The University of Tehran Press

Iranian Journal of Plant Protection Science

Online ISNN: 2008-4781

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

Control of *Phytophthora sojae* and *Macrophomina phaseolina* in soybean by biological agents

Saeid Mirzaei [1]✉, Masoud Ahmadi-Afzadi[2], Mohammadreza Lashkari [3], Batoul Sadeghi[4]

1. Corresponding Author, Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, kerman. Iran. Email: s.mirzaei@kgut.ac.ir.
2. Department of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Kerman, Iran. Email: m.ahmadiafzadii@kgut.ac.ir.
3. Department of Biodiversity, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Kerman, Iran. Email: mr.lashkari@gmail.com.
4. Former student of plant protection, Agricultural Faculty, Zabol University, Zabol, Iran. Email: batulsadeghy@gmail.com

Article Info

Article type:

Research Article

Article history:

Received: 14 March 2023

Revised: 29 May 2023

Accepted: 31 May 2023

Published online: 18 September 2023

Keywords:

Actinobacteria,

Charcoal rot disease,

Soybean,

Biocontrol.

ABSTRACT

Soybean is one of the most important oilseed crops, supplying half of the protein and vegetable oil by humans. Charcoal rot disease and soybean crown and root rot caused by *Macrophomina phaseolina* and *Phytophthora sojae*, respectively, are among the most important soybean pathogens that cause a reduction in crop yield. A biocontrol strategy using Actinobacteria, especially different species of *Streptomyces*, and Hypocreaceae especially different species of *Trichoderma*, is considered a method for the management of disease and pests. In this study, biological control of these pathogens was investigated using *Streptomyces* sp. isolate 23 and *Trichoderma* sp. isolates 1 and their volatile metabolites. The activity of *Streptomyces* isolates and a *Trichoderma* isolate taken from the soil of Kerman was evaluated against pathogenic fungi, *M. phaseolin*, and *P. sojae*. Experiments in the laboratory were conducted based on a completely randomized design with three replications. Sequence analysis of 16s rDNA and ITS region showed *Streptomyces* sp. isolate 23 and *Trichoderma* sp. isolate 1 belong to *S. bacillaris* and *T. longibrachiatum*, respectively. The results of the double culture method and volatile metabolites test showed that *S. bacillaris* isolate 23 and *T. longibrachiatum* isolate 1, significantly inhibited the growth of *M. phaseolina* and *P. sojae*. In both tests, the two biocontrol agents used showed more inhibitory effects on *P. sojae* compared to *M. phaseolina*. The results of the dual culture and volatile metabolites tests showed that *S. bacillaris* isolate 23 and *T. longibrachiatum* isolate 1 had a high inhibitory effect on *M. phaseolina* and *P. sojae*.

Cite this article: Mirzaei, S., Ahmadi-Afzadi, M., Lashkari, M. R., & Sadeghi, B. (2023). Control of *Phytophthora sojae* and *Macrophomina phaseolina* in soybean by biological agents. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 54 (1), 77-100. DOI: http//doi.org/10.22059/IJPPS.2023.356054.1007023

© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: http//doi.org/10.22059/IJPPS.2023.356054.1007023

Extended Abstract

Introduction

Soybean is one of the most important oilseed crops in the world, supplying half of the protein and vegetable oil consumed by humans. It is a nitrogen-fixing legume that is usually cultivated in alternation with cereals. Charcoal rot disease and soybean crown and root rot caused by *Macrophomina phaseolina* and *Phytophthora sojae*, respectively, are among the most important soybean pathogens that cause quantitative and qualitative reduction of crop yield. The common method of using chemical fungicides to control these diseases poses negative side effects on humans and the environment.

Biological control offers the best alternative for controlling plant diseases. Actinobacteria, especially different species of *Streptomyces*, and Hypocreaceae especially members of the genus *Trichoderma*, are considered as the promising method for the management of diseases and pests. Furthermore, Actinobacteria produce antifungal antibiotics, cell wall degrading enzymes, and plant growth promoters which protect plants from a wide range of phytopathogenic fungi. *Trichoderma* is of great importance in controlling plant pathogens due to its rapid growth, high ability to produce spores, and the ability of myco-parasitism against a wide range of fungal pathogens.

Materials and Methods

In this study, the activity of *Streptomyces* isolates and *Trichoderma* isolates taken from the soil of Kerman was evaluated against pathogenic fungi, *M. phaseolina*, and *P. sojae*. Experiments in the laboratory were conducted based on a completely randomized design with three replications. To confirm the antagonistic activity of *Trichoderma* sp. isolate 1 and *Streptomyces* sp. isolate 23, a dual culture assay and Sandwiched Petri dish method were used. *Streptomyces* sp. isolate 23 and *Trichoderma* sp. isolate 1 were identified based on morphological and molecular characteristics (16s rDNA and ITS regions).

Results and Discussion

Sequence analysis of 16s rDNA and ITS region showed S*treptomyces* sp. isolate 23 and *Trichoderma* sp. isolate 1 belong *to S. bacillaris* and *T. longibrachiatum* respectively.

Results of dual culture showed that the hyphal growth of *M. phaseolina* and P. sojae stopped by *T. longibrachiatum* with an average of 58% and 97.14%, respectively. In addition, the *T. longibrachiatum* was able to advance the inhibition zone and cover the pathogenic fungal colonies, and exert intense and rapid sporadic activity at various locations of hyphae, including on the pathogenic fungal colonies. This physiological feature is the most important stage in parasitic activity. Moreover, S. bacillaris significantly inhibited the hyphal growth of *M. phaseolina* and *P. sojae* in dual culture.

Streptomyces species have been identified as one of the promising sources for the biological control of plant diseases. They produce active antifungal and antibacterial substances. In this study was observed that volatile compounds of *S. bacillaris* have inhibitory effects on the hyphal growth of phytopathogenic fungi *M. phaseolina* and *P. sojae*. Furthermore, it was observed that volatile compounds of *S. bacillaris* stopped the production of microsclerotia in *M. phaseolina* and the radial growth of *P. sojae*. Also, Streptomyces generates antifungal volatile compounds. Furthermore, our results revealed that *T. longibrachiatum* volatile compound significantly decreased the rate of microsclerotia production in *M. phaseolina* and the density of the colony over passing time.

Conclusion

The results of the present study showed that two biocontrol agents *T. longibrachiatum* and *S. bacillaris* and their volatile compounds are highly efficient in the biocontrol of pathogenic fungi of *M. phaseolina* and *P. sojae* in vitro. Both *T. longibrachiatum* and *S. bacillaris* could decrease the production of microsclerotium of *M. phaseolina*. Microsclerotia are living structures that persist in the soil for many years and play an important role in the disease cycle. Studies have shown that inhibition of germination of the fungus's survival organs can disrupt the disease cycle and protect the plant. *T. longibrachiatum* and *S. bacillaris* can be good candidates for controlling *M. phaseolina* and *P. sojae* in soybean plants. Further investigation is needed in the greenhouse and field conditions.

نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۵۴، شماره ۱

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۸۶۸-۲۴۲۳

Homepage: http://ijpps.ut.ac.ir/

کنترل *Phytophthora sojae* و *Macrophomina Phaseolina* در سویا توسط عوامل زیستی

سعید میرزایی[۱]✉ | مسعود احمدی افزادی[۲] | محمدرضا لشکری[۳] | بتول صادقی[۴]

۱. نویسنده مسئول، گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: s.mirzaei@kgut.ac.ir.

۲. گروه بیوتکنولوژی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: m.ahmadiafzadii@kgut.ac.ir

۳. گروه تنوع زیستی، پژوهشکده علوم محیطی، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، کرمان، ایران. رایانامه: mr.lashkari@gmail.com

۴. دانشجوی سابق رشته بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه زابل، زابل، ایران. رایانامه: batulsadeghy@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقالهٔ پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۱۴
تاریخ بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۰۸
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۳/۱۰
تاریخ انتشار: ۱۴۰۲/۰۶/۲۷

کلیدواژه‌ها:
اکتینوباکتریا، بیماری پوسیدگی زغالی، سویا ، کنترل زیستی.

چکیده

سویا یکی از مهم‌ترین دانه‌های روغنی در جهان است که نیمی از پروتئین و روغن گیاهی مصرفی انسان را تامین می‌کند. بیماری پوسیدگی زغالی و پوسیدگی طوقه و ریشه سویا ناشی از *Macrophomina phaseolina* و *Phytophthora sojae* از مهم‌ترین بیماری‌های سویا هستند که باعث کاهش کمی و کیفی عملکرد محصول می‌شوند. راهبرد مهار زیستی با استفاده از خانواده Actinobacteria، به ویژه اعضای جنس *Streptomyces* و در خانواده Hypocreaceae، جنس *Trichoderma*، به عنوان یک روش امیدوارکننده برای مدیریت بیماری‌ها و آفات در نظر گرفته می‌شود. در این مطالعه فعالیت مهار زیستی یک جدایه استرپتومایسس و یک جدایه تریکودرمای جداسازی شده از خاک باغات استان کرمان در برابر قارچ‌های بیمارگر *M. phaseolina* و *P. sojae* مورد ارزیابی قرار گرفت. آزمایش¬ها در آزمایشگاه بر پایه طرح کاملاتصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه و تحلیل توالی 16s rDNA و ناحیه ITS نشان داد که *Streptomyces* sp. جدایه ۲۳ و *Trichoderma sp.* جدایه۱ به ترتیب متعلق به *S. bacillaris* و *T. Longibrachiatum* می‌باشند. نتایج روش کشت دوگانه و آزمون متابولیت‌های فرار نشان داد که *S. bacillaris* جدایه۲۳ و *T. longibrachiatum* جدایه۱ بطور معنی‌داری از رشد *M. phaseolina* و *P. sojae* جلوگیری کردند. در هر دو آزمون، دو عامل بیوکنترل مورد استفاده اثر بازدارندگی بیشتری بر روی رشد میسلیومی *P. sojae* در مقایسه با *M. phaseolina* از خود نشان دادند.

استناد: میرزائی، سعید؛ احمد افزادی مسعود؛ لشکری، محمدرضا و صادقی، بتول (۱۴۰۲). کنترل *Phytophthora sojae* و *Macrophomina Phaseolina* در سویا توسط عوامل زیستی. *نشریه دانش گیاهپزشکی ایران*، ۵۴ (۱)، ۱۰۰-۷۷. DOI: http//doi.org/10.22059/IJPPS.2023.356054.1007023

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

© نویسندگان.

DOI: http//doi.org/10.22059/IJPPS.2023.356054.1007023

مقدمه

سویا (*Glycine max* (L.) Merrill) یکی از مهم‌ترین محصولات دانه‌های روغنی در جهان است که نیمی از پروتئین و روغن‌های گیاهی مصرفی انسان را تامین می‌کند. سویا یکی از اعضای خانواده حبوبات با قابلیت تثبیت نیتروژن است که معمولاً به تناوب با غلات کشت می‌شود. به دلیل عملکرد بالا و هزینه برداشت کمتر، کشت آن نسبت به سایر غلات رو به افزایش است (Mirzaei, 2018). بر اساس گزارش فائو (FAO, 2019) ، کشت سویا در سال ۲۰۱۹ بیش از ۱۲۰ میلیون هکتار با تولید حدود ۳۳۳/۷ میلیون تن بوده و بر اساس این گزارش، سطح زیرکشت سویا در ایران ۶۷ هزار هکتار با تولید ۱۶۰ هزار تن بوده است. بر اساس آمارهای موجود، بیشترین میزان تولید سویا در ایران در سال ۲۰۰۴ بوده و پس از آن تولید سویا تا حدودی کاهش یافته است و از حدود ۲۱۸۰۰۰ تن در سال ۲۰۰۴ به حدود ۱۶۰۰۰۰ تن در سال ۲۰۱۹ (FAO, 2019) رسیده است.

گیاه سویا در برابر بسیاری از عوامل بیماری‌زا حساس هستند و بیشترین آسیب توسط عوامل بیماری‌زا ایجاد می‌شود که گیاهچه و ریشه گیاه را هدف قرار می‌دهند. از جمله عوامل بیماری‌زا که به ریشه‌ها و طوقه‌ها حمله می‌کنند، می‌توان به عوامل قارچی *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid و *Phytophthora sojae* اشاره کرد (Kaufmann & Gerdemann, 1985) که هر دو عامل بیماری‌زا، مخرب‌ترین بیماری‌های سویا در ایران و جهان هستند (Gujar, 2014; Gupta, 2012.

پیشینه پژوهش

افزایش سریع جمعیت همراه با تقاضای بیشتر برای غذا و نیز محدودیت استفاده از زمین‌های کشاورزی نیازمند افزایش عملکرد در واحد سطح می‌باشد. بنابراین نیاز به کشاورزی پایدار احساس می‌شود. دستیابی به یک سبک زندگی پایدار مستلزم کاهش کاربرد آفت‌کش‌های شیمیایی و اعمال روش‌های زیستی علیه آفات و بیمارگرهای گیاهی است (Stirling, 2017).

امروزه یکی از کامل‌ترین روش‌های مدیریت یکپارچه برای کنترل بیماری‌های گیاهی، استفاده از روش‌های زیستی است. مهار زیستی با استفاده از عوامل آنتاگونیست بومی می‌تواند نقش مؤثری در کاهش جمعیت بیمارگرها و خسارت آنها داشته باشد. علاوه براین، یک روش ایمن و سالم برای محیط زیست و در برخی موارد تنها گزینه برای محافظت از گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زا است (Cook, 1973). با این‌حال، مهار زیستی از نظر زیست محیطی یک راهبرد پایدار است که می‌تواند برای مدیریت بیماری‌های گیاهی و بهبود عملکرد گیاه مورد استفاده قرار گیرد. در این راستا، باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست به طور گسترده‌ای برای کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شوند (Shahzad, 2018).

یکی از مهمترین بیماری‌های خاکزاد سویا، بیماری بوته‌میری فیتوفترایی است. این بیماری در ایران اولین بار از استان لرستان گزارش شد (Rezaei & Alizade, 1998) . بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه سویا که توسط *P. sojae* ایجاد می‌شود، باعث مرگ گیاهچه قبل و بعد از ظهور آن می‌شود، همچنین در تمام مراحل رشدی گیاه مخصوصا زمانی که آب کافی در اختیار این بیمارگر قرار گیرد باعث پوسیدگی ریشه، مرگ و کاهش عملکرد گیاه تا حدود ۵۰ درصد می‌شود(Xiao, 2002). بذرها در زمان جوانه‌زدن و گیاهچه‌های آلوده به فاصله کوتاهی بعد از جوانه زدن از بین می‌روند. کنترل مؤثر این بیماری بسیار مشکل است، کاشت گیاهان مقاوم روش کنترلی متداول و اصولی این بیماری است (Erwin & Ribeiro, 1996). ظهور نژادهای جدید بیمارگر باعث شکسته شدن مقاومت ارقام سویا می‌شود (Sadeghi Garmaroodi, 2007 Mohammadi ,2007). روش‌های زراعی مانند زهکشی، کاهش فشردگی خاک و تناوب زراعی در مدیریت این بیماری مؤثر است (Schmitthenner, 1999). از آنجایی که عامل بیماری به شکل اُاوسپور می‌تواند در غیاب میزبان برای مدت زیادی در خاک دوام یابد، تناوب زراعی اثر کنترلی کمی دارد (Schmitthenner & Van Doren, 1985). در بهار، هرگاه دما مناسب باشد

اُاسپورها جوانه می‌زنند و تشکیل اسپورانژیوم‌ها را می‌دهند که در نهایت، زئوسپورها به تعداد فراوان در خاک‌های غرقابی یا اشباع شده تولید می‌شوند و به وسیله آب موجود در خاک انتشار یافته و زادمایه ثانویه را فراهم می‌سازد (Sinclair, 1989).

قارچ عامل بیماری پوسیدگی زغالی *M. phaseolina* می‌باشد. این قارچ دارای طیف وسیع میزبان بوده و بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی در ۱۰۰ خانواده، اعم از تک لپه و دو لپه را آلوده می‌کند (Gupta, 2012). آلودگی اولیه بیماری در مرحله گیاهچه اتفاق می‌افتد و معمولاً تا زمانی که گیاه سویا به مرحله رشد از شروع پرشدن دانه تا انتهای پر شدن دانه برسد به صورت پنهان باقی می‌ماند. علائم به صورت پژمرده شدن بوته‌ها قبل از رسیدن، پاره پاره شدن بافت پوست در پایین ساقه، تشکیل میکرواسکلروت‌ها در آوندهای آبکش و زیر پوست بوده که با تشکیل آنها بافت‌های داخلی به رنگ سیاه در می‌آیند. در آلودگی‌های شدید، گیاه میزبان به دلیل تولید زهرابه‌های قارچی مانند فازئولینون ۱ و انسداد آوندی توسط اندام‌های قارچی، از بین می‌روند (Ramezani, 2007).

اکتینومیست‌ها دارای ویژگی‌هایی هستند که به عنوان عوامل کنترل زیستی در برابر بیمارگرهای گیاهی مفید می‌باشند. این ویژگی‌ها شامل تولید انواع متابولیت‌های ثانویه و مواد فعال زیستی با ارزش تجاری مانند آنزیم‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، ویتامین‌ها، فاکتورهای رشد گیاهی و آلکالوئیدها می‌باشند (Baltz, 2016 ; Verma, 2011). اکتینومیست‌ها به دلیل ویژگی‌های رفتاری مانند استقرار در سطح ریشه گیاهان و تولید متابولیت‌های ثانویه متنوع، و نیز اثرات بازدارندگی بر میکروب‌ها، به عنوان عوامل بالقوه مهار زیستی در برابر بسیاری از بیمارگرهای مهم گیاهی در نظر گرفته می‌شوند. این موضوع به ویژه برای بیمارگرهای گیاهی مهم است، زیرا اهمیت این بیماری‌ها در جهان رو به افزایش است (Sharma, 2104). آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده توسط *Streptomyces* دارای اثرات ضد قارچی قوی بر روی طیف گسترده‌ای از شبه قارچ‌ها و قارچ‌ها مانند *Phytophthora brassicicola*، (Manhas & Kaur, 2016) *Pythium* spp.، (El-Tarabily, 2009) *Rhizoctonia solani*، (Atta, 2015) *Alternaria*، (Chen, 2016) و *Botrytis* sp. (Boukaew, 2017) هستند.

جنس تریکودرما شامل قارچ‌های رشته‌ای با توانایی مبارزه با بیماری‌های گیاهی و بهبوددهنده رشد گیاه می‌باشند که به سرعت در محیط رشد می‌کنند. قارچ‌های این جنس اسپورهای سبز رنگ متعددی تولید می‌کنند و معمولاً با ریشه مرتبط هستند(Howell, 2003). گونه‌های تریکودرما به عنوان قارچ‌های ریزوسفر، ساپروفیت عمومی تقریباً در هر خاکی یافت می‌شوند و اغلب از خاک و چوب و همچنین بستر گیاهان جدا می‌شوند. گونه‌های دیگر همزیست‌های مفیدی در بافت ریشه بسیاری از گیاهان هستند (Kaewchai *et al*. 2010). سازگاری بالای این قارچ با انواع زیستگاه‌ها به دلیل آنزیم‌های تجزیه‌کننده، متابولیت‌های گوناگون و مقاومت در برابر مهارکننده‌های میکروب‌های دیگر است. این قارچ‌ها نقش مهمی در سلامت اکوسیستم دارند. گونه‌های تریکودرما در کاهش شدت بیماری‌های گیاهی و به دنبال آن افزایش رشد و عملکرد گیاه نقش مفیدی دارند (Hermosa *et al*, 2014; Hermosa, 2012). اثرات مفید تریکودرما بر خاک و گیاه از طریق کنترل فلور میکروبی، تجزیه ترکیبات سمی، تحریک مستقیم رشد ریشه توسط فیتوهورمون‌ها، و نیز افزایش حلالیت فسفر و مواد مغذی در دسترس است (Martínez-Medina, 2011). گونه‌های مختلف تریکودرما به عنوان بازدارنده‌های زیستی در برابر طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زا مانند قارچ‌ها (Tchameni, 2017; Mendoza 2015) ، ویروس (Vitti, 2016) ، باکتری‌ها (Brotman, 2012 ،Yuan, 2016) و نماتد (Al-Hazmi & TariqJaveed, 2016) معرفی شده‌اند. در این مطالعه فعالیت آنتاگونیستی تریکودرما و اکتینومایسس بومی بر روی دو بیمارگر مهم سویا شامل *M. phaseolina* و *P. sojae* مورد بررسی قرار گرفت.

1 Phaseolinone 1

روش‌شناسی پژوهش

عوامل کنترل زیستی

جهت غربالگری اکتینومیست‌های خاکزی، ۱۵ نمونه خاک (از بخش های مختلف شامل ریزوسفر و عمق ۰ تا ۳۰ سانتی‌متر از سطح خاک) مزارع و باغات استان کرمان تهیه شد. نمونه‌ها در آزمایشگاه خشک شده و بعد از آنها رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-6} تهیه شد و در تشتک‌های حاوی محیط کشت CGA (۱۰ گرم گلیسیرین یا نشاسته، ۰/۳گرم کازئین، ۲گرم KNO_3، ۲گرم NaCl، ۲گرم K_2HPO_4، ۰/۰۵گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۰۲گرم $CaCO_3$، ۰/۰۱گرم $FeSO_4.7H_2O$ و ۱۸گرم آگار) کشت داده شدند (Aghighi, 2004). بعد از گذشت چهار تا هفت روز، هر پرگنه اکتینومیست در شرایط سترون با لوپ سترون برداشته و به روش کشت خطی به محیط کشت جدید CGA منتقل شد (Shahidi Bonjar, 2004a, b).

برای جداسازی جدایه‌های تریکودرما از خاک، از محیط کشت اصلاح شده الاد و چت استفاده شد (Elad & Chet,1981, Sadeghy, 2014). از نمونه‌های خاک، سوسپانسیون در رقت‌های مختلف 10^{-1}، 10^{-2} و 10^{-3} تهیه شد و دو قطره از سوسپانسیون هر نمونه به هر تشتک حاوی محیط کشت منتقل شد. تشتک‌ها بعد از ۴-۳ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس با استریومیکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفتند .خالص سازی با استفاده از روش کشت نوک ریسه پرگنه‌های مشکوک به تریکودرما روی محیط سیب زمینی- دکستروز- آگار (Potato Dextrose Agar=PDA) انجام شد.

شناسایی ریختی *Streptomyces* sp. جدایه۲۳ و *Trichoderma* sp. جدایه۱

بر اساس خصوصیات ریخت‌شناسی و مولکولی.*Streptomyces* sp جدایه ۲۳ و *Trichoderma* sp. جدایه ۱ شناسایی شدند. خصوصیات ریخت شناسی مانند رنگ توده میسیلیوم هوایی و رنگ پرگنه‌ها و ریخت‌شناسی زنجیره اسپور *Streptomyces* sp. جدایه ۲۳ که از دیگر خصوصیات گونه های این جنس است و به فرم‌های مارپیچی، صاف و انعطاف پذیر می‌باشد، با استفاده از کشت و تهیه اسلاید و بررسی زیر میکروسکوپ نوری تعیین شد (Bibb, 1985).

جهت بررسی ریخت‌شناسی جدایه فعال، لامل‌های سترون به صورت مورب در مسیر کشت خطی تازه استرپتومایسس قرار داده شدند. سپس تشتک‌ها در انکوباتور در دمای ۲۸ درجه سلسیوس به مدت چهار تا پنج روز نگهداری شدند. پس از مشاهده رشد مناسب استرپتومایسس لامل‌ها با احتیاط و به آرامی خارج شده و با میکروسکوپ نوری بررسی شدند (Cross, 1989).

به منظور شناسایی *Trichoderma* sp. جدایه ۱ در سطح گونه، سرعت رشد، ویژگی‌های ماکروسکوپی و ریزساختاری پرگنه‌ها، از جمله شکل، اندازه و سایر خصوصیات کنیدیوفورها، فیالیدها، کنیدی‌ها، کلامیدوسپورها بر اساس کلید (Gams & Bissett, 1998) ارزیابی شدند. برای دستیابی به حداقل، حداکثر و میانگین اندازه‌ها، ۳۰ تکرار از هر یک از اندام‌های مذکور اندازه‌گیری شد. برای بررسی سرعت رشد جدایه، حلقه‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه پرگنه جدایه فعال کشت سه روزه در ظروف حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس تحت شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی نگهداری شدند. رشد جدایه در روز سوم و چهارم اندازه‌گیری شد.

شناسایی مولکولی *Streptomyces* sp. جدایه ۲۳ و *Trichoderma* sp. جدایه ۱

استخراج DNA ژنومی استرپتومایسس بر اساس روش Kreuze (1999) انجام شد. جدایه‌ها ابتدا روی محیط کازئین، گلیسرین، آگار (Casin Glycerol Agar; CGA) کشت و به مدت ۵ روز در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در مرحله بعد باکتری (۲۵۰ میلی‌گرم) به یک لوله میکروسانتریفیوژ ۱/۵ میلی‌لیتری حاوی ۳۰۰ میکرولیتر بافر Tris-base ۵۰ میلی‌مولار(pH 8) ، EDTA ۲۰ میلی‌مولار (pH 8)، نمک طعام ۱۰۰ میلی‌مولار، ۱ درصد PVP و ۱۵۰ میکرولیتر SDS انتقال داده شد. لوله میکروسانتریفیوژ در نیتروژن مایع فرو برده و بلافاصله در حمام آب گرم در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار گرفت و ورتکس شد. این روش ۷ بار تکرار شد. پس از افزودن ۲۰۰ میکرولیتر بافر لیز، لوله میکرو سانتریفیوژ در ۸۰۰۰ دور

در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از آن مایع رویی با ۵۰۰ میکرولیتر محلول کلروفرم- ایزوآمیل الکل مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره با ایزوپروپانول سرد مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری، سپس با دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پلت تشکیل شده با اتانول ۷۰ درصد شسته و در دمای اتاق خشک شد. باقیمانده در ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر حل شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

توده قارچی *Trichoderma* sp. جدایه ۱ برای استخراج DNA استفاده شد. برای تولید توده میسلیوم، جدایه‌ها در محیط سیب‌زمینی- دکستروز- آگار(PDA) کشت داده شدند و به مدت ۷ روز در دمای ۲۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. سپس DNA مطابق با روش Feng et al. (2010) استخراج شد. بیست میلی‌گرم میسلیوم آسیاب شده در حضور نیتروژن مایع به ۶۵۰ میکرولیتر بافر لیز حاوی Tris-HCl ۱۰۰ میلی مولار (pH 8)، و ۵۰ میلی مولار EDTA (pH 8)، SDS ۱ درصد اضافه شد. سپس نمونه‌ها به مدت ۱۰ ثانیه ورتکس شده و در ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت دو دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شدند. ۵۰۰ میکرولیتر از مایع رویی به یک لوله میکروسانتریفیوژ جدید منتقل شد و ۱۰۰ میکرولیتر بافر استات پتاسیم ۳ مولار (pH 5.5) به آن اضافه شد و در ۱۶۰۰۰ دوردر دقیقه به مدت دو دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ، ۵۰۰ میکرولیتر ایزوپروپانول به ۵۰۰ میکرولیتر مایع رویی اضافه شد و در ۱۶۰۰۰ دور در دقیقه به مدت دو دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ شد. پلت تشکیل شده با ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۷۵ درصد شسته شده و در دمای اتاق در هوا خشک شد سپس در ۱۰۰ میکرولیتر آب دوبار تقطیر سترون حل شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمراز (PCR) برای *Streptomyces* sp. جدایه ۲۳ با استفاده از ژن 16 srRNA با پرایمرهای اختصاصی

۲۷f (AGAGTTTGATCCTGGCTCAG) و ۱۴۹۲ r (TACGGYTACCTTGTTACGACTT) انجام شد (Lane, 1991). شناسایی مولکولی *Trichoderma* sp. جدایه ۱ با تکثیر ناحیه ITS1-5.8S-ITS2 از rDNA با جفت آغازگرهای ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) و ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) انجام شد (White, 1990). مخلوط واکنش برای هر دو جدایه در حجم ۲۰ میکرولیتر شامل ۶ میکرولیتر آب دیونیزه سترون، ۱۰ میکرولیتر مخلوط آماده واکنش، ۱/۵ میکرولیتر از هر آغازگر و یک میکرولیتر DNA بود. تکثیر DNA در یک ترموسایکلر (Eppendorf, Germany) انجام شد که برای یک چرخه ۳ دقیقه‌ای در دمای ۹۴ درجه سلسیوس و سپس ۳۵ چرخه ۴۵ ثانیه‌ای در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۵۵ درجه سلسیوس، ۳۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلسیوس و یک چرخه نهایی در دمای ۷۲ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه برنامه‌ریزی شده بود. بعد محصول واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز روی ژل آگارز ۱ درصد مشاهده شدند. یک مارکر 1Kb (یکتا تجهیز، ایران) به عنوان نشانگر وزن مولکولی استفاده شد. محصول واکنش بعد از خالص سازی به منظور تعیین توالی به شرکت ماکروژن (Seoul, South Korea) ارسال شد. بعد از تعیین توالی نوکلئوتیدی ژن 16srRNA مربوط به جدایه مورد نظر، توالی به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژن مورد آنالیز قرار گرفت.

ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی *Trichoderma* sp. جدایه۱ و *Streptomyces sp.* S جدایه۲۳

از میان جدایه‌های رشدیافته بر روی محیط کشت سه جدایه تریکودرما و سه جدایه استرپتومایسس شناسایی شد.که از میان این جدایه‌ها، جدایه ۱ (تریکودرما) و جدایه ۲۳ (استرپتومایسس) بر اساس خصوصیات رشدی بهتر انتخاب شدند. برای تایید فعالیت آنتاگونیستی *Trichoderma* sp. جدایه۱ و *Streptomyces* sp. جدایه ۲۳، بر روی عوامل بیماری‌زای، *M.phaseolina* و *P. sojae*، از روش کشت متقابل استفاده شد. یک قرص میسلیومی با قطر ۷ میلی‌متر از حاشیه فعال پرگنه قارچ بیماری‌زا و یک قرص میسلیومی با قطر ۷ میلی‌متر از حاشیه فعال پرگنه قارچ تریکودرما در دو طرف تشتک پتری با قطر

۱۰ سانتی‌متر و در ۱/۵ سانتی‌متری حاشیه محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) کشت داده شد. کشت به نحوی بود که دو عامل روبروی هم بودند. تشتک‌های پتری به مدت چهار روز در تاریکی در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای تعیین فعالیت ضد قارچی جدایه استرپتومایسس از همین روش استفاده شد، با این تفاوت که جدایه استرپتومایسس به صورت خطی در یک طرف تشتک پتری کشت داده شد و در تیمار شاهد فقط عامل بیمارگر کشت گردید و عامل کنترل زیستی کشت نشد. این آزمایش در سه حالت برای *Streptomyces* sp. جدایه ۲۳ انجام شد و شامل کشت همزمان قارچ‌های بیمارگر و عامل کنترل زیستی، کشت عامل کنترل زیستی ۲۴ و ۴۸ ساعت قبل از قارچ‌های بیماری‌زا بود برای هر دو مورد تریکودرما و استرپتومایسس آزمایش در سه تکرار انجام شد.

میزان بازداری رشد شعاعی بیمارگر نسبت به شاهد بر اساس فرمول زیر محاسبه شد:

فرمول ۱:

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

IG: درصد مهار رشد میسلیوم قارچ بیماری‌گر

C: شعاع پرگنه قارچ بیماری‌زا در تشتک شاهد

T: شعاع پرگنه قارچ بیماری‌زا در مقابل عامل کنترل زیستی

اثر متابولیت‌های فرار *Trichoderma* sp. جدایه۱ و *Streptomyces* sp. جدایه ۲۳ بر رشد میسلیوم قارچ‌های بیماری‌زا

این آزمون بر اساس روش Denis & Webster (1971) و با تشتک‌های روی هم استفاده شد، به طوری که تشتک حاوی قارچ بیمارگر در بالا و تشتک حاوی جدایه تریکودرما و یا استرپتومایس در پایین قرار گرفت. دور تشتک‌های روی هم قرار گرفته با پارافیلم به خوبی مسدود شد تا ارتباط دو ظرف با محیط خارج به طور کامل قطع شده و از خروج ترکیبات فرار به خارج جلوگیری شود. در تیمارهای شاهد نیز به جای استفاده از جدایه تریکودرما در تشتک پایینی از قرص میسلیومی محیط کشت استفاده شد. تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری شده و پس از ۹۶ ساعت قطر پرگنه قارچ بیمارگر و میزان تولید اسکلروت در تیمارهای مختلف، اندازه گیری و با تیمار شاهد مقایسه شد. در نهایت درصد بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در این مدت براساس فرمول یک محاسبه و یادداشت شد

این آزمایش در چهار حالت به شرح زیر انجام شد:

۱- کشت قارچ‌های بیماری‌زا و عوامل کنترل زیستی به صورت همزمان انجام شد

۲- عوامل بیوکنترل ۲۴ ساعت قبل از قارچ‌های بیماری‌زا کشت داده شدند.

۳- عوامل بیوکنترل ۴۸ ساعت قبل از قارچ‌های بیماری‌زا کشت داده شدند.

۴- عوامل بیوکنترل ۷۲ ساعت قبل از قارچ‌های بیماری‌زا کشت داده شدند.

پس از۹۶ ساعت، شعاع پرگنه های قارچ بیماری‌زا در تیمارهای مختلف اندازه‌گیری و با تیمار شاهد مقایسه شد. در نهایت، درصد مهار رشد شعاعی بیماری‌زا در این مدت محاسبه و بر اساس فرمول ۱ ثبت شد. از سه تکرار زیستی استفاده شد و آزمایش‌ها سه بار تکرار شد.

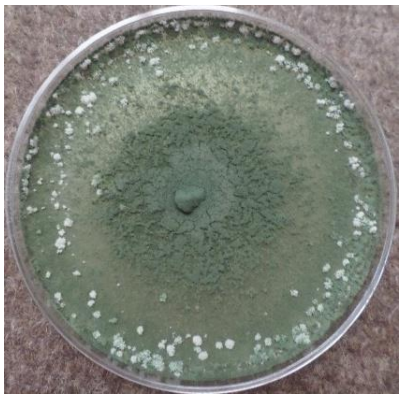
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه واریانس تمامی داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد انجام شد. همچنین داده‌های بدست آمده از نرم افزار آماری و جدول‌ها و نمودارهای مربوطه با استفاده از برنامه‌های Excel تهیه شد.

نتایج

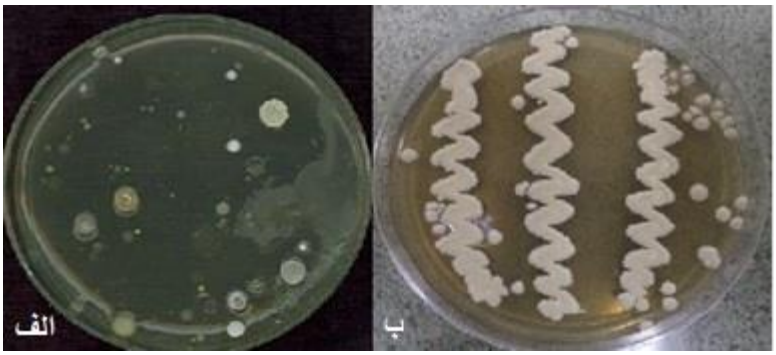
نتایج شناسایی ریخت‌شناسی جدایه تریکودرما و استرپتومایسس

شناسایی .*Trichoderma* sp جدایه ۱ بر اساس ویژگی‌های ماکروسکوپی و ریزساختاری پرگنه‌ها، از جمله شکل، اندازه و سایر خصوصیات کنیدیوفورها، بر اساس کلید Gams & Bissett, (1998) شناسایی شد (شکل ۱).



شکل ۱. مشخصات ظاهری پرگنه تریکودرما بر روی محیط کشت سیب‌زمینی- دکستروز- آگار

جدایه‌های اکتینومیست که بر اساس خصوصیات ظاهری تا حدودی از هم متمایز بودند، از کشت نمونه‌های خاک حاصل شد. تشتک حاوی کشت اولیه خاک و کشت خطی خالص جدایه فعال در شکل ۲ نشان داده شده است.



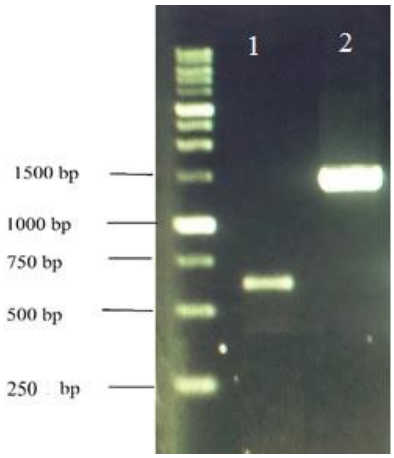
شکل۲ . تشتک حاوی رقت 10^{-5} نمونه خاک در محیط کشت کازئین، گلیسرین، آگار، پس از هفت روز در ۲۹ درجه سلسیوس پرگنه های اکتینومیست و برخی پرگنه‌های قارچ‌ها و باکتری‌ها مشخص می‌باشد (الف)، جدایه فعال خالص به صورت کشت خطی (ب).

بررسی ریخت شناسی اسپور جدایه استرپتومایسس نشان داد که آرایش اسپورها به صورت زنجیره‌ایی هستند (شکل ۳).

شکل۳. زنجیره اسپوری جدایه استرپتومایسس(بزرگنمایی۴۰)

نتایج شناسایی مولکولی جدایه تریکودرما و استرپتومایسس

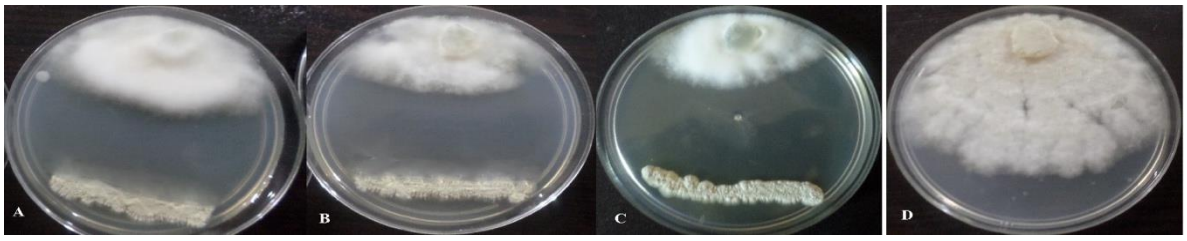
محصول PCR جدایه اکتینومیست و تریکودرما بر روی ژل آگارز ۱ درصد به ترتیب باندهایی در محدوده ۱۴۹۲ و ۶۰۰ bp نشان داد (شکل ۴). پس از تعیین توالی به بررسی میزان قرابت جدایه‌های مورد مطالعه با جدایه‌های نزدیک به آنها در بانک‌های اطلاعاتی پرداخته شد. به این منظور پس از تعیین توالی قطعی با مقایسه دو توالی پیشرو و پسرو، توالی مورد نظر با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI) با نرم افزار Blast هم‌ردیف شد. نتایج حاصل از هم‌ردیفی توالی جدایه تریکودرما و استرپتومایسس با اطلاعات موجود در بانک ژن نشان داد که جدایه‌های مورد نظر به ترتیب با ۹۹ درصد و ۱۰۰ درصد تشابه، متعلق به گونه *Trichoderma longibrachiatum* و *Streptomyces bacillaris* است.



شکل ۴. تکثیر قطعه حدود ۶۰۰ جفت بازی جدایه تریکودرما (لاین اول) و تکثیر قطعه حدود ۱۴۹۲ جفت بازی جدایه اکتینومیست (لاین دوم) بر روی ژل آگارز ۱٪

اثر *Streptomyces bacillaris* جدایه ۲۳ روی رشد میسلیومی *Phytophthora sojae* در آزمون کشت متقابل

نتایج اثرات بازدارندگی *Streptomyces bacillaris* جدایه ۲۳ روی رشد میسلیومی *P. sojae* در شکل ۵ ارائه شده است.



شکل ۵. اثر مهار زیستی جدایه ۲۳ *Streptomyces bacillaris* بر روی رشد میسلیومی قارچ *Phytophthora sojae* در کشت همزمانی (A)، ۲۴ ساعت (B) ، ۴۸ ساعت (C) و شاهد(D).

بیشترین اثر بازدارندگی (با بازداری ۸۸/۰۹ درصد) زمانی مشاهده شد که*S. bacillaris* جدایه ۲۳، ۴۸ ساعت زودتر از *P. sojae* کشت شده بود (جدول۱ و ۲).

جدول ۱. تجزیه واریانس اثر مهار زیستی جدایه ۲۳ *Streptomyces bacillaris* بر روی رشد میسلیومی جدایه *Phytophthora sojae*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۵۰۰۰/۴۱۹۷۴**
خطا	۸	۰/۵۱
ضریب تغییرات		۱/۱۷۷

**: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

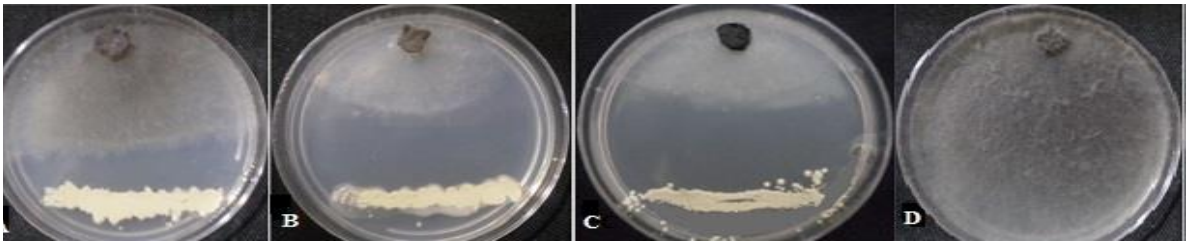
جدول۲. مقایسه میانگین اثر مهار زیستی جدایه ۲۳ *Streptomyces bacillaris* بر روی رشد میسلیومی *Phytophthora sojae* در آزمون کشت متقابل در زمان‌های مختلف

تیمار	درصد مهار
کشت *همزمان* عامل بیمارگر و جدایه ۲۳ *S. bacillaris*	۷۵/۲۳C*
جدایه ۲۳ از *S. bacillaris* ۲۴ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۷۹/۵۲b
جدایه ۲۳ از*S. bacillaris* ۴۸ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۸۸/۰۹a

*: اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن ($P\leq ۰/۰۱$) با یکدیگر تفاوت معنی داری دارند. هر عدد در جدول میانگین سه تکرار است

اثر*Streptomyces bacillaris* جدایه ۲۳ روی رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina* در آزمون کشت متقابل

نتایج اثرات بازدارندگی*Streptomyces bacillaris* جدایه ۲۳ بر روی رشد میسلیومی *M. phaseolina* در شکل ۶ ارائه شده است.



شکل ۶. اثر مهار زیستی جدایه ۲۳ *Streptomyces* sp. بر روی رشد میسلیومی قارچ *Macrophomina phaseolina* در کشت همزمانی (A)،۲۴ ساعت (B) ، ۴۸ ساعت (C) و شاهد(D).

S. bacillaris جدایه ۲۳ توانست از رشد شعاعی *M. phaseolina* در کشت همزمان، ۲۴ و ۴۸ ساعت قبل نسبت به *M. phaseolina* جلوگیری کند. بیشترین اثر مهار زیستی بر رشد میسلیومی *M. phaseolina* زمانی مشاهده شد که*S. bacillaris* جدایه ۲۳، ۴۸ ساعت زودتر از *M. phaseolina* کشت داده شد (۷۰/۴۷ درصد) (جدول۳ و ۴).

جدول ۳. تجزیه واریانس اثر مهار زیستی جدایه ۲۳ *Streptomyces bacillaris* بر روی رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۲۸۷۹/۲۰۶۳**
خطا	۸	۱/۸۶
ضریب تغییرات		۳/۱۸۷

**: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

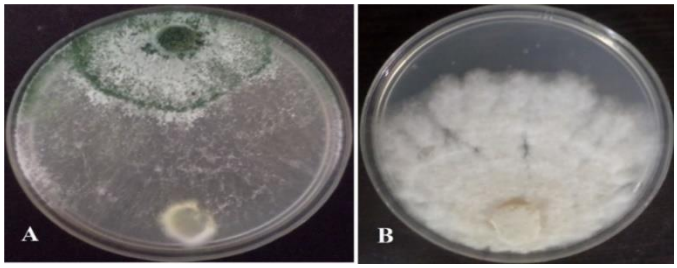
جدول ۴. مقایسه میانگین اثر مهار زیستی جدایه ۲۳ از *Streptomyces bacillaris* بر روی رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina* در آزمون کشت متقابل در زمان‌های مختلف

تیمار	درصد مهار
کشت همزمان *S. bacillaris* و عامل بیمارگر	۴۱/۴۲c*
جدایه ۲۳ از *S. bacillaris* ۲۴ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۵۹/۵۲b
جدایه ۲۳ از *S. bacillaris* ۴۸ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۷۰/۴۷a

*: اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن ($P\leq ۰/۰۱$) با یکدیگر تفاوت معنی داری دارند. هر عدد در جدول میانگین سه تکرار است

اثر *Trichoderma longibrachiatum* جدایه ۱ روی رشد میسلیومی *Phytophthora sojae* در آزمون کشت متقابل

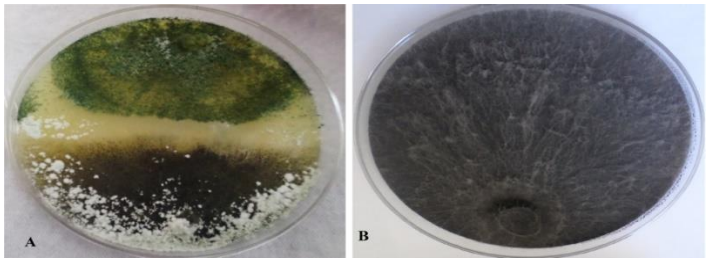
T. longibrachiatum جدایه ۱ با میانگین ۹۷/۱۴ درصد از رشد میسلیومی *P. sojae* جلوگیری کرد (شکل ۷).



شکل ۷. اثر مهار زیستی *Trichoderma longibrachiatum* جدایه ۱ بر روی رشد میسلیومی قارچ *Phytophthora sojae* در کشت متقابل (A)، شاهد (B).

اثر *Trichoderma longibrachiatum* جدایه ۱ بر روی رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina* در آزمون کشت متقابل

نتایج حاصل از اثرات آنتاگونیستی*T. longibrachiatum* جدایه ۱ روی *M. phaseolina* در شکل ۸ نشان داده شده است.

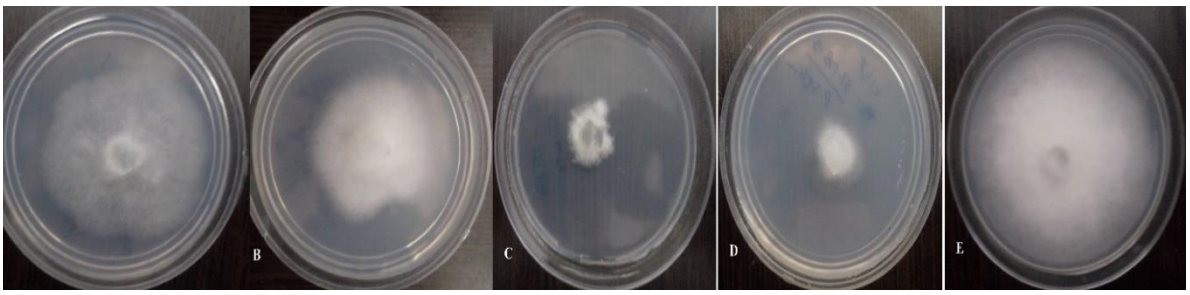


شکل ۸. اثر مهار زیستی *Trichoderma longibrachiatum* جدایه ۱ بر روی رشد میسلیومی قارچ *Macrophomina phaseopina* در کشت متقابل (A)، شاهد(B).

T. longibrachiatum جدایه ۱ توانست تا ۵۸ درصد از رشد *M. phaseolina* نسبت به شاهد جلوگیری کند.

اثر متابولیت های فرار *Streptomyces bacillaris* جدایه ۲۳ بر روی رشد میسلیومی *Phytophthora sojae*

نتایج نشان داد که*S. bacillaris* جدایه ۲۳ به طور قابل توجهی رشد میسلیومی *P. sojae* را مهار می‌کند و سرکوب آن به طور معنی‌داری با زمان و مدت زمان کشت پرگنه‌های آنتاگونیست و تولید متابولیت‌های فرار افزایش می‌یابد (شکل ۹).



شکل ۹. اثر مهار زیستی متابولیت های فرار جدایه ۲۳ *S. bacillaris* بر روی رشد میسلیومی قارچ *Phytophthora Sojae* در کشت همزمان (A)، ۲۴ ساعت (B) ، ۴۸ ساعت (C) و ۷۲ ساعت (D) و شاهد (E).

میزان مهار در مدت ۴ روز به ترتیب ۳۷/۵ درصد در کشت همزمان *S. bacillaris* و عامل بیمارگر، ۷۵/۱۶ درصد در کشت *S. bacillaris* ۲۴ قبل از بیمارگر، ۸۱/۴۱ درصد در کشت *S. bacillaris* ۴۸ قبل از بیمارگر و ۹۱/۴۱ درصد در کشت *S. bacillaris* ۷۲ قبل از بیمارگر به دست آمد (جدول۵ و ۶).

جدول ۵. تجزیه واریانس اثر متابولیت‌های فرار *S. bacillaris* جدایه ۲۳ بر روی رشد میسلیومی *Phytophthora sojae*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۴۳۰۳/۴۶**
خطا	۸	۰/۰۱۴
ضریب تغییرات		۰/۱۱۸

**: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

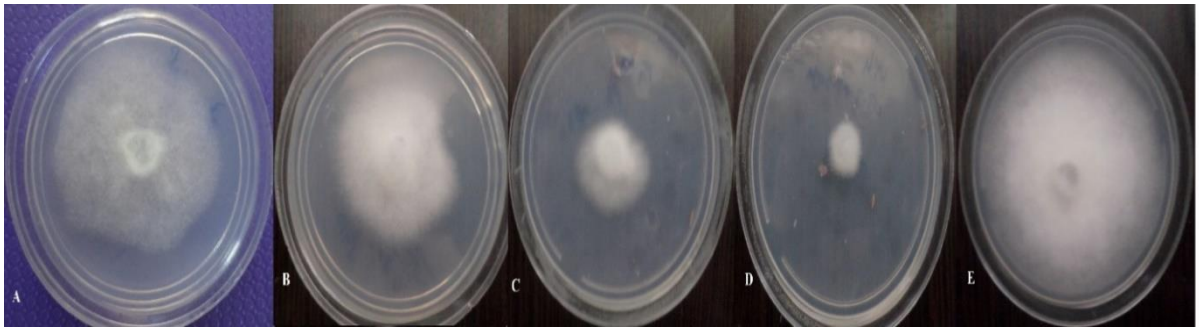
جدول ۶- مقایسه میانگین اثر مهار زیستی متابولیت‌های فرار جدایه ۲۳ *Streptomyces bacillaris* بر روی رشد میسلیومی *Phytophthora sojae* در زمان‌های مختلف

تیمار	درصد مهار
کشت همزمان *S. bacillaris* و عامل بیمارگر	۳۷/۵۵d*
جدایه ۲۳ از *S. bacillaris* ۲۴ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۷۵/۱۶c
جدایه ۲۳ از *S. bacillaris* ۴۸ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۸۱/۴۱b
جدایه ۲۳ از *S. bacillaris* ۷۲ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۹۱/۴۱a

*:اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن ($P\leq ۰/۰۱$) با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند. هر عدد در جدول میانگین سه تکرار است

اثر متابولیت‌های فرار *Trichoderma longibrachiatum* جدایه ۱ روی رشد رشد میسلیومی *Phytophthora sojae*

نتایج نشان داد که متابولیت‌های فرار *T. longibrachiatum* جدایه ۱ به طور معنی‌داری رشد میسلیومی *P. sojae* را سرکوب می‌کند. با افزایش زمان بعد از کشت پرگنه‌های آنتاگونیست، تولید متابولیت‌های فرار و اثر آنها بر مهار رشد میسلیومی*P.sojae* به طور معنی‌داری افزایش یافت (شکل ۱۰).



شکل ۱۰. اثر مهار زیستی متابولیت‌های فرار از.*Trichoderma* sp بر روی رشد میسلیومی قارچ *Phytophthora Sojae* در کشت همزمانی (A)،۲۴ ساعت (B) ، ۴۸ ساعت (C)، ۷۲ ساعت (D) و شاهد (E).

درصد بازداری به ترتیب ۳۷/۵ درصد در کشت همزمان *T. longibrachiatum* و عامل بیمارگر، ۷۵/۱۶ درصد در کشت *T. longibrachiatum* ۲۴ ساعت قبل از عامل بیمارگر، ۸۷/۷ درصد در کشت *T. longibrachiatum* ۴۸ ساعت قبل از عامل بیمارگر و ۹۳/۸۶ درصد در کشت *T. longibrachiatum* ۷۲ ساعت قبل از عامل بیمارگر طی مدت چهار روز به دست آمد (جدول۷ و ۸).

جدول ۷. تجزیه واریانس اثر مهار زیستی متابولیت‌های فرار از جدایه ۱ *Trichoderma longibrachiatum* بر روی رشد میسلیومی *Phytophthora sojae* در زمان‌های مختلف

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۴۶۸۱/۳۰۱۵**
خطا	۸	۰/۰۲۲۲
ضریب تغییرات		۰/۲۵

**: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

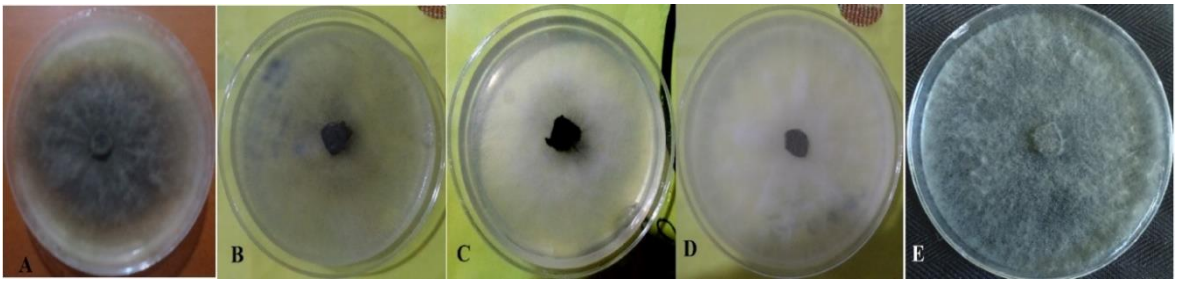
جدول ۸. مقایسه میانگین اثر مهار زیستی متابولیت‌های فرار از جدایه ۱ *Trichoderma. longibrachiatum* بر روی رشد میسلیومی *Phytophthora sojae* در زمان‌های مختلف

تیمار	درصد مهار
کشت همزمان *T. longibrachiatum* و عامل بیمارگر	۳۷/۵۵d*
جدایه۲۳ از *T. longibrachiatum* ۲۴ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۷۵/۱۶c
جدایه ۲۳ از *T. longibrachiatum* ۴۸ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۸۷/۷b
جدایه ۲۳ از *T. longibrachiatum* ۷۲ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۹۳/۸۶a

*: اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن (P≤۰/۰۱) با یکدیگر تفاوت معنی داری دارند. هر عدد درجدول میانگین سه تکرار است

اثر متابولیت‌های فرار *Streptomyces bacillaris* جدایه ۲۳ روی رشد میسلیومی *Macrophomina phaseolina*

نتایج نشان داد، متابولیت‌های فرار *S. bacillaris* جدایه۲۳ به طور معنی‌داری از رشد میسلیوم *M. phaseolina* جلوگیری می‌کند. همانطور که در شکل ۱۱ مشاهده می‌شود.



شکل ۱۱. اثر مهار زیستی متابولیت‌های فرار از *Streptomyces bacillaris* بر روی رشد میسلیومی قارچ *Macrophomina phaseopina* در کشت همزمانی (A)، ۲۴ ساعت (B) ، ۴۸ ساعت (C)، ۷۲ ساعت (D) و شاهد(E).

تولید متابولیت‌های فرار *S. bacillaris* در مهار رشد میسلیومی و تولید میکرواسکلروتیوم *M. phaseolina* از نظر آماری افزایش یافت (جدول ۹). درصد بازداری رشد میسلیومی به ترتیب در کشت همزمان، و کشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قبل از عامل بیمارگر ۴/۹، ۷، ۹/۴ و ۱۱ درصد بود (جدول ۹ و ۱۰).

جدول ۹. تجزیه واریانس اثر مهار زیستی متابولیت‌های فرار جدایه ۲۳ *Streptomyces* sp بر روی رشد میسلیومی *Macrophomina phaseopina*

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۲۲/۳۱**
خطا	۸	۰/۰۰۸
ضریب تغییرات		۱/۱۲

**: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

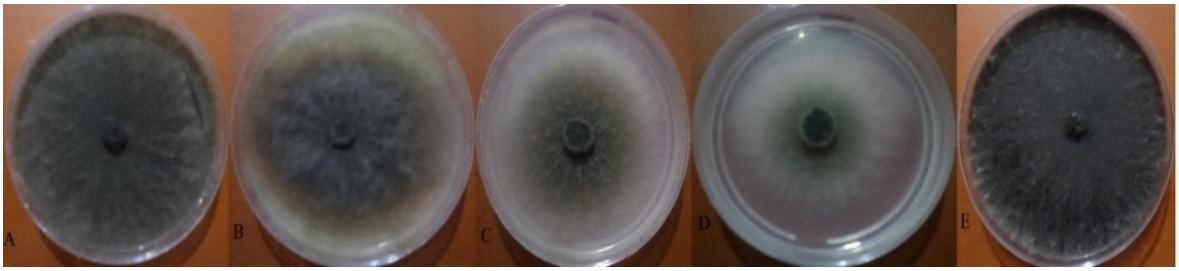
جدول ۱۰. مقایسه میانگین اثر مهار زیستی متابولیت‌های فرار جدایه ۲۳ *Streptomyces bacillaris* بر روی رشد میسلیومی *Macrophomina phaseopina* در زمان‌های مختلف

تیمار	درصد مهار
کشت همزمان*S. bacillaris* و عامل بیمارگر	۴/۹۰d*
جدایه۲۳ از *S. bacillaris* ۲۴ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۷c
جدایه ۲۳ از *S. bacillaris* ۴۸ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۹/۴b
جدایه ۲۳ از *S. bacillaris* ۷۲ ساعت قبل از عامل بیمارگر	۱۱/۱a

*:اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن ($P\leq ۰/۰۱$) با یکدیگر تفاوت معنی داری دارند. هر عدد درجدول میانگین سه تکرار است

اثر متابولیت های فرار*Trichoderma longibrachiatum* جدایه ۱ روی رشد میسلیومی *Macrophomina phaseopina*

نتایج نشان داد که با گذشت زمان و افزایش سن پرگنه آنتاگونیست، تولید متابولیت‌های فرار و اثر مهاری آنها بر رشد میسلیومی و تولید *M. phaseolina* به طور معنی‌داری افزایش یافته است (شکل ۱۲).



شکل ۱۲. اثر مهار زیستی متابولیت‌های فرار .*Trichoderma* sp بر روی رشد میسلیومی قارچ *Macrophomina phaseopina* در کشت همزمانی (A)۲۴ ساعت (B) ، ۴۸ ساعت (C) ، ۷۲ساعت (D) و شاهد (E).

به‌طوری که میزان بازداری در مدت سه روز به ترتیب صفر، ۴/۹ و ۱۹/۶۶ و ۳۷/۳۳ درصد در کشت همزمان *T. longibrachiatum* و عامل بیمارگر و کشت *T. longibrachiatum* ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت قبل از بیمارگر بود (جدول ۱۱ و ۱۲).

جدول ۱۱. تجزیه واریانس اثر مهارکننده متابولیت های فرار جدایه ۱ *Trichoderma* sp بر روی رشد میسلیومی *Macrophomina. phaseolina*.

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۳	۸۴۸/۶۶**
خطا	۸	۰/۱
ضریب تغییرات		۲/۱۱

**: نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد.

جدول ۱۲. مقایسه میانگین اثر مهارکننده متابولیت‌های فرار جدایه ۱ از *Trichoderma longibrachiatum* بر روی رشد میسلیومی *Macrophomina. Phaseolina* در زمان‌های مختلف

تیمار	درصد مهار
کشت همزمان *T. longibrachiatum* و عامل بیمارگر	۰d*
جدایه۲۳ از *T. longibrachiatum* ۲۴ ساعت قبل از بیمارگر	۴/۹c
جدایه ۲۳ از*T. longibrachiatum* ۴۸ ساعت قبل از بیمارگر	۱۹/۶۶b
جدایه ۲۳ *T. longibrachiatum* ۷۲ساعت قبل از بیمارگر	۳۷/۳۳a

*اعدادی که با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن ($P\leq ۰/۰۱$) با یکدیگر تفاوت معنی داری دارند. هر عدد درجدول میانگین سه تکرار است.

همانطور که از نتایج کشت دوگانه و متابولیت‌های فرار مشخص است دو عامل بیوکنترل *T. longibrachiatum* و *S. bacillaris* اثر مهاری بسیار بالاتری بر روی*P. sojae* در مقایسه با *M. phaseopina* دارند.

بحث

کنترل زیستی بهترین روش جایگزین برای کنترل بیماری‌های گیاهی است. باکتری‌ها، قارچ‌ها و اکتینوباکتری‌ها به عنوان عوامل مهار زیستی با موفقیت در کنترل بیمارگرهای گیاهی استفاده شده‌اند (He, 2021). علاوه براین، اکتینوباکتری‌ها آنتی‌بیوتیک‌های ضد قارچی، آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی و محرک‌های رشد گیاهی تولید می‌کنند که از گیاهان در برابر طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زا محافظت می‌کنند (Chen, 2018). تریکودرما به عنوان یکی از عوامل مهم مهار زیستی بیماری‌های گیاهی به دلیل رشد سریع، توانایی بالا در تولید اسپور، توانایی مایکوپارازیتیسم در برابر طیف وسیعی از بیمارگرهای قارچی در کنترل بیمارگرهای گیاهی از اهمیت بالایی برخوردار است (Mukhopadhyay & Kumar, 2020). علاوه براین، *Streptomyces*، به عنوان یکی از اعضای اکتینومیست‌ها، فراوان‌ترین میکروارگانیسم‌های خاک هستند و متابولیت‌های ثانویه آنها با موفقیت به فرمولاسیون برای کنترل بیمارگرهای گیاهی قارچی محصولات مختلف تبدیل شده‌اند (Sharma, 2014).

تا به امروز، گونه‌های مختلف تریکودرما به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته و به عنوان رایج‌ترین عوامل مهار زیستی در کشاورزی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Woo, 2014). با این حال، مطالعات برای یافتن جدایه‌های جدید تریکودرما که دارای فعالیت ضد قارچی قوی هستند، هنوز ادامه دارد (Herath *et al.*, 2015). مایکوپارازیتیسم به عنوان یکی از مکانیسم‌های مهم تریکودرما در کنترل بیمارگرهای قارچی مطرح شده است (Benítez *et al.*, 2004). به طور کلی پدیده مایکوپارازیتیسم توسط *Trichoderma longibrachiatum* برعلیه قارچ‌های بیماری‌زا با روش کشت دوگانه بررسی شده است (Vieira, 2013; Steindorff, 2014).

در این مطالعه فعالیت آنتاگونیستی *T. longibrachiatum* در کشت دوگانه بررسی و مشخص شد که *T. longibrachiatum* رشد میسیلیومی قارچ‌های بیماری‌زا *M. phaseolina* (بیش از ۵۸ درصد) و *P. sojae* (بیش از ۹۷ درصد) را مهار می‌کند. این مشاهده ممکن است به دلیل پدیده مایکوپارازیتیسم یا تولید آنتی بیوتیک در محیط آگار باشد. مطالعات Tapwal, (2011) و Prasad & Kumar, (2011) نیز نشان میدهد که تریکودرما دارای پتانسیل آنتاگونیستی در برابر قارچ های بیماری‌زای گیاهی مانند *R. solani*، *Alternaria alternata*، *Curvularia lunata* و *F. oxysporum* در کشت دوگانه است. Ambuse (2012) نشان دادند که گونه‌های مختلف تریکودرما بیش از ۸۰ درصد فعالیت آنتاگونیستی علیه *A. tenuissima* در کشت دوگانه دارند. Choudhary & Reena, (2012) مشاهده کردند که *T. harzianum*، *T. viride* و *T. koningii* مهار قابل توجهی بر رشد قارچ بیماری‌زا *F. oxysporum* f.sp *lentis* داشتند. فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های *Trichoderma* sp. بر علیه *Colletotrichum capsici* نشان میدهد که *T. harzianum* پتانسیل مهار رشد میسلیوم *C. capsici* را دارد (Rahman, 2013). انواع مختلفی از آنتاگونیسمی بین گونه‌های *Trichoderma* sp. و بیمارگرهای گیاهی گزارش شده (Dubey *et al.*, 2011; Qualhato *et al.*, 2013; Monteiro *et al.*, 2010; Matroudi *et al.*,2009). برخی از گونه‌های *Trichoderma* sp. می‌تواند آنزیم‌های لیتیک خارج سلولی (مانند بتا ۱،۳گلوکاناز و کیتیناز) تولید کنند. هر دو آنزیم مایکوپارازیتیسم گونه‌های *Trichoderm* spp. نقش مهمی در دفاع گیاه در برابر بیمارگرهای گیاهی دارند (Markovich & Kononova, 2003).

در مطالعه حاضر رشد سریع *T. longibrachiatum* در محیط کشت نشان داد که این قارچ به دلیل ظرفیت هاگ‌زایی بالا و قابلیت ساپروفیتی و رقابتی بالا بر علیه قارچ‌های بیماری‌زا، توانسته فضای بیشتری را در تشتک پتری اشغال کند. بنابراین، این توانایی، قارچ *T. longibrachiatum* را در رقابت با قارچ‌های بیماری‌زای مورد مطالعه بر سر فضا و غذا موفق‌تر عمل می‌کند (Altomare, 1999; Benitez, 2004). علاوه براین، *T. longibrachiatum* قادر به پیش‌برد منطقه مهار و پوشش پرگنه‌های قارچی بیماری‌زا و اعمال فعالیت پراکنده شدید و سریع در مکان‌های مختلف میسلیوم‌ها از جمله روی پرگنه‌های قارچی بیماری‌زا بود. این ویژگی فیزیولوژیکی مهمترین مرحله در فعالیت پارازیتیسم است (Brunner, 2005).

متابولیت‌های فرار *T. longibrachiatum* اثرات منفی بر رشد قارچ‌های بیماری‌زا دارد. اثرات بازدارندگی ترکیبات فرار آزاد شده از *T. saturnisporum*، *T. harzianum*، *T. viride* و *T. reesei* بر روی *C. capsici* توسط Tapwal & Pandey (2016)، Ng *et al.*, (2015) و Ajith & Lakshmidevi (2010) گزارش شده است، Gveroska & Ziberoski (2011) نیز اثرات مهاری گونه‌های *Trichoderma* sp. را روی *A. alternate* گزارش کردند.

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که ترکیبات فرار *T. longibrachiatum* به طور قابل توجهی میزان رشد و تولید میکرواسکلروتیوم در *M. phaseolina* را در طول زمان کاهش می‌دهد. نتایج این آزمایش با گزارش‌های قبلی مطابقت داشت. Jabnoun-Khiareddine, (2009) گزارش دادند که گونه‌های *Trichoderma* spp. تولید میکرواسکلروتیوم در قارچ *Verticillium* را مهار کرده و باعث ایجاد اثرات بازدارنده بر رشد هیف می‌شود. مطالعات همچنین نشان داده‌اند که برخی از گونه‌های تریکودرما، مانند *T. atroviride* و *T. asperellum*، می‌توانند تولید میکرواسکلروتیوم را مهار کنند و همچنین رشد هیف *Sclerotinia sclerotiorum* را کاهش دهند (Vinodkumar, 2017; Matroudi *et al.*, 2009). علاوه براین، گزارش‌های دیگر نشان داده‌اند که گونه‌های مختلف تریکودرما و حتی جدایه‌های مختلف آن‌ها طیفی از مواد فرار با اثرات متفاوت بر قارچ‌های متنوع تولید می‌کنند (Hajieghrari *et al.*, 2008). ترکیباتی مانند استالدئیدها، مشتقات ایزوسیانید، ترپن‌ها، آلفا پیرونین، هیدرازون، پیپرازین‌ها و پلی کتیدها، الکل‌ها، لاکتون‌ها و6-Pentyl-2 pyron به عنوان ترکیبات فرار تولید شده توسط گونه‌های مختلف تریکودرما معرفی شده‌اند (Sharma, 2019) .

در این مطالعه از روش کشت دوگانه برای غربالگری و ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی جدایه استرپتومایسس نیز در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. سیستم غربالگری باید با توجه به ویژگی‌های عامل بیماری‌زا و عامل کنترل زیستی طراحی شود. کشت دوگانه به طور کلی برای بررسی فعالیت آنتاگونیستی اکتینومیست‌ها در برابر قارچ‌های بیماری‌زا استفاده می‌شود. در این مطالعه اثرات مهاری *S. bacillaris* بر رشد قارچ *P. sojae* (اثر مهاری حدود ۸۹ درصد) و *M. phaseolina* (اثر مهاری حدود ۷۰ درصد) در کشت دوگانه تأثیر معنی‌داری داشت که نشان می‌دهد *S. bacillaris* دارای اثرات ضد قارچی مستقیم و قوی بر روی قارچ‌های بیماری‌زا است. اثرات ضد قارچی مستقیم *Streptomyces* sp. در مطالعات متعددی گزارش شده است (Boukaew, 2017; Shariffah- Muzaimah 2018). Shrivastava (2017) نشان دادند که *S. aureofaciens* K20 دارای فعالیت آنتاگونیستی علیه *M. phaseolina* در کشت دوگانه است. همچنین، مطالعات Arfaoui (2018) نشان میدهد که *Streptomyces* sp. جدا شده از ریزوسفر سویا دارای فعالیت آنتاگونیستی قابل توجهی بر روی رشد هیف *P. sojae* است. این فعالیت آنتاگونیستی استرپتومایسس می‌تواند به دلیل تولید متابولیت‌های ثانویه باشد که دارای فعالیت ضد میکروبی در برابر طیف وسیعی از بیمارگرهای گیاهی هستند (Shariffah-Muzaimah, 2018). فعالیت مهار زیستی جدایه استرپتومایسس مورد مطالعه می‌تواند ناشی از آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی بتا-۱،۴، بتا-۱،۶-گلوکاناز و همچنین کیتیناز باشد که در اکتینومیست‌ها تولید می‌شوند. این آنزیم‌ها نقش مهمی در تخریب دیواره سلولی دارند (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006;Valois, 1996).

از سوی دیگر، هیف‌های فیتوفترا حاوی گلوکان‌هایی هستند که به بتا-۳،۱ و بتا-۱،۶ غیر سلولزی متصل می‌باشند و گلوکان عمدتاً در زنجیره پیوند وجود دارد. علاوه بر سلولز، بتا-۱، ۴-گلوکان به صورت زنجیره‌های کوچک در قسمت‌هایی از گلوکان متصل می‌شود. ترکیب دیواره سلولی اوومیست‌ها باعث شده است که میسلیوم رویشی اکتینومیست‌ها با تولید آنزیم‌های تخریب کننده دیواره سلولی این قارچ‌ها را کلونیزه کند (El-Tarabily & Sivasithamparam, 2006). علاوه براین، کارهای El-Tarabily, (1996) نشان داد که کاربرد *Micromonospora carbonace* و *S. violascens* با لیز کردن هیف *P. cinnamomi* باعث کاهش آسیب و شدت بیماری پوسیدگی ریشه *P. cinnamomi* بر روی *Banksia grandis* در شرایط گلخانه می‌شود. آنها نشان داده‌اند که علت لیز میسلیوم *P. cinnamomi* به دلیل تولید سلولاز و گلوکزید از

Micromonospora carbonace بوده است. گزارش Valois (1996) نشان میدهد که جدایه *Nocardia* sp. دیواره سلولی *P. megasperma* را با تولید آنزیم‌های بتا-۳، ۱، بتا-۱، ۴، بتا-۱، ۶-گلوکاناز هیدرولیز کرده و از شدت بیماری می‌کاهد.

گونه های استرپتومایسس به عنوان یکی از منابع امیدوارکننده برای مهار زیستی بیماری‌های گیاهی شناخته شده‌اند. آنها مواد ضد قارچ و ضد باکتری فعال تولید می‌کنند. در این مطالعه مشاهده شد که ترکیبات فرار *S. bacillaris* دارای اثرات بازدارنده بر رشد هیف قارچ‌های بیماری‌زا گیاهی *M. phaseolina* و *P. sojae* می‌باشد. علاوه براین، مشاهده شد که ترکیبات فرار *S. bacillaris* تولید میکرواسکلروتی در *M. phaseolina* و رشد شعاعی *P. sojae* را متوقف کردند. همچنین، ترکیبات فرار ضد قارچی تولید می‌کند (Vaz Jauri, 2016). ترکیبات فرار آزاد شده از *Streptomyces S. globisporus* JK-1 قادر به کنترل *Penicillium italicum* در *Citrus microcarpa* و *B. cinerea* در میوه گوجه‌فرنگی بود (Li, 2012). همچنین *Streptomyces albulus* NJZJSA2 ترکیبات فراری تولید می‌کند که بر *F. oxysporum* و *S. sclerotiorum* تأثیر می‌گذارد (Wu, 2015).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که دو عامل کنترل زیستی *T. longibrachiatum* و *S. bacillaris* و ترکیبات فرار آنها در کنترل زیستی قارچ‌های بیماری‌زا *M. phaseolina* و *P. sojae* در شرایط آزمایشگاهی کارایی بالایی دارند. هر دو عامل کنترل زیستی مهار بیشتری را برروی *P. sojae* از خود نشان دادند. *T. longibrachiatum* و *S. bacillaris* می‌توانند رشد میسلیومی و میکرواسکلروتیوم تولیدی *M. phaseolina* را کاهش دهند. میکرواسکلروتی‌ها ساختارهای زنده‌ای هستند و سال‌ها در خاک باقی می‌مانند و نقش مهمی در چرخه بیماری دارند. مطالعات نشان داده‌اند که مهار جوانه‌زنی اندام‌های بقای قارچ می‌تواند چرخه بیماری را مختل کرده و از گیاه محافظت کند. *T. longibrachiatum* و*S. bacillaris* می‌توانند کاندیدهای خوبی برای کنترل *M. phaseolina* و به ویژه *P. sojae* در گیاه سویا باشند. تحقیقات بیشتر در این زمینه در شرایط گلخانه و مزرعه مورد نیاز است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی به خاطر حمایت مالی به شماره ۹۶/۳۱۶۵ تقدیر و تشکر می‌نمایند.

منابع

رضایی، ساسان و علیزاده، علی (۱۳۷۷) . بوته میری فیتوفترایی سویا ناشی از قارچ *Phytophthora sojae* در استان لرستان. *نشریه بیماریهای گیاهی*، ۳۴ (۴)، ۱۲۲- ۱۴۳.

میرزایی، سعید (۱۳۹۶). پروفایل ترانسکریپتوم نوک شاخه و ریشه گیاه سویا. *مجله پژوهشهای سلولی و مولکولی. مجله زیست شناسی ایران*، ۳۰ (۴)، ۴۰۹- ۴۲۱.

REFERENCES

Ajith, P.S., &Lakshmidevi, N. (2010). Effect of volatile and non-volatile compounds from *Trichoderma spp*. against Colletotrichumcapsiciincitant of anthracnose on bell peppers. *Nature and Science*. 8(9), 265– 269.

Al-Hazmi, A.S., &TariqJaveed, M. (2016). Effects of different inoculum densities of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* against *Meloidogynejavanica* on tomato. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(2), 288-292.

Altomare, C., Norvell, W.A., Bjbrkman, T., &Harman, GE, (1999). Solubilization ofphosphates and micronutrients by the plant growth promoting and biocontrol fungus*Trichoderma*

*harzianum*Rifai 1295–22. *Applied and Environmental Microbiology*. 65, 2926–2933.

Ambuse, M.G., Chatage, V.S., &Bhale, U.N., (2012). Influence of *Trichoderma* spp. against *Alternariatenuissima* inciting leaf spot of RumexAcetosa L. *Bioscience Discovery*. 3(2), 259–262.

Arfaoui, A., Adam, L.R., Bezzahou, A., &Daayf, F. (2018). Isolation and identification of cultivated bacteria associated with soybeans and their biocontrol activity against *Phytophthorasojae*.*Journal of the International Organization for Biological Control*, 1-11.

Atta, H.M., El-Sayed, A.S., El-Desoukey, M.A., Hassan, M, &El-Gazar, M. (2015). Biochemical studies on the Natamycin antibiotic produced by *Streptomyces*lydicus: Fermentation, extraction and biological activities. *Journal of Saudi Chemical Society*, *19*(4), 360-371.

Baltz, R.H. (2016) Genetic manipulation of secondary metabolite biosynthesis for improved production in Streptomyces and other *Actinomycetes*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 43(2-3), 343-370.

Benítez, T., Rincón, A.M., Limón, M.C., &Codón, A.C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Journal* of *Microbiology*. 7(4):249-60.

Bibb, M.J., Hopwood, D.A., Chater, K.F., Kieser, T., Bruton, C., Kieser, H.M., Lydiate, D.L., Smith, CP., Ward, J.M., Schremp, f. H. (1985). Genetic manipulation of *Streptomyces*: a laboratory manual. *The John Innes Foundation*, Norwich, United Kingdom.

Boukaew, S., Prasertsan, P., Troulet, C., &Bardin, M. (2017). Biological control of tomato gray mold caused by *Botrytis cinerea* by using *Streptomyces* spp. *Journal of the International Organization for Biological Control*, 62(6), 793-803.

Brotman, Y., Lisec, J., Méret, M., Chet, I., Willmitzer, L., &Viterbo, A. (2012). Transcript and metabolite analysis of the *Trichoderma*-induced systemic resistance response to Pseudomonas syringae in *Arabidopsis thaliana*. *Microbiology*, *158*(1), 139-146.

Brunner, K., Zeilinger, S., Ciliento, R., Woo, S.L, Lorito, M., Kubicek, C.P, &Mach, R.L. (2005). Improvement of the fungal biocontrol agent *Trichoderma*atroviride to enhance both antagonism and induction of plant systemic disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 3959–3965.

Chen, Y., Zhou, D., Qi, D., Gao, Z., Xie, J., &Luo, Y. (2018). Growth Promotion and Disease Suppression Ability of a *Streptomyces* sp. CB-75 from Banana Rhizosphere Soil. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2704.

Chen, Y.Y, Chen, P.C., &Tsay, T.T. (2016). The biocontrol efficacy and antibiotic activity of *Streptomyces plicatus* on the oomycete *Phytophthoracapsici*.*Journal of the International Organization for Biological Control*, *98*, 34-42.

Choudhary, S., &Reena, M. (2012). In-vitro antagonism of indigenous Trichoderma isolates against phytopathogen causing wilt of lentil. *International Journal of Life Science and Pharma Research.* 2(3), 195–202.

Cook, G.E., Boosalis, M.G., Duncle, L.D., &Odvody GN. (1973). Survival of *Macrophominaphaseolina*in corn and sorghum stalk residue. *Plant Disease* 57: 873-875.

Dennis, C., &Webster, J. (1971). Antagonistic properties of species-groups of Trichoderma: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*,57(1), 41-48.

Dubey, S.C., Tripathi, A., Dureja, P., &Grover, A. (2011). Characterization of secondary metabolites and enzymes produced by *Trichoderma* species and their efficacy against plant pathogenic fungi. *Indian Journal of Agricultural Sciences.* 81(5):455–461.

Elad, Y., Chet, I., &Henis, Y. (1981). A selective medium for improving quantitative isolation of *Trichoderma* spp. from soil. *Phytoparasitica*, 9(1), 59-67.

El-Tarabily, KA &Sivasithamparam K. (2006). Non-streptomyceteactinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters, *Soil Biology and Biochemistry*, 38(7): 1505-1520.

El-Tarabily, K.A., Nassar, A.H., Hardy, G.E.S.J., &Sivasithamparam, K. (2009). Plant growth promotion and biological control of *Pythium aphanidermatum*, a pathogen of cucumber, by endophytic actinomycetes. *Journal of Appl Microbiol*ogy, 106(1):13–26.

El-Tarabily, K.A., Sykes, M.L., Kurtboke, I.D., Hardy, G.E.S.J., Barbosa, A.M. (1996). Synergistic effects of a cellulase-producing Micromonosporacarbonacea and an antibiotic- producing Streptomyces violascens on the suppression of *Phytophthoracinnamomi* root-rot of Banksia grandis. *Canadian Journal of Botany* 74, 618–624.

Erwin, D.C., &Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora*Diseases Worldwide**.** APS Press, St. Paul, M N.

EYE, L.L., Sneh, R., Lockwood, J.L. (1978) Factors affecting zoospore production by *Phytophthoramegasperma var. sojae*. *Phytopathology*68: 1766-68.

FAO. (2019). The State of Food and Agriculture.FAO, Rome.https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo).

Feng, J., Hwang, R., Chang, K.F, Hwang, S.F., Strelkov, S.E., Gossen, B.D., &Zhou Q. (2010). An inexpensive method for extraction of genomic DNA from fungal mycelia. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 32(3), 396-401.

Gams, W., &Bissett, J. (1998). Morphology and Identification of *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE (Eds) *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. *Basic Biology, Taxonomy and Genetics*. Taylor and Francis Ltd, London, 3–34.

Gujar, C.P., Jain, S.C., &Mali, B.L. (2014). Pathogenic effects of root rot fungi on seed germination of soybean. *Journal of Plant Disease Sciences*, 9(1), 20-23.

Gupta, G.K., Sharma, S.K., &Ramteke, R. (2012). Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophominaphaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (Glycine max (L.) Merrill). *Journal of Phytopathology*, *160*(4), 167-80.

Gveroska, B., &Ziberoski, J. (2011). Trichoderma harzianum as a biocontrol against *Alternariaalternata* on tobacco. *Environmental Technology & Innovation.* 7(2):67–76.

Hajieghrari, B, Torabi-Giglou, M., Momammadi, M., &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.

He, D.C., He, M.H., Amalin, D.M., Liu, W., Alvindia, D.G, &Zhan, J. (2021). Biological Control of Plant Diseases: *An Evolutionary and Eco-Economic Consideration.Pathogens*, 10(10), 1311.

Herath, H.H.M.A.U., Wijesundera, R.L.C, Chandrasekharan, N.V., Wijesundera, W.S.S., &Kathriarachchi, H.S. (2015). Isolation and characterization ofTrichoderma erinaceum for antagonistic activity against plant pathogenic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. (5), 120-127.

Hermosa, R., Cardoza, R.E., Rubio, M.B., Gutiérrez, S., &Monte, E. (2014). Secondary metabolism and antimicrobial metabolites of *Trichoderma*. *Biotechnology and biology of trichoderma*, 125-137.

Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., &Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. *Microbiology.* 158, 17–25.

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.

Jabnoun-Khiareddine, H., Daami-Ramadi, M., Ayed, F., &Mahjoub, M.E. (2009). Biological control of tomato Verticillium wilt by using indigenous Trichoderma spp. *The African Journal of Plant Science and Biotechnology*. 3, 26–36.

Kaewchai, S., Soytong, K., &Hyde, K.D. (2010). Mycofungicides and fungal biofertilizers. *Fungal Diversity*, 38, 25-50.

Kaufmann, M.J., &Gerdemann, W. (1958). Root and stem rot of soybean caused by *Phytophthorasojae*n.sp. *Phytopatho*logy, 48,201-208.

Kreuze, J.F., Suomalainen, S., Paulin, L., &Valkonen, J.P. (1999). Phylogenetic analysis of 16S rRNA genes and PCR analysis of the nec1 gene from *Streptomyces* spp. causing common scab, pitted scab, and netted scab in Finland. *Phytopathology*, 89(6), 462-469.

Lane, D.J. (1991) 16S/23S rRNA Sequencing. In: Stackebrandt, E. and Goodfellow, M., Eds., Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematic, John Wiley and Sons, New York, 115-175.

Li, Q., Ning, P., Zheng, L., &Huang, J. (2012). Effects of volatile substances of Streptomyces

globisporus JK-1 on control of Botrytis cinerea on tomato fruit. *Biological Control*. 61, 113–120.

Manhas, R.K., &Kaur, T. (2016). Biocontrol potential of Streptomyces hydrogenans strain DH16 toward *Alternariabrassicicola* to control damping off and black leaf spot of Raphanussativus. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1- 13.

Markovich, N.A., &Kononova, G.L. (2003). Lytic enzymes of Trichoderma and their role in plant defense from fungal diseases: a review. *Applied of Biochemistry of Microbiology*. 39, 341-351.

Martínez-Medina, A., Roldán, A., Pascual, J.A. (2011). Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: growth response and Fusarium wilt biocontrol. *Applied Soil Ecology*. 47, 98–105.

Matroudi, S., Zamani, M.R., &Motallebi, M. (2009). Antagonistic effects of three species of *Trichoderma* sp. on *Sclerotiniasclerotiorum*, the causal agent of canola stem rot. *Egyptian Journal of Biology*, 11, 37-44.

Mendoza, J.L.H., Pérez, M.I.S., Prieto, J.M.G., Velásquez, J.D.Q, Olivares, J.G.G &Langarica, H.R.G. (2015). Antibiosis of *Trichoderma*spp strains native to northeastern Mexico against the pathogenic fungus *Macrophominaphaseolina*. *Brazilian Journal of Microbiology*, *46*(4), 1093-1101.

Mirzaei, S. (2018). Transcriptome profiling of shoot and root tip of soybean, *Molecular and Cellular Researches*, 30(4), 409-421 (In Persian).

Mohammadi, A., Alizadeh, A., MIrabolfathy, M., &Safaie, N. (2007). Change in Racial Composition of *Phytophthorasojae* in Iran between 1998 and 2005. *Journal of Plant Protection Research*. 47 (1), 30-34.

Monteiro, V., Silva, R.N., Steindorff, A., Costa, F., &Noronha, E. *(*2010). New insightsin; *Trichoderma harzianum* antagonism of fungal plant pathogens bysecreted protein analysis. *Current Microbiology*. 61, 298–305.

Mukhopadhyay, R., &Kumar, D. (2020). *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*.30, 133.

Ng, L.C., Ngadin, A., Azhari, M., &Zahari, N.A. (2015). Potential of *Trichoderma* spp. as biological control agents against Bakanae pathogen (*Fusarium fujikuroi*) in rice. *Asian Journal of Plant Pathology*. 9(2):46–58.

Prasad, B.N., &Kumar, M.R. (2011). Comparative efficacy of different isolates of Trichoderma spp. against *Rhizoctoniasolani*, incitant of sheath blight of rice. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*. 1(3),107–111.

Qualhato, T.F., Lopes, F.A.C., Steindorff, A.S., Brandao, R.S., Jesuino, R.S.D., &Ulhoa, C.j. (2013). Mycoparasitism studies of T*richoderma* species against three phytopathogenic fungi: evaluation of antagonism and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*. 35(9), 1461-1468.

Rahman, M.A., Razvy, M.A., &Alam, M.F. (2013). Antagonistic activities of *Trichoderma* strains against chili anthracnose pathogen. *International Journal of Microbiology and Mycology*. 1(1), 7–22.

Ramezani, M., Shier, W.T., Abbas, H.K., Tonos, J.L., Baird, R.E., &Sciumbato, G.L. (2007). Soybean charcoal rot disease fungus *Macrophominaphaseolina* in Mississippi produces the phytotoxin (−)-botryodiplodin but no detectable phaseolinone. *Journal of Natural Products*, *70*(1), 128-129.

Rezaei, S., &Alizadeh, A. (1998). Soybean damping off due to *Phytophthorasojae* in Lorestan province. *Journal of Plant Diseases*. 34:122- 143 (In Persian).

Sadeghi-Garmaroodi, H., MIrabolfathy, M., Babai, H., &Zeinali, H. (2007). Physiological races of *Phytophthorasojae*in Iran and race–specific reactions of some soybean cultivars. *Journal Agriculture Science Technology*. 9: 243-249.

Sadeghy, B., Salari, M., ShahidiBonjar, G.H, Panjekeh, N., &Aminnaee, M. (2014). A preliminary study of biological control of citrus gummosis by soil-borne *Streptomyces* sp. isolates in vitro

condition. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(7), 774-779.

Schmitthenner, A.F. (1999). Phytophthora Rot of Soybean. *American Phytopathological Society Press, St. Paul*, pp. 39-42.

Schmitthenner, A.F., &van doren, D.M. (1985). Integrated Control of root rot of soybean caused by *Phytophthoramegaspermaf*.sp. *glycinea*. *In*: A.D. Rovira, K.J. Moore, P. T. Wong, W., and J. FKollmorgen (Eds.), *Ecology and Management of Soil borne Plant Pathogens***.** *American Phytopathological Society Press*, St., Paul.

Shahzad. S., Rajput, A.Q., &Khanzada, M.A. (2018). Effect of different organic substrates and carbon and nitrogen sources on growth and shelf life of *trichodermaharzianum*. *Journal Agriculture Science and Technology*. 16: 731-745.

Shariffah-Muzaimah, S.A., Idris, A.S., Madihah, A.Z., Dzolkhifli, O., Kamaruzzaman, S., &Maizatul-Suriza, M. (2018). Characterization of *Streptomyces* spp. isolated from the rhizosphere of oil palm and evaluation of their ability to suppress basal stem rot disease in oil palm seedlings when applied as powder formulations in a glasshouse trial. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 34(1), 15.18- 34.

Sharma, S., Kour, D., Rana, K.L., Dhiman, A., &Thakur, S. (2019). *Trichoderma*: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications. In *Recent Advancement in White Biotechnology through Fungi*. 85-120.

Sharma, M. (2014). *Actinomycetes*: source, identification, and their applications. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences.* 3(2), 801-32.

Shrivastava, P., Kumar, R., &Yandigeri, M.S. (2017). In vitro biocontrol activity of halotolerant Streptomyces aureofaciens K20: a potent antagonist against *Macrophominaphaseolina* (Tassi) Goid. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 24(1), 192-199.

Sinclair, J.B., &Backman, P.A. (1989). Compendium of Soybean Disease. Third edition. *APS Press, American Phytopathological Society*, 106 pp.

Steindorff, A., Ramada, M.H., Coelho, A.S., Miller, R.N., &Pappas, G. (2014). Identification of mycoparasitism-related genes against the phytopathogen*Sclerotiniasclerotiorum* through transcriptome and expression profile analysis in *Trichoderma harzianum*. *BMC Genomics.* 15, 204- 217.

Stirling, G.R. (2017). Biological control of plant-parasitic nematodes. In Diseases of nematodes. *CRC Press*: 103-150.

Tapwal, A., &Pandey, H. (2016). In vitro evaluation of *Trichoderma* species for virulence efficacy on *Botryodiplodiapalmarum. Current Life Sciences*. (2), 86–91.

Tapwal, A., Singh, U., Singh, G., Garg, S., & Kumar, R. (2011). *In vitro* antagonism of *Trichoderma viride* against five phytopathogens. *Pest Technology*. 5(1), 59–62.

Tchameni, S.N., Sameza, M.L., O'donovan, A., Fokom, R., &MangaptcheNgonkeu, E.L. (2017). Antagonism of *Trichoderma asperellum* against *Phytophthoramegakarya* and its potential to promote cacao growth and induce biochemical defence. *Mycology*, *8*(2), 84-92.

Valois, D., Fayad, K., Barasubiye, T., Garon, M., &Brzezinski, R. (1996). Glucanolytic*Actinomycetes* antagonistic to *Phytophthorafragariae* var. rubi, the causal agent of raspberry root rot. *Applied and Environmental Microbiology*. 62(5), 1630–1635.

VazJauri, P., Altier, N., &Kinkel, L.L. (2016). Streptomyces for sustainability. In: Castro-Sowinski S (ed) *Microbial models: from environment to industrial sustainability, microorganism for sustainability (Book)*. 251–276.

Verma, V.C., Singh, S.K., &Prakash, S. (2011). Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from Azadirachtaindica A. Juss. *Journal of Basic Microbiology*, *51*(5), 550-556.

Vieira, P.M., Coelho, AS., Steindorff, A.S., de Siqueira, S.J., &Silva, R.N. (2013). Identification of differentially expressed genes from *Trichoderma harzianum* during growth on cell wall of *Fusarium solani* as a tool for biotechnological application. *BMC Genomics* (14), 177e187.

Vinodkumar, S., Indumathi, T., &Nakkeeran, S. (2017). *Trichoderma asperellum* (NVTA2) as a

potential antagonist for the management of stem rot in carnation under protected cultivation. *Biological Control*, (113), 58-64.

Vitti, A., Pellegrini, E., Nali, C., Lovell, i S., &Sofo, A. (2016). *Trichoderma harzianum* T-22 induces systemic resistance in tomato infected by Cucumber mosaic virus. *Frontiers in Plant Science*, *(7)*, 1520.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., &Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. eds. by MA Innis, DH Gelfand, JJ Sninsky and TJ White, In: *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. 315-322.

Woo, S.L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G., &Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based Products and their Widespread Use in Agriculture. *The OpenMycology Journal*, 8, 71-126.

Wu, Y., Yuan, J., Yaoyao, E., Raza, W., Shen, Q., &Huan, Q .(2015). Effects of volatile organic compounds from *Streptomyces albulus* NJZJSA2 on growth of two fungal pathogens. *Journal of Basic Microbiolg*. (55), 1104–1117.

Xiao, K., Kinkel, L.L., Samac, D.A. (2002). Biological control of *Phytophthora* root rots on alfalfa and soybean with *Streptomyces*. *Biological Contr*ol. 23(3), 285–295.

Yuan, S., Li, M., Fang, Z., Liu, Y., Shi, W., Pan, B., &Shen, Q. (2016). Biological control of tobacco bacterial wilt using *Trichoderma harzianum* amended bioorganic fertilizer and the arbuscular mycorrhizal fungi *Glomus mosseae*. *Biological Control*, (92), 164-171.