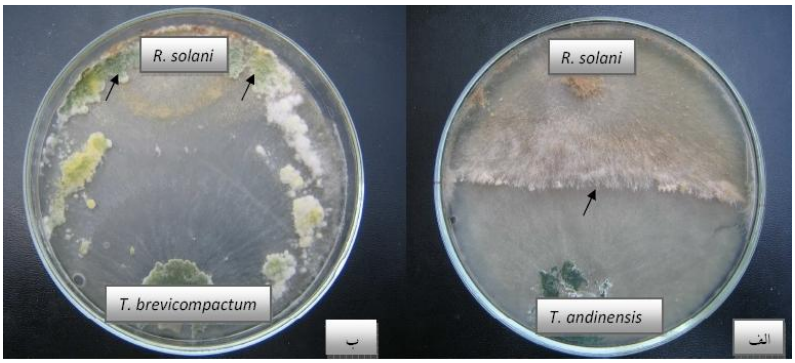


شکل ۱- الف) وقوع آناستوموز کامل بین ریسهٔ پرگنه‌های مجهول و محک (پیکان)؛ ب) هسته‌های موجود در یک سلول انتهایی از ریسه *R. solani* AG-3 (محل پیکان‌ها).

در آزمایش بیماری‌زایی، هشت جدایهٔ به‌دست‌آمده از سختینه‌های سطح غده‌ها بعد از گذشت ۳۵ روز روی بوته‌های سیب‌زمینی کشت‌شده در گلدان‌ها بیماری ایجاد کردند. درحالی‌که در گلدان‌های تلقیح‌شده با جدایهٔ ۲۵ و ۳۱، که از شانکرهای روی ساقه‌ها جداسازی شده بودند، نشانه‌های شانکر روی جوانه و ساقه‌ها مشاهده نشد. جدایهٔ متعلق به AG-4 علائم بیماری ضعیفی ایجاد کرد و جدایهٔ ناشناخته، هیچ علامتی نشان نداد. شدت بیماری براساس مقیاس تشریح‌شده توسط Carling & Leiner (1986) انجام گرفت. اختلاف میان جدایه‌های *R. solani* AG-3 از لحاظ شدت بیماری‌زایی روی جوانه‌های سیب‌زمینی در سطح ۱ درصد معنادار بود. Abe & Tsuboki (1978) در آزمایش‌های خود نشان داده‌اند که جدایه‌های *R. solani* AG-3 از به‌شدت بیماری‌زا تا غیربیماری‌زا متغیرند. مقایسهٔ میانگین‌ها نشان داد که جدایه‌های ۶ و ۱۶ که به‌ترتیب از سختینه-

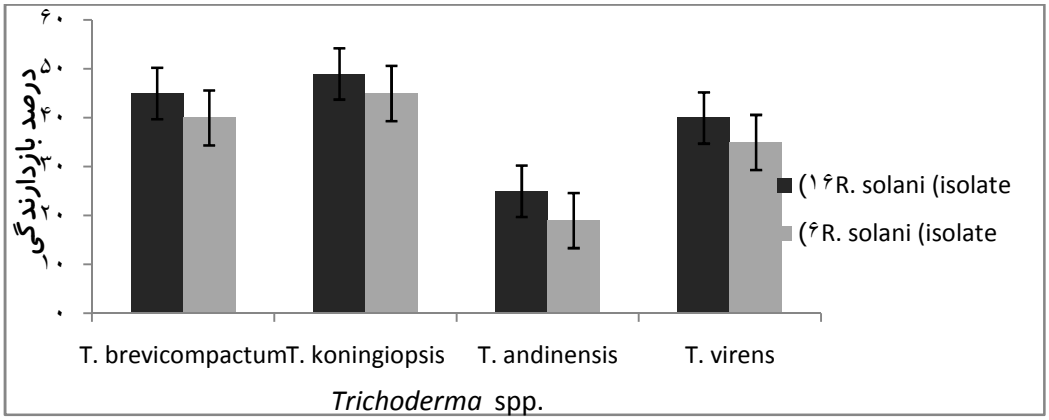
های سطح غده‌های بذری و ساقه‌های آلودهٔ سیب‌زمینی جدا شده بودند، دارای بیشترین شدت بیماری‌زایی بودند. نتایج نشان می‌دهد که *R. solani* AG-3 به‌دلیل فراوانی و شدت بیماری‌زایی، عامل غالب بیماری ریزوکتونیایی سیب‌زمینی در استان‌های همدان و کردستان است که با نتایج تحقیقات صورت‌گرفته در سایر مناطق کشت سیب‌زمینی جهان مطابقت دارد (Carling & Leiner, 1986; Rauf *et al.*, 2007).

در کشت متقابل گونه‌های تریکودرما با دو جدایهٔ انتخاب‌شدهٔ بیمارگر در سطح ماکروسکوپی، بعد از گذشت شش روز به جز *T. andinensis*، سایر گونه‌ها قادر به کلنیزاسیون پرگنه‌های ریزوکتونیا و اسپورزایی روی آنها بودند، اما در کشت متقابل *T. andinensis* با هر دو جدایهٔ قارچ ریزوکتونیا، آنتاگونیست تنها از ادامهٔ رشد پرگنه‌های بیمارگر جلوگیری کرد و قادر به پیشروی و پوشاندن پرگنه‌های بیمارگر نبود (شکل ۲). نتایج مربوط به درصد بازدارندگی از رشد جدایه‌های ریزوکتونیا توسط گونه‌های تریکودرما نشان داد که گونه‌های *T. koningiopsis*، *T. brevicompactum*، *T. virens* و *T. andinensis* روی هر دو جدایهٔ بیمارگر به‌ترتیب دارای بیشترین تأثیر بودند (شکل ۳). بنابراین با توجه به سازوکارهای بیوکنترلی پیشنهادشده برای گونه‌های تریکودرما و ناتوانی *T. andinensis* در کلنیزه کردن پرگنهٔ جدایه‌های بیمارگر به‌نظر می‌رسد *T. andinensis* از لحاظ توانایی رقابت و قدرت تصرف فضا نسبت به سایر گونه‌های آنتاگونیست آزمایش‌شده در سطح پایین‌تری قرار داشته باشد. میزان حساسیت جدایهٔ ۱۶ (جدایهٔ به‌دست‌آمده از ساقه‌های آلوده) نسبت به جدایهٔ ۶ (جدایهٔ به‌دست‌آمده از سختینه‌های سطح غده‌ها) در برابر گونه‌های تریکودرما بیشتر بود. به‌طوری که در تقابلات بین جدایهٔ ۱۶ با گونه‌های تریکودرما، سطح بیشتری از پرگنه بیمارگر توسط آنتاگونیست‌ها پوشیده شد. این موضوع می‌تواند بیانگر تفاوت‌های ژنتیکی بین جدایه‌های مختلف *R. solani* AG-3 باشد، همان طور که در مطالعات Farrokhi-Nijad *et al.*, (2007) نیز به آن اشاره شده است.

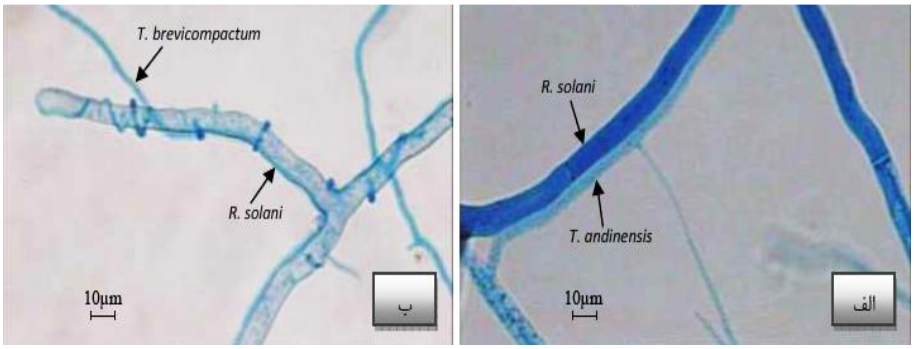


شکل ۲- الف)، ناتوانی *T. andinensis* در کلنیزه کردن بیمارگر در محل تقابل آنتاگونیست با جدایهٔ بیمارگر (پیکان). ب)، کلنیزه شدن بیمارگر توسط *T. brevicompactum* و اسپورزایی روی پرگنهٔ بیمارگر (محل پیکان‌ها).

بررسی‌های میکروسکوپی ناحیهٔ تلاقی جدایه‌های تریکودرما و بیمارگر نشان داد که میسلیوم گونه‌های تریکودرما به جز *T. andinensis*، قادر به پیشروی و احاطهٔ بیمارگر بودند و توانستند به دور ریسه‌های بیمارگر بپیچند و بعد از نفوذ، آنها را کاملاً تخریب کنند (شکل ۴، ب). ریسه‌های *T. andinensis* تنها با ریسه‌های بیمارگر تماس برقرار کردند و قادر به نفوذ و پارازیته کردن ریسه‌های بیمارگر نبودند (شکل ۴، الف). با توجه به تحقیقات صورت‌گرفته گونه‌های تریکودرما با پیچیدن به دور ریسه‌های میزبان با آن ارتباط برقرار کرده و از طریق اندام‌های شبه‌چنگکی (Hook Like) و ترشح آنزیم‌های لیز کنندهٔ دیوارهٔ سلولی (Cell Wall-Degrading Enzymes=CWDE)، در ریسه‌های میزبان نفوذ می‌کنند (Kubicek *et al.*, 2001).



شکل ۳. درصد بازدارندگی رشد جدایه‌های ریزوکتونیا در کشت متقابل با گونه‌های تریکودرما بعد از شش روز نگهداری در دمای ۱±۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد روی محیط PDA



شکل ۴- الف) تماس ریسهٔ *T. andinensis* با ریسهٔ ریزوکتونیا و ناتوانی در پارازیته کردن آن. ب) پیچش ریسه‌های *T. brevicompactum* به دور ریسهٔ ریزوکتونیا همراه با نفوذ و پارازیته کردن آن

ازآنجا که پیچیدن به دور ریسه‌های میزبان و رقابت برای تصرف مواد غذایی از شاخص‌های مهم در انتخاب عوامل بیوکنترل است، توانایی گونه‌های *T. koningiopsis*، *T. brevicompactum* و *T. virens* در کلنیزه کردن جدایه‌های ریزوکتونیا و پارازیته کردن آنها می‌تواند بیانگر قابلیت آنها به‌عنوان عوامل بیوکنترلی علیه قارچ *R. solani* AG-3 باشد. بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی ناحیهٔ تقابل *T. harzianum* و *R. solani* نیز نشان داده است که تمامی استرین‌های مطالعه‌شدهٔ این گونه در این بررسی قادرند در کشت متقابل، سبب بازدارندگی رشد جدایه‌های *R. solani* شوند (Almeida *et al.*, 2007). همچنین توانایی *T. koningiopsis* در پیچش به دور ریسه‌های *Macrophomina phaseolina* و تشکیل چنگک و ساختارهای شبه‌چنگکی (Hook Like) به اثبات رسیده است (Larralde-Corona *et al.*, 2008). با وجود این مطالعات Howell *et al.* (2000) برای بررسی سازوکارهای بیوکنترلی *T. virens* روی پوسیدگی ریشهٔ پنبه، ناشی از *R. solani*، نشان داده است که مایکوپارازیتیسم و تولید آنتی‌بیوتیک از عوامل اصلی بیوکنترلی نیست، بلکه کنترل بیماری به‌دلیل تحریک سیستم دفاعی گیاه از طریق تولید ترپنوئیدها (Terpenoids) است.

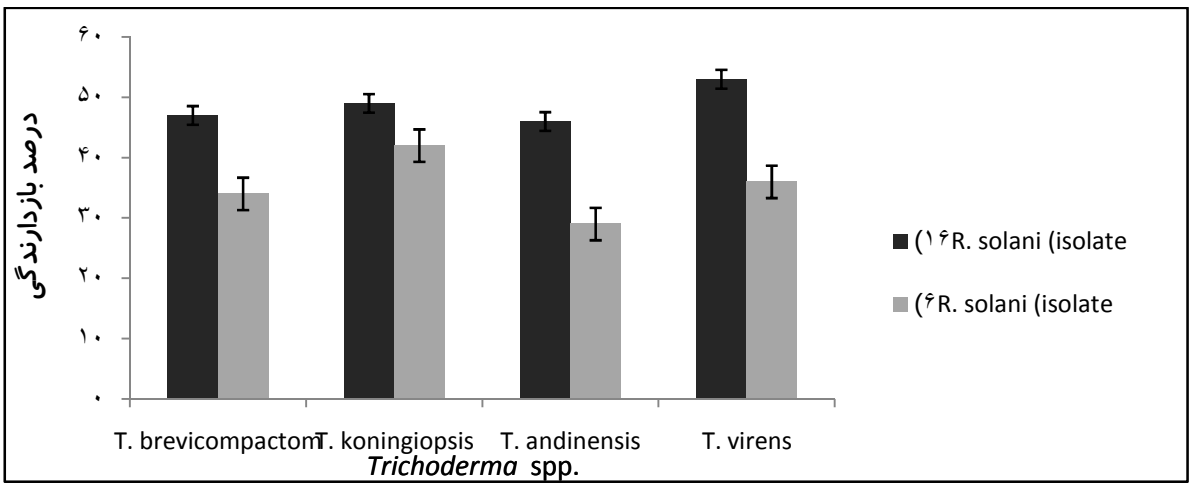
نتایج تجزیهٔ واریانس داده‌های آزمایش تأثیر متابولیت‌های فرّار نشان داد که توانایی گونه‌های تریکودرما در کاهش رشد جدایه‌های ریزوکتونیا در مقایسه با تیمار شاهد اختلاف معناداری نشان می‌دهد. مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که گونه‌های *T. virens*، *T. koningiopsis*، *T. brevicompactum* و *T. andinensis* به‌ترتیب دارای بیشترین تأثیر در کاهش رشد جدایه‌های بیمارگر بودند.

هرچند که اختلاف بین *T. virens* و*T. koningiopsis* و همچنین *brevicompactum* و*T. andinensis* معنادار نبود (جدول ۲). علاوه‌بر این مقایسهٔ میانگین رشد پرگنهٔ جدایه‌های ریزوکتونیا از لحاظ حساسیت به متابولیت-های فرّار گونه‌های تریکودرما در سطح ۵ درصد نشان داد که جدایهٔ ۱۶ نسبت به جدایهٔ ۶ از حساسیت بیشتری برخوردار است. همچنین مقایسهٔ درصد بازدارندگی گونه‌های تریکودرما بعد از شش روز روی هر کدام از جدایه‌های ریزوکتونیا نتایج متفاوتی نشان داد. در مورد جدایهٔ ۱۶ ریزوکتونیا، گونه‌های *T. virens*، *T. koningiopsis*، *T. brevicompactum* و *T. andinensis* به‌ترتیب دارای بیشترین تأثیر در کاهش رشد بیمارگر بودند در حالی که در مورد جدایهٔ ۶ ریزوکتونیا، گونه-های *T. koningiopsis*، *T. virens*، *T. brevicompactum* و *T. andinensis* به‌ترتیب دارای بیشترین تأثیر بودند (شکل ۵). هر چند که مقایسهٔ میانگین‌ها نشان می‌دهد که اختلاف بین *T. virens* و *T. koningiopsis* معنادار نیست.

جدول ۲. مقایسهٔ میانگین رشد جدایه‌های ریزوکتونیا تحت تأثیر متابولیت‌های فرّار گونه‌های تریکودرما بعد از سه روز

تیمار	مقدار رشد (mm)
شاهد	۳۸/۸۳۳۳ A
T. andinensis	۲۶/۱۶۶۷ B
T. brevicompactum	۲۵/۵ B
T. koningiopsis	۲۴/۱۶۶۷ C
T. virens	۲۳/۳۳۳۳ C

اعداد، میانگین سه تکرار هستند. میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک نیستند براساس آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد تفاوت معناداری نشان می‌دهند.



شکل ۵. درصد کاهش رشد جدایه‌های ریزوکتونیا تحت تأثیر متابولیت‌های فرّار گونه‌های مختلف تریکودرما بعد از شش روز نگهداری در دمای ۱°C±۲۶ روی محیط PDA

تولید آنزیم‌های تجزیه‌کنندهٔ دیوارهٔ سلولی از قبیل کیتینازهای خارجی (Exochitinases) و بتا ۱و۳ گلوکانازها (β-1,3- glucanases) از فاکتورهای کلیدی در فعالیت‌های مایکوپارازیتی گونه‌های تریکودرما است (Larralde-Corona *et al.*, 2008). در بررسی تأثیر متابولیت‌های غیرفرّار گونه‌های تریکودرما مشخص شد که میزان کاهش رشد جدایه‌های ریزوکتونیا تحت تأثیر متابولیت‌های غیرفرّار گونه‌های مختلف تریکودرما، نسبت به تیمار شاهد در سطح ۱ درصد معنادار است. در این آزمایش هیچ کدام از جدایه‌های بیمارگر قادر به رشد روی محیط تیمارشده با عصارهٔ *T. brevicompactum* نبودند. به‌عبارت دیگر، رشد پرگنه‌های بیمارگر روی

محیط PDA تلقیح‌شده با عصارهٔ *T. brevicompactum* به‌طور کامل متوقف شد. نتایج به‌دست‌آمده با مطالعات Degenkolb *et al.* (2006) مطابقت دارد. آنها در بررسی متابولیت‌های غیرفرّار سه استرین *T. brevicompactum* و چهار استرین دارای ارتباط نزدیک با آن (*Trichoderma* cf. *brevicompactum*) روی قارچ عامل سرخشکیدگی انگور نشان دادند که این استرین‌ها از طریق تولید آنتی‌بیوتیک‌های پپتیدی قادر به کنترل بیماری‌اند. مقایسهٔ میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که T. koningiopsis، T. andinensis و T. virens بعد از T. brevicompactum به‌ترتیب بیشترین تأثیر را در کاهش رشد جدایه‌های ریزوکتونیا داشته‌اند (جدول ۳). بررسی‌ها برای ارزیابی تأثیر T. koningiopsis روی M. phaseolina نیز نشان داده است که این گونه سطح بالایی از کیتینازهای خارجی و گلوکانازها را تولید می‌کنند که در ارتباط مستقیم با فعالیت آنتاگونیستی آن است (Larralde-Corona et al., 2008). بنابراین ازآنجا که کیتین و بتا ۱و۳ گلوکان از اجزای اصلی دیوارهٔ سلولی قارچ‌ها هستند (Lorito et al., 1994)، آنزیم‌های لیزکنندهٔ تولیدشده توسط گونه‌های مهاجم تریکودرما می‌توانند نقش مهمی در تخریب بیمارگرهای گیاهی داشته باشند. مقایسهٔ میانگین‌ها نیز در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد که جدایهٔ ۱۶ ریزوکتونیا نسبت به جدایهٔ ۶ آن در برابر متابولیت‌های غیرفرّار گونه‌های تریکودرما حساس‌تر است.

جدول ۳. مقایسهٔ میانگین رشد جدایه‌های ریزوکتونیا تحت تأثیر متابولیت‌های غیرفرّار گونه‌های تریکودرما بعد از سه روز

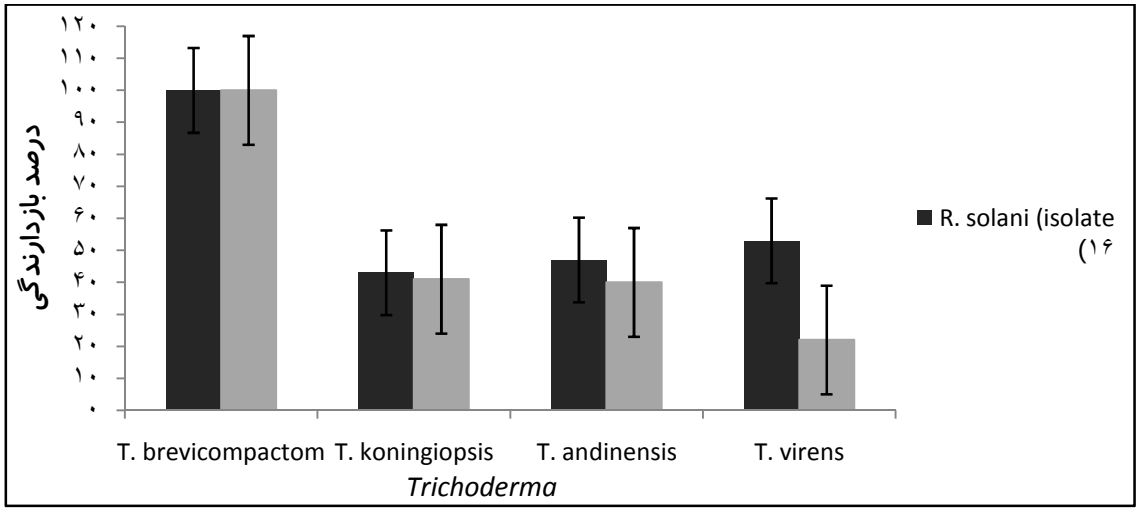
تیمار	میزان رشد
شاهد	۳۸/۳۳۳۳ A
T. virens	۲۸/۱۶۶۷ B
T. andinensis	۲۲/۶۶۶۷ C
T. koningiopsis	۲۲ C
T. brevicompactum	۰/۰۰۰۱ D

اعداد، میانگین سه تکرارند. میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک نیستند، براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معناداری نشان می‌دهند.

همچنین محاسبهٔ پتانسیل بازدارندگی گونه‌های تریکودرما پس از شش روز نشان داد که بعد از T. brevicompactum، گونه‌های T. koningiopsis، T. andinensis و T. virens به‌ترتیب بیشترین تأثیر را در کاهش رشد پرگنه‌های جدایهٔ ۶ بیمارگر داشته‌اند، درصورتی که در مورد جدایهٔ۱۶، بعد از T. brevicompactum به‌ترتیب گونه‌های T. virens، T. andinensis و T. koningiopsis بیشترین بازدارندگی را ایجاد کرده‌اند (شکل ۶).

براساس نتایج این بررسی، گونه‌های تریکودرما در سازوکارهای مختلف آنتاگونیستی با یکدیگر یکسان نیستند. نتایج یافته‌های Sanz *et al.* (2004) نیز نشان داد که حتی توانایی بیوکنترلی جدایه‌های مختلف یک گونه از قارچ *Trichoderma* روی قارچ میزبان ممکن است متغیر باشد.

هرچند که در بررسی تأثیر متابولیت‌های فرّار، *T. brevicompactum* نسبت به *T. koningiopsis* و *T. virens* دارای توانایی آنتاگونیستی ضعیف‌تری بود، قابلیت آن در متوقف کردن کامل رشد جدایه‌های ریزوکتونیا در آزمایش بررسی متابولیت‌های غیرفرّار می‌تواند بیانگر توانایی این گونهٔ تریکودرما در کنترل *R. solani* باشد. به‌عبارت دیگر به‌نظر می‌رسد این توانایی بیانگر تولید متابولیت‌های خارج‌سلولی قوی است که قادرند ریسه‌های ریزوکتونیا را در مراحل اولیهٔ رشد کنترل کنند. همچنین با اینکه *T. andinensis* قادر به کلنیزاسیون ریسه‌های بیمارگر در کشت متقابل نبود، توانایی آن در کنترل بیمارگر در بررسی متابولیت‌های غیرفرّار شایان توجه بود، به‌طوری که حتی پتانسیل بیوکنترلی آن در کاهش رشد جدایهٔ ۱۶ ریزوکتونیا نسبت به *T. koningiopsis* بیشتر بود.



شکل ۶. درصد کاهش رشد جدایه‌های ریزوکتونیا تحت تأثیر متابولیت‌های غیرفرّار گونه‌های مختلف تریکودرما بعد از شش روز نگهداری در دمای ۱±۲۶ درجهٔ سانتی‌گراد روی محیط PDA

با توجه به نتایج به‌نظر می‌رسد در گونه‌های مختلف تریکودرما، ارتباط مستقیمی بین کلنیزاسیون و تولید ترکیبات غیرفرّار وجود نداشته باشد. یافته‌های Zeilinger *et al.* (1999) در خصوص بیان ژن کیتیناز در تقابل *T. harzianum* با *R. solani* نیز نتایج به‌دست‌آمده را تأیید می‌کند. هیچ نوع همبستگی بین پیچش به اطراف سلول‌های میزبان و تولید آنزیم‌های کیتیناز و اِن استیل-بتا دی گلوکز آمینیداز (N-acetyl-beta-D-glucosaminidase) در تقابل بین *T. harzianum* و *R. solani* نیز گزارش نشده است (Almeida *et al.*, 2007).

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این بررسی نشان داد که *R. solani* AG-3 عامل اصلی شانکر ریزوکتونیایی سیب‌زمینی در مناطق تولید این محصول در استان‌های همدان و کردستان است. همچنین توانایی بیوکنترل گونه‌های تریکودرمای مذکور روی جدایه‌های *R.solani* به‌دست‌آمده از ساقه، ریشه و سختینه‌های سطح غده‌های سیب‌زمینی شایان توجه بود؛ هرچند که توانایی گونه‌های آنتاگونیست در سازوکارهای مختلف بیوکنترلی یکسان نیست و نیازمند تحقیقات گسترده‌تری است.

REFERENCES

1. Abe, H. &Tsuboki, K. (1978). Anastomosis groups of isolates of *Rhizoctoniasolani*Kühn from potatoes. *Bulletin of Hokkaido PrefectureAgricultural Experiment Station*, 40, 61-70.
2. Almeida, F.B., Cerqueira, F.M., Silva Rdo, N., Ulhoa, C.J. & Lima, A.L. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichodermaharzianum* strains against *Rhizoctoniasolani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, 29(8), 1189-1193.
3. Campion, C., Chatot, C., Perraton, B. &Andrivon, D. (2003). *Rhizoctoniasolani* isolates collected on potato crops in France. *European Journal of Plant Pathology,* 109,983-992.
4. Carling, D.E., Baird, R.E., Gitaitis, R.D., Brainard, K.A. and Kuninaga, S.K. (2002). Characterization of AG-13, a newly reported anastomosis group of *Rhizoctoniasolani*. *Phytopathology*, 92 (8), 893-899.
5. 5Carling, D.E. &Leiner, R.H. (1986). Isolation and characterization of *Rhizoctoniasolani* and bi-nucleate *R. solani*-like fungi from aerial stems and subterranean organs of potato plants. *Phytopathology*, 76, 725-729.
6. Carling, D.E., Leiner, R.H. &Westphale, P.C. (1989). Symptoms, sings and yield reduction associated with *Rhizoctonia* disease of potato infected by tuber-borne inoculum of *Rhizoctoniasolani* AG-3. *American Potato Journal*, 66, 693-701.
7. Carling, D.E. & Sumner, D.R. (1993). *Rhizoctonia*. In: L.L. Singleton, J.D. Mihail and C.M. Rush (Eds.) *Methods For Research On SoilbornePhytopathogenic Fungi* (pp. 157-165). American Phytopatological Society: St. Paul, MN. USA.

8. Carsolio, C., Bennhamou, N., Haran, S. Cortes, C., Gutierrez, A., Chet, I. &Estrella, A.H. (1999). Role of the *Trichodermaharzianum*endochitinase gene, *ech42*, in mycoparasitism. *Applied and Environmental Microbiology,* 65 (3), 929-935.
9. Chand, T. & Logan, C. (1983). Cultural and pathogenic variation in potato isolates of *Rhizoctoniasolani* in Northern Ireland. *Transactions of the British Mycological Society*, 81, 585-589.
10. Degenkolb, T., Gräfenhan, T., Nirenberg, H.I., Gams, W. &Brückner, H. (2006). *Trichodermabrevicompactum* complex: Rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7047-7061.
11. Demirci, E., Eken, C. &Dane, E. (2009). Biological control of *Rhizoctoniasolani* on potato by *Verticilliumbiguttatum*. *African journal of Biotechnology,* 8 (11), 2503-2507.
12. Dennis, C. & Webster, J. (1971a). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* III, hyphae interaction. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 363-369.
13. Dennis, C. & Webster, J. (1971b). Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II, production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57, 41-47.
14. Farrokhi-Nijad, R., Cromey, M.G., & Moosawi-Jorf, S.A. (2007). Determination of the anastomosis grouping, and virulence of *Rhizoctonia*spp. associated with potato tubers grown in Lincoln, New Zealand. *Pakistan Journal Biological Sciences*, 10(21), 3786-3793.
15. Hermosa, M.R., Grondona, I., Iturriaga, E.A., Diaz-Minguez, J.M., Castro, C., Monte, E. & Garcia-Acha, I. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1890-1898.
16. Howell, C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, 87(1), 4-10.
17. Howell, C.R., Hanson, L.E., Stipanovic, R.D. &Puckhaber, L.S. (2000). Induction of Terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctoniasolani* by seed treatment with *Trichodermavirens*. *Phytopathology*, 90(3), 248-252.
18. Kronland, W.C. &Stanghellini, M.E. (1988). Clean slide technique for the observation of anastomosis and nuclear condition of *Rhizoctoniasolani*. *Phytopathology*, 78, 820-822.
19. Kubicek, C.P., Mach, R.L., Peterbauer, C.K. &Lorito, M. (2001). *Trichoderma*: from genes to biocontrol. *Plant Pathology*, 83, 11-24.
20. Kucuk, C. &Kivanc, M. (2003). Isolation of *Trichoderma*spp. and determination of their antifungal, biochemical and physiological features. *Turkish Journal of Biology*, 27, 247-253.
21. Kucuk, C. &Kivanc, M. (2004). In *vitro* antifungal activity of strains of *Trichodermaharzianum*. *Turkish Journal of Biology*, 28, 111-115.
22. Larralde-Corona, C.P., Santigao-Mena, M.R., Sifuentes-Rincon, A.M., Rodriguez-Luna, I.C., Rodriguez-Perez, M.A., Shirai, K. & Narvaez-Zapata, J.A. (2008). Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophominaphaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 80, 167-177.
23. Lootsma, M. &Scholte, K. (1997). Effect of soil moisture on the suppression of *Rhizoctonia* stem canker on potato by the nematode *Aphelenchusavenae* and the springtail *Folsomiafimetaria*. *PlantPathology*, 46, 209-215.
24. Lorito, M., Hayes, C.K., Di Pietro, A., Woo, S.L. & Harman, G.E. (1994). Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3-b-glucosidase and an N-acetyl-b-glucosaminidase from *Trichodermaharzianum*. *Phytopathology*, 84, 398-405.
25. Meyer, R.W. &Parmeter, J.R. (1968). Changes in chemical tolerance associated with heterokaryosis in *Thanatephoruscucumeris*. *Phytopathology*, 58, 472-475.
26. Morton, D.T. &Stroube, N.H. (1955). Antagonistic and stimulatory effects of microorganism upon *Sclerotiumrolfsii*. *Phytopathology*, 45, 419-420
27. Peyghami, E. (2001). Antagonistic effects of several isolates of *Trichoderma* on fungi causing onion root rot, East Azarbaidjan Province. *Iranian Journal of Agriculture Sciences*, 32(3), 747-755. (In Farsi).
28. Rauf, C.A., Ahmad, I. & Ashraf, M. (2007). Anastomosis groups of *Rhizoctoniasolani*Kühn isolates from potato in Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 39(4), 1335-1340.
29. Sanz, L., Montero, M., Grondona, I., Vizcaíno, J.A., Llobell, A., Hermosa, R. & Monte, E. (2004). Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma*biocontrol strains show correlation with rDNA taxonomic species. *Current Genetics*, 46, 277–286.
30. Sneh, B., Burppe, L. &Ogoshi, A. (1991). *Identification of Rhizoctonia species*. The American Phytopathological society. St. Paul, MN.
31. Soltani, H., Zafari, D. &Rohani, H. (2006). A study on biological control of the crown, root and tuber fungal diseases of potato by *Trichodermaharzianum* under *in-vivo* and field condition in Hamadan. *Agricultural Research, Water, Soil and plant in Agriculture*. 5 (3), 13-24. (In Farsi).

32. Stevenson, W.R., Loria, R., Franc, D.G. &Weingartner, D.P. (2004). *Compendium of Potato Diseases*. (2nd ed.) American Phytopathological society. St. Paul, MN.
33. Weindling, R. (1932). *Trichodermalignorum* as a parasite of other soil fungi. *Phytopathology*, 22, 837-845.
34. Zafari, D., Koushki, M.M. &Bazgir, E. (2008). Biocontrol evaluation of wheat take-all disease by *Trichoderma* screened isolates. *African Journal of Biotechnology*, 7(20),3653-3659.
35. Zeilinger, S., Galhaup, C., Payer, K., Woo, S.L., Mach, R.L., Fekete, C., Lorito, M. &Kubicek C. P. (1999). Chitinase gene expression during mycoparasitic interaction of *Trichodermaharzianum* with its host. *Fungal Genetic Biology*, 26(2), 131-140.