

کنترل بیولوژیک *Sclerotinia sclerotiorum* (عامل بیماری کپک سفید سیبزمینی) توسط گونه‌های مختلف *Coniothyrium minitans* و *Trichoderma*

سید محمدرضا اجاقیان^۱، دوستمراد ظفری^{۱*} و غلام خداکرمیان^۱

تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۱۰

تاریخ پذیرش: ۸۷/۹/۲۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

*مسئول مکاتبه
E-mail: zafari_d@yahoo.com

چکیده

با شیوع خشکیدگی ساقه و مرگ زودهنگام بوته‌های سیبزمینی در سطح وسیعی از مزارع استان همدان، به جداسازی و شناسایی عامل این بیماری اقدام شد. در نتیجه، عامل بیماری به عنوان *Sclerotinia sclerotiorum* شناسایی گردید. با توجه به خسارت این بیماری و عدم کنترل آسان آن توسط روش‌های زراعی و شیمیایی، اثر بیوکنترلی پنج گونه تریکودرما شامل *T. ceramicum*، *T. koningii*، *T. koningiopsis*، *T. virens* و *T. viridescens* و یک جدایه از گونه *Coniothyrium minitans* روی عامل بیماری بررسی شد. همه عوامل بیوکنترلی مذکور، با درجات مختلف باعث کنترل این بیمارگر در شرایط آزمایشگاه شدند، به طوری که در بررسی تاثیر ترکیبات فرار در رشد میسلومی بیمارگر، بیشترین درصد بازدارندگی به میزان ۵۶٪ مربوط به *T. koningiopsis* و در بررسی تاثیر ترکیبات خارج سلولی در غلظت‌های ۳۰ و ۱۵ درصد، بیشترین درصد بازدارندگی بر رشد میسلوم بیمارگر مربوط به *T. ceramicum* به ترتیب به میزان ۶۹ و ۵۳ درصد بود. *T. koningiopsis* و *T. viridescens* و *T. ceramicum* در کشت متقابل به طور کامل از تشکیل سختینه‌ها جلوگیری کردند و روی میسلوم بیمارگر مستقر شده و تولید اسپور نمودند. همچنین در بررسی اثر سوسپانسیون اسپور عوامل بیوکنترل مذکور بر جوانه‌زنی میسلوژنیک سختینه‌ها، بیشترین درصد کاهش جوانه‌زنی در تیمار با *T. ceramicum* و *T. koningiopsis* و حداقل تاثیر در تیمار *T. virens* و *C. minitans* مشاهده گردید. *T. ceramicum* و *T. koningiopsis* گونه‌هایی از تریکودرما هستند که به تازگی معرفی شده‌اند و این تحقیق اولین بررسی اثر بیوکنترلی آن‌ها روی بیمارگرهای گیاهی در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، سیبزمینی، کنترل بیولوژیک، *Coniothyrium minitans*

Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* the Causal Agent of Potato White Mold by Different *Trichoderma* spp. and *Coniothyrium minitans*

SMR Ojaghian¹, D Zafari*¹ and G Khodakaramian¹

Received: 10 April 2008 Accepted: 21 September 2009

¹MSc Student and Associate Profs of Plant Protection of Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

*Corresponding author: E-mail:zafari_d@yahoo.com

Abstract

The identity of outbreak of stem drying and early death on potato in vast area of potato fields of Hamedan province was studied. As a result, the causal agent of the disease was isolated and identified as *Sclerotinia sclerotiorum*. Considering the serious damage of this pathogen that can not be easily controlled by cultural and chemical control methods, alternative approaches such as biocontrol method using five species of *Trichoderma* including *T. ceramicum*, *T. koningii*, *T. koningiopsis*, *T. virens*, *T. viridescens* and one isolate of *Coniothyrium minitans* were evaluated against this pathogen. All mentioned biocontrol agents caused some control on the pathogen *in vitro*. In assessment of the effect of volatile metabolites on pathogen growth rate, the most inhibition percent was realized about *T. koningiopsis* with 56% and in case of extracellular compounds, the most inhibition percent in concentrations of 15 and 30% were showed *T. ceramicum* as 69% and 53%, respectively. In dual culture, *T. koningiopsis*, *T. viridescens* and *T. ceramicum* prevented sclerotia formation as such. They also grew and sporulated on the pathogen mycelia. In assessment of the affect of spore suspension of the biological agents on myceliogenic germination of sclerotia, the most inhibition was observed in *T. ceramicum* and *T. koningiopsis* and the less inhibition was in *T. virens* and *Coniothyrium minitans*. *T. ceramicum*, *T. koningiopsis* and *T. viridescens* are recently described *Trichoderma* spp. and this study is the first assessment of their biocontrol effect on plant diseases in Iran.

Keywords: Biological control, *Coniothyrium minitans*, Potato, *Trichoderma*

گلخانه‌ای و علف‌های هرز حمله کند (پوردی ۱۹۷۹). اغلب این میزبان‌ها دولپه‌ای بوده گرچه تعداد کمی از تک‌لپه‌ای‌ها نیز در گروه میزبان‌های این بیمارگر قرار می‌گیرند (بلند و هال ۱۹۹۴). یکی از میزبان‌های مهم این بیمارگر سیب‌زمینی است. علائم این بیمارگر بعد از مرحله بسته شدن ردیف‌ها توسط بوته‌های مجاور ظاهر

مقدمه

کپک سفید نام عمومی بیماری ناشی از *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary می‌باشد (هوکر ۱۹۹۰). این قارچ تک‌چرخه‌ای، هموتال و نکروتروف بوده و محدودیت میزبانی و جغرافیایی ندارد و می‌تواند به بیش از ۴۰۰ گونه از گیاهان زراعی، باغی،

(کارووارا ۱۹۶۰)، *Penicillium spp.*، *Mucor spp.* و *Sporodesmium sclerotivorum* (آدامز ۱۹۹۰) اشاره کرد. در رابطه با این بیماری تک چرخه ای، کاهش اینوکولوم اولیه (آسکوسپورها) می تواند منجر به کاهش بیماری شود و این امر تنها با کاهش سختینه ها از طریق عوامل بیوکنترل امکان پذیر است. با توجه به خسارت قابل توجه بیماری کپک سفید در مزارع سیب زمینی استان همدان و جداسازی و شناسایی میکوپارازیت سختینه ها *Coniothyrium minitans* و نیز وجود تعداد زیادی از گونه های تعیین توالی شده تریکودرما در آزمایشگاه بیماری شناسی گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، در این تحقیق اثرات بازدارندگی این عوامل بیوکنترل روی قارچ *S. sclerotiorum* مورد بررسی قرار گرفت.

روش های بررسی

نمونه برداری و جداسازی *S. sclerotiorum*

در شهریور ماه دو سال متمادی ۱۳۸۵ و ۱۳۸۶ اقدام به نمونه برداری از مزارع سیب زمینی آلوده استان همدان گردید و تعداد ۳۵ سختینه از خاک و بافت های آلوده ۱۲ مزرعه مختلف سیب زمینی جمع آوری گردید. سختینه ها با محلول هیپوکلریت ۵٪ به مدت ۲-۱ دقیقه ضد عفونی و دوبار در آب مقطر استریل (هر بار به مدت دو دقیقه) شستشو و بر روی محیط پی دی ای^۱ قرار داده شدند. سختینه هایی که بر روی محیط مذکور رشد نکردند، دو نیم شدند و به داخل بافت هویج بریده شده تازه منتقل و در داخل یک اتاقک مرطوب قرار گرفتند. تعدادی از آنها بعد از ۷-۴ روز تولید میسلیم کردند. در نهایت ۲۱ جدایه از این بیمارگر به دست آمد. جدایه SS4-4 به علت تولید علایم شدیدتر در مزرعه و نیز تولید سختینه بیشتر در بافت هویج، جهت کارهای آزمایشگاهی و گلخانه ای انتخاب شد.

می گردد (آتالا و جانسون ۲۰۰۴). چون بافت های آلوده و سختینه ها در قسمت های پایین بوته های همپوشانی شده قرار می گیرند و این پدیده در اواخر فصل زراعی رخ می دهد، لذا اغلب از دید مخفی می ماند. از آنجا که قسمت اصلی غده بندی بوته های سیب زمینی در اواخر فصل زراعی انجام می شود، مدیریت بیماری کپک سفید می تواند باعث افزایش عملکرد این محصول شود و با توجه به اینکه این بیمارگر محدودیت میزبانی ندارد، کنترل بیماری کپک سفید در سیب زمینی می تواند باعث جلوگیری از شیوع این بیماری در میزبان های حساس مجاور شود (ونت ۱۹۹۸). در رابطه با سیب زمینی مشخص شده است که جوانه زنی کارپوژنیک سختینه ها باعث تولید بیماری می شود و در واقع آسکوسپورها منبع اصلی آلودگی سیب زمینی هستند (آتالا و جانسون ۲۰۰۴). به علت عمر زیاد سختینه ها و دامنه میزبانی زیاد، تناوب زراعی راهکار مدیریتی مناسبی به نظر نمی رسد. همچنین قارچ کش موثری علیه سختینه ها وجود ندارد و از طرف دیگر چون سختینه ها علاوه بر سطح خاک در داخل خاک نیز وجود دارند لذا استفاده از سموم علیه سختینه ها غیر ممکن است (تو ۱۹۸۶). کاربرد تدخین و آفتاب دهی نیز در سطوح وسیع دشوار و غیر اقتصادی به نظر می رسد. این در حالی است که هیچ رقم کاملاً مقاومی در سیب زمینی علیه کپک سفید شناسایی نشده است (آتالا و جانسون ۲۰۰۴). با توجه به مطالب مذکور، کنترل بیولوژیکی این بیماری در کنار سایر روش های مدیریتی، امری اجتناب ناپذیر می باشد. تاکنون قارچ های بیوکنترلی متعددی برای این منظور معرفی و استفاده شده است که از جمله آنها می توان به *Trichoderma virens* (تو ۱۹۸۰)، *Clonostachys rosea* (ارویو و همکاران ۱۹۶۴)، *Coniothyrium minitans* (هوآنگ و هوز ۱۹۷۶)، *Trichoderma harzianum*، *T. viride*، *T. koningii* و *T. pseudokoningii* (دوسانتوس و دینگرا ۱۹۸۲)، *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson

¹PDA

تهیه عوامل بیوکترل

تشتک پتری حاوی پی دی ای تلقیح و در شرایط آزمایشگاه (دمای ۲۶-۲۳ درجه سانتی گراد و نور طبیعی و فلورسنت) نگهداری شد. بعد از ۲۴ ساعت، منتهی الیه رشد پرگنه بیمارگر علامت گذاری شد و حلقه میسلیمی از عوامل بیوکترل در طرف دیگر تشتک پتری قرار داده شد. برای هر عامل بیوکترل سه تکرار در نظر گرفته شد و در پتری شاهد، بجای عامل بیوکترل از یک دیسک پی دی ای استفاده گردید. در این آزمایش، توانایی استقرار عوامل بیوکترل روی هیف بیمارگر و تولید اسپور، ایجاد هاله بازدارنده و پیچیدگی هیف های عوامل بیوکترل به دور هیف بیمارگر و جلوگیری از تولید سختینه در بیمارگر، در دو، سه، هفت و ۱۵ روز پس از تلقیح عوامل بیوکترل مورد بررسی قرار گرفت.

ب- تاثیر ترکیبات فرار عوامل بیوکترل در بازدارندگی رشد میسلومی بیمارگر

این آزمایش در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. در این آزمایش، حلقه های میسلومی پنج میلی متری از حاشیه پرگنه چهار روزه قارچ بیمارگر به مرکزپتری های هم اندازه (با قطر نه سانتی متر) تلقیح و در شرایط آزمایشگاه (دمای 23 ± 3 درجه سانتی گراد) نگه داری شدند. از حاشیه پرگنه عوامل بیوکترل نیز دیسک هایی به قطر پنج میلی متر به وسط پتری هایی به قطر نه سانتی متر تلقیح و در شرایط آزمایشگاه قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، منتهی الیه رشد پرگنه بیمارگر علامت گذاری شد. در شرایط سترون، تشتک- های پتری حاوی تریکودرما و بیمارگر روی هم گذاشته و جهت جلوگیری از آلودگی آنها، بلافاصله محل انطباق دو تشتک پتری با سلفوفان مسدود شد. این پتری ها در شرایط آزمایشگاه و روی میز نگهداری شدند، به طوری که تشتک پتری حاوی عامل بیوکترل در کف قرار گرفت. در پتری شاهد، بجای عامل بیوکترل از یک حلقه پی دی ای استفاده گردید. بعد از ۴۸ ساعت، درصد

در این تحقیق، پنج جدایه تریکودرما شامل گونه های *T. T. koningiopsis*, *T. virens* و *T. koningii .ceramicum* از گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا تهیه گردید. این جدایه ها قبلاً به طور دقیق با استفاده از ویژگی های مورفولوژیکی و تعیین توالی نواحی ITS1 و ITS2 و ژن 5.8s از rDNA ژنومی شناسایی شده بودند. همچنین *Coniothyrium minitans*، میکوپارازیت معروف سختینه ها نیز از یک سختینه جداسازی و بعد از انجام تست بیوکترلی و شناسایی دقیق مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه سختینه و اینوکولوم از عوامل بیوکترل در شرایط آزمایشگاه

تهیه اینوکولوم به روش جونز و همکاران (۲۰۰۳)، انجام شد. برای این منظور ۵۰ گرم گندم در یک ارلن نیم لیتری ریخته شد و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد سترون شد. دیسک های پنج میلی متری از حاشیه پرگنه چهار روزه قارچ عامل بیماری و قارچ های بیوکترل، جهت تلقیح این محیط مورد استفاده قرار گرفت. سختینه ها بعد از ۲-۳ هفته تولید و از بافت های گندم جدا شدند و در معرض هوا خشک گردیدند. عوامل بیوکترلی نیز بعد از دو هفته از ارلن خارج و در معرض هوا خشک شده و در یخچال نگهداری شدند.

بررسی خواص عوامل بیوکترل روی عامل کپک سفید در شرایط آزمایشگاه

الف- کشت متقابل

در کشت متقابل، حلقه های پنج میلی متری از حاشیه پرگنه چهار روزه قارچ بیمارگر در یک طرف

داخل هر یک از ارلن های محتوی پی دی بی انداخته شد و در داخل شیکر چرخان در دمای ۲۴ - ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. شیکر روی ۱۲۰ دور در دقیقه تنظیم گردید. پس از ۱۵ روز محتویات ارلن ها با میلی پور و پمپ خلاء و با استفاده از میکروفیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر عصاره گیری شدند. فیلتراسیون و جمع آوری عصاره کاملاً در شرایط سترون و با میلی پور و ارلن های سترون شده انجام شد.

تعداد ۱۲ ارلن هر یک حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت ربع قدرت پی دی ای با ۲۵ درصد آگار اضافی در اتوکلاو سترون شدند. پس از سرد شدن و رسیدن به دمای ۵۰ - ۴۵ درجه سانتی گراد، ۱۵ میلی لیتر از عصاره فیلتر شده شش گونه عامل بیوکنترل (شامل پنج جدایه تریکودرما و یک جدایه *C. minitans*) به شش ارلن اضافه و به هم زده شد و محتویات هر ارلن در سه پتری تقسیم و نام جدایه مربوط بر روی آن ثبت شد. در شش ارلن بعدی بجای ۱۵ میلی لیتر، ۷/۵ میلی لیتر از عصاره فیلتر شده عوامل بیوکنترل به آن ها اضافه شد (بنابراین محیط های حاوی ۳۰٪ و ۱۵٪ از عصاره عوامل بیوکنترل تهیه گردید). در شرایط سترون (داخل هود سترون) از حاشیه در حال رشد پرگنه سه روزه بیمارگر، حلقه های میسلومی با قطر پنج میلی متر بوسیله چوب پنبه سوراخ کن تهیه شد و یک حلقه میسلومی در مرکز هر پتری از پتری های فوق الذکر تلقیح و در شرایط آزمایشگاه (دمای ۲۴±۳ درجه سانتی گراد و نور طبیعی و فلورسنت) نگهداری شدند. رشد شعاعی پرگنه بیمارگر در ۴۸ ساعت بعد در تمام تیمارها اندازه گیری و ثبت شد.

این آزمایشات در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار برای هر عامل بیوکنترل، انجام و مورد ارزیابی قرار گرفت. درصدهای بازدارندگی برای تکرارهای هر تیمار به وسیله نرم افزار SAS در سطح ۰/۰۱ آزمون دانکن تجزیه و تحلیل و محاسبه گردید. لازم به ذکر است که درصدهای بازدارندگی بر اساس

بازدارندگی از رشد میسلوم بیمارگر توسط فرمول زیر محاسبه گردید و در نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

۱) (رشد قارچ در تیمار - رشد قارچ در شاهد) = درصد بازدارندگی

۱۰۰ × رشد قارچ در شاهد

پتری های جفت شده به مدت ۱۵ روز دیگر در دمای ۳ ± ۲۳ درجه سانتی گراد روی میز آزمایشگاه نگهداری شدند تا تاثیر این مواد فرار در تشکیل سختینه ها نیز ظاهر و بررسی شود. لازم به ذکر است که در مقایسه سختینه ها، تعداد آن ها در هر دو پتری معیار مقایسه تیمارها با همدیگر و با شاهد قرار گرفت چون در شاهد، بسیاری از سختینه ها در محل اتصال دو پتری به وجود آمدند.

ج- تاثیر مواد خارج سلولی عوامل بیوکنترل در بازدارندگی رشد میسلومی عامل کپک سفید

جهت بررسی مواد خارج سلولی عوامل بیوکنترل، جدایه های این عوامل به محیط کشت مایع سیب زمینی - دکستروز تلقیح شدند. محیط کشت مذکور به روش زیر تهیه گردید:

۲۰۰ گرم سیب زمینی پوست کنده و قطعه قطعه شده در یک بشر حاوی نیم لیتر آب مقطر به مدت ۲۵ دقیقه جوشانده شد. سپس سیب زمینی پخته شده با آب همراه آن در پارچه ملامل عصاره گیری شد. سپس به این محلول ۲۰ گرم دکستروز اضافه و حجم آن با آب مقطر استریل به یک لیتر رسانده شد. در هر ارلن ۲۵۰ میلی لیتری ۱۰۰ میلی لیتر از این محلول ریخته شد و ارلن ها در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ بار به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند.

چهار حلقه میسلومی با قطر یک سانتی متر از حاشیه در حال رشد جدایه های عوامل بیوکنترل به

سوسپانسیون اسپور *C. minitans*، جهت اطمینان از خلوص و تازگی اسپورها بجای اینوکولوم تهیه شده روی گندم از محیط کشت‌های ۴۵ روزه این قارچ استفاده شد. برای این منظور، نخست مقدار ۱۵-۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون روی محیط کشت ریخته و با یک کاردک (ضد عفونی شده با الکل) کل پرگنه قارچ را بصورت تکه تکه از محیط کشت جدا و همراه با آب موجود در آن پتری، در پتری دیگر ریخته شد. سپس مقدار پنج میلی لیتر آب مقطر سترون دیگر در پتری دوم ریخته شد و با همان کاردک، کل محتویات پتری کاملاً کوبیده شد. از آنجا که دیواره پیکنیدیوم‌ها در جنس *Coniothyrium* بسیار ظریف است بنابراین با ضربه‌های بسیار ضعیف شکسته و پیکنیدیوسپوره‌های آن آزاد می‌گردند. سپس این محلول جهت حذف محیط کشت احتمالی موجود در آن، از کاغذ صافی سترون عبور داده شد و سوسپانسیون با غلظت مناسب و مورد نظر تهیه گردید. قبل از اضافه کردن سختینه‌ها، به ازای هر گرم خاک موجود در قوطی، یک میلی لیتر از سوسپانسیون به ظرف اضافه و با خاک مخلوط شد. در شاهد، بجای سوسپانسیون اسپور از آب مقطر سترون استفاده گردید. این ظروف به مدت ۲ ماه در شرایط آزمایشگاه (دمای ۲۶-۲۰ درجه سانتی گراد و نور طبیعی و فلورسنت) نگهداری شدند. به طور متوسط، هر ۱۰ روز یکبار مقدار ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون توسط یک سرنگ تازه به قسمت زیرین خاک‌های موجود در ظروف تزریق می‌شد تا رطوبت لازم در آن‌ها جهت فعالیت میکروبی فراهم باشد.

ب: ارزیابی میزان کنترل جوانه زنی میسلوژنیک سختینه‌ها توسط سوسپانسیون عوامل بیوکنترل

بعد از دو ماه کل سختینه‌ها از ظروف پلاستیکی خارج و با آب سترون شده کاملاً شستشو شدند. سختینه‌های بکلی تخریب شده در تیمارهای مختلف مورد محاسبه قرار گرفتند. در این آزمایش از طرح فاکتوریل کاملاً تصادفی استفاده شد و سختینه‌ها روی

فرمول اشاره شده در بند ب محاسبه گردید. پتری‌های فوق مجدداً بعد از اندازه‌گیری اولیه به مدت ۱۵ روز دیگر در شرایط اشاره شده در بالا نگهداری شدند تا تاثیر متابولیت‌های خارج سلولی در تشکیل سختینه‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد.

بررسی تاثیر عوامل بیوکنترل بر جوانه زنی میسلوژنیک سختینه‌ها

الف: انجام آزمایش

در این آزمایش، نخست حدود ۱۰ کیلوگرم خاک از مزرعه ای در نزدیکی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی تهیه گردیده و جهت حذف مواد خارجی و کلوخه‌های بزرگ غربال گردید. کل خاک با بیلچه با هم مخلوط و به دو قسمت پنج کیلوگرمی تقسیم شد. یکی از بخش‌های پنج کیلویی خاک، در داخل پلاستیک ضخیم قرار داده شد و دو بار سترون گردید. این آزمایش در قوطی‌های پلاستیکی درب‌دار کوچکی انجام شد که گنجایش ۱۰۰ گرم خاک را داشتند. آن‌ها قبل از مصرف در حرارت ۱۲۰ درجه و فشار یک اتمسفر بمدت ۱۵ دقیقه سترون شدند. به ازای هر تیمار، شش قوطی در نظر گرفته شد و سه عدد از آن‌ها با خاک سترون و ۳ عدد دیگر با خاک غیر سترون پر شدند. در هر قوطی ۵۰ سختینه (ضد عفونی شده با اتانل به مدت یک دقیقه) قرارگرفت و با خاک (در عمق ۴-۰ سانتی متری قوطی) مخلوط شدند. از کلیه عوامل بیوکنترلی سوسپانسیون اسپور تهیه شد. غلظت اسپورها با هماسیتومتر اندازه گیری شد. غلظت سوسپانسیون برای کلیه تیمارها ۱۰^۷ اسپور در میلی لیتر تنظیم گردید. در تهیه سوسپانسیون‌ها از آب مقطر سترون حاوی دو گرم در لیتر صمغ عربی (بعنوان ماده چسباننده) استفاده شد. در تهیه سوسپانسیون اسپور از اینوکولوم گونه‌های تریکودرما، در صورت چسبندگی اسپورها در سوسپانسیون، علاوه بر رعایت موارد مذکور، از آب مقطر حاوی یک قطره ماده خیس کننده (مایع ظرفشویی) استفاده شد. در تهیه

میسلیوژنیک، اعداد مربوطه در هر تیمار در نرم افزار SAS مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

خواص بیوکنترلی عوامل قارچی در کشت متقابل با بیمارگر

در این آزمون، جنبه های مختلفی از تاثیر عوامل بیوکنترل (جدایه های تریکودرما و *C. minitans*) بر قارچ عامل کپک سفید مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

محیط کشت پی دی ای قرار داده شدند و تولید و یا عدم تولید میسلیوم در بیمارگر و یا رشد عوامل بیوکنترل از سختینه ها مورد ارزیابی و شمارش قرار گرفت. سختینه هایی که از آنها هیچ میسلیومی رشد نکرد، در بین دو لایه کاغذ صافی مرطوب سترون قرار گرفتند و بعد از تولید میسلیوم به عنوان سختینه های سالم قلمداد شدند و در غیر این صورت، با توجه به تغییر رنگ قسمت مغز (که در حالت عادی سفید رنگ است) و یا رشد عوامل بیوکنترلی، سختینه از بین رفته محاسبه شدند. بعد از تعیین درصد سختینه های فاقد قدرت جوانه زنی

جدول ۱- نتایج آزمون کشت متقابل عامل کپک سفید و عوامل بیوکنترلی مختلف

ریف	نام عامل بیوکنترل	رشد روی پرگنه بیمارگر	پیچش دور هیف بیمارگر	مرز حائل با پرگنه بیمارگر	اسپورزایی روی پرگنه بیمارگر	درصد جلوگیری از تولید سختینه
۱	<i>T. ceramicum</i>	+	+	+	+	۷۰
۲	<i>T. koningii</i>	+	+	+	+	۱۰۰
۳	<i>T. koningiopsis</i>	+	-	+	+	۱۰۰
۴	<i>T. virens</i>	+	-	+	+	۴۵
۵	<i>T. viridescens</i>	+	+	+	+	۱۰۰
۶	<i>C. minitans</i>	-	-	+	-	۰*

*عامل بیوکنترل نه تنها باعث کاهش سختینه نشده است بلکه به میزان آن عدد باعث تحریک تولید سختینه بیشتری نسبت به شاهد شده است.

قارچ عامل بیماری شدند (جدول ۲). بیشترین کاهش رشد (بیشترین اثر بازدارندگی) مربوط به *T. koningiosis* و *T. koningii* به ترتیب ۵۶٪ و ۵۴٪ و کمترین تاثیر بازدارندگی به میزان ۴۱٪ مربوط به *T. viridescens* بود. همچنین متابولیت های فرار این عوامل بیوکنترلی (غیر از *C. minitans*) از تشکیل سختینه جلوگیری کردند.

همان طور که در جدول (۱) قابل مشاهده است، گونه های *T. koningii*، *T. koningiopsis* و *T. viridescens*، اثر بهتری نسبت به سایر گونه ها داشته اند و گونه *C. minitans* نه تنها از تشکیل سختینه جلوگیری نکرد بلکه باعث تحریک تشکیل سختینه نسبت به شاهد هم شده است.

مواد خارج سلولی فرار عوامل بیوکنترل در بازدارندگی

رشد میسلیومی عامل کپک سفید

بر اساس نتایج، همه گونه ها نسبت به شاهد اختلاف معنی دار نشان دادند و باعث کاهش رشد پرگنه

جدول ۲- تاثیر متابولیت‌های فرار عوامل بیوکنترلی مختلف در محدود سازی رشد پرگنه قارچ عامل کپک سفید

ردیف	عوامل بیوکنترل	میانگین ^۱ رشد شعاعی پرگنه بیمارگر در ۴۸ ساعت پس از تلقیح (میلی متر)	درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ عامل بیماری	گروه‌بندی تیماری در آزمون دانکن ^۲	میانگین ^۱ تعداد سختینه‌های تشکیل شده بعد از ۱۵ روز
۱	شاهد	۲۲	-	A	۳۶
۲	<i>T. ceramicum</i>	۱۱	۵۰	CD	۰
۳	<i>T. koningii</i>	۱۰	۵۴	FED	۰
۴	<i>T. koningiopsis</i>	۹/۵	۵۶	GE	۰
۵	<i>T. virens</i>	۱۰/۵	۵۲	FECD	۰
۶	<i>T. viridescens</i>	۱۳	۴۱	B	۰
۷	<i>C. minitans</i>	۱۰/۵	۵۲	FEB	۱۲

۱- میانگین مربوط به سه تکرار می باشد.

۲- تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند در سطح یک درصد با هم اختلاف معنی دار ندارند.

تاثیر متابولیت‌های خارج سلولی عوامل بیوکنترلی مختلف در بازدارندگی رشد میسلیمیوم عامل کپک سفید در آزمون استفاده از متابولیت‌های فیلتر شده با غلظت ۳۰٪، کلیه عوامل بیوکنترلی نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند و باعث کاهش رشد پرگنه قارچ عامل بیماری شدند. بیشترین درصد بازدارندگی رشد پرگنه مربوط به *T. ceramicum* و *T. viridescens* به ترتیب به میزان ۶۹ و ۵۹ درصد و نیز بیشترین تاثیر بازدارندگی از تشکیل سختینه نیز مربوط به *T. ceramicum* بود. همچنین کمترین درصد بازدارندگی رشد پرگنه مربوط به *T. virens* به میزان ۲۵ درصد بود. در غلظت ۱۵٪ نیز بازدارندگی کلیه تیمارها نسبت به شاهد معنی‌دار بود. اثر بازدارندگی *T. ceramicum* با میزان ۵۳٪ بیشتر از همه بود. *T. koningii*، *T. koningiopsis* و *C. minitans* با مقدار ۲۳٪ کمترین اثر بازدارندگی را داشتند. در این غلظت نیز، بیشترین تاثیر بازدارندگی از تشکیل سختینه در *T. ceramicum* و *T. viridescens* بود (جدول ۳).

تاثیر متابولیت‌های خارج سلولی عوامل بیوکنترلی مختلف در بازدارندگی رشد میسلیمیوم عامل کپک سفید در آزمون استفاده از متابولیت‌های فیلتر شده با غلظت ۳۰٪، کلیه عوامل بیوکنترلی نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند و باعث کاهش رشد پرگنه قارچ عامل بیماری شدند. بیشترین درصد بازدارندگی رشد پرگنه مربوط به *T. ceramicum* و *T. viridescens* به ترتیب به میزان ۶۹ و ۵۹ درصد و نیز بیشترین تاثیر بازدارندگی از تشکیل سختینه نیز مربوط به *T. ceramicum* بود. همچنین کمترین درصد بازدارندگی رشد پرگنه مربوط به *T. virens* به میزان ۲۵ درصد بود. در غلظت ۱۵٪ نیز بازدارندگی کلیه تیمارها نسبت به شاهد معنی‌دار بود. اثر بازدارندگی *T. ceramicum* با میزان ۵۳٪ بیشتر از همه بود. *T. koningii*، *T. koningiopsis* و *C. minitans* با مقدار ۲۳٪ کمترین اثر بازدارندگی را داشتند. در این غلظت نیز، بیشترین تاثیر بازدارندگی از تشکیل سختینه در *T. ceramicum* و *T. viridescens* بود (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر متابولیت‌های خارج سلولی عوامل بیوکنترل روی پرگنه عامل کپک سفید در غلظت‌های ۳۰ و ۱۵ درصد ۴۸ ساعت بعد از تلقیح

ردیف	عوامل بیوکنترل	میانگین ^۱ رشد شعاعی پرگنه بیمارگر	درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ عامل بیماری	گروه‌بندی تیماری ^۲	میانگین ^۱ تعداد سختینه‌ها در پتری بعد از ۱۵ روز
		۳۰٪	۱۵٪	۳۰٪	۱۵٪
۱	شاهد	۱۶	۱۷	A	۱۳
۲	<i>T. ceramicum</i>	۵	۸	B	۴
۳	<i>T. koningii</i>	۸	۱۳	D	۷
۴	<i>T. koningiopsis</i>	۷	۱۳	D	۶
۵	<i>T. virens</i>	۱۲	۱۱	G	۱۰
۶	<i>T. viridescens</i>	۶/۵	۱۲	C	۵
۷	<i>C. minitans</i>	۹	۱۳	F	۸

۱- میانگین مربوط به سه تکرار می‌باشد.

۲- تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند در سطح یک درصد خطا با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

به تسخیر سریع سوبسترا توسط عوامل بیوکنترل می باشد زیرا رشد سریع این عوامل شرایط مناسبی را برای تصاحب مکان (سطح محیط کشت) و غذا و قبل از آنکه نشت متابولیت‌های خارج سلولی این عوامل بیوکنترلی (که تولید تاخیری و بعد از رشد را دارد) در آگار این تاثیر را ایجاد کند، فراهم می سازد. تحقیقات سیمون و سیواسیتامپارام (۱۹۸۹)، شریمباک و همکاران (۱۹۹۴)، کوک و کیوانک (۲۰۰۴) این نتایج را تایید می کند. در آزمون کشت متقابل، بیشتر عوامل بیوکنترلی برای رشد بیمارگر محدودیت رشد ایجاد کردند و سطح پرگنه قارچ بیمارگر را پوشاندند. هرموزا و همکاران (۲۰۰۰) نیز با قرار دادن پرگنه *Rosellinia necatrix*, *Phoma beta*, *Fusarium oxysporum* f.sp. و *Botrytis cinerea dianthi* در مقابل چند جدایه تریکودرما روی محیط کشت‌های سی ام ای، ام ای و پی دی ای به این نتیجه رسیدند که اسپورزایی و قدرت تهاجمی (رشد تریکودرما روی پرگنه قارچ بیمارگر) جدایه‌های تریکودرما در

تاثیر عوامل بیوکنترل بر جوانه زنی سختینه‌ها در خاک استریل و غیر استریل

دو ماه پس از تلقیح سوسپانسیون اسپور عوامل بیوکنترلی به ظروف محتوی سختینه در خاک استریل و غیر استریل، درصد سختینه‌های فاقد قدرت جوانه زنی میسلوژنیک مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله، کلیه تیمارها با شاهد اختلاف معنی دار داشتند (جدول ۴) و باعث کاهش میزان جوانه زنی سختینه‌ها شدند. بیشترین درصد کاهش جوانه زنی مربوط به *T. ceramicum* و *T. koningiopsis* بود و حداقل تاثیر در تیمار *T. virens* و *C. minitans* مشاهده گردید.

بحث

در آزمون کشت متقابل، گونه های تریکودرما رشد قارچ عامل بیماری را محدود کردند ولی این کاهش رشد بیشتر از آنکه مربوط به نشت متابولیت‌های خارج سلولی این عوامل به سمت پرگنه بیمارگر باشد، مربوط

جدول ۴- بررسی تاثیر سوسپانسیون اسپور عوامل بیوکنترل بر جوانه زنی میسلوژنیک سختینه بیمارگر در خاک استریل و غیراستریل

ردیف	عوامل بیوکنترل	میانگین ^۱ درصد سختینه‌های فاقد قدرت جوانه زنی در خاک غیر استریل	میانگین درصد سختینه‌های فاقد قدرت جوانه زنی در خاک غیر استریل	گروه بندی بیماری ^۲
۱	شاهد	2	4	A
۲	<i>T. ceramicum</i>	45	50	E
۳	<i>T. koningii</i>	35	45	C
۴	<i>T. koningiopsis</i>	52	42	ED
۵	<i>T. virens</i>	22	34	B
۶	<i>T. viridescens</i>	42	45	DC
۷	<i>C. minitans</i>	39	28	B

۱- میانگین‌ها در خاک استریل و غیراستریل بر اساس سه تکرار است.

۲- تیمارهایی که دارای حروف مشترک می باشند در سطح یک درصد خطا با هم اختلاف معنی دار ندارند.

رشد روی پرگنه قارچ عامل بیماری شدند، ایجاد پیچیدگی هیفی (میکوپارازیتسم) در اطراف میسلیوم-

آزمون‌های کشت متقابل به نوع قارچ عامل بیماری و ترکیب محیط کشت بستگی دارد. برخی از جدایه‌هایی که موفق به

دینگرا (۱۹۸۲) و کاربرد *C. minitans* توسط هوآنگ و همکاران (۲۰۰۰) اشاره کرد. هوآنگ و همکاران (۲۰۰۰) طی سال‌های ۱۹۹۴-۱۹۹۲، جهت بیوکنترل بیماری کپک سفید در مزارع لوبیا از سوسپانسیون اسپور چهار قارچ (*T. roseum*، *C. minitans*، *Epicoccum purpurascens*) در زمان گلدهی استفاده کردند و همه آن‌ها به طور معنی‌داری شیوع بیماری را کنترل کردند. *T. virens* در یک تحقیق مزرعه‌ای توانست کپک سفید خیار را در قسمت‌های هوایی به میزان ۱۰۰-۹۴ درصد کاهش دهد (اتو و همکاران ۲۰۰۵). در تحقیق حاضر، *C. minitans* برای نخستین بار از یکی از مزارع سیب‌زمینی استان همدان جداسازی و در کنترل بیولوژیکی مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از این قارچ در بیوکنترل برخی قارچ‌های مولد سختینه، به دفعات مورد توجه قرار گرفته است. از جمله آن‌ها می‌توان به تحقیقات مک لارن و همکاران (۱۹۹۴) در کنترل کپک سفید در آفتابگردان و گریلاف و همکاران (۱۹۹۴) در کنترل این بیماری در کاهو اشاره کرد. در این تحقیقات، *C. minitans* بصورت سوسپانسیون اسپور و یا مواد جامد در خاک مورد استفاده قرار گرفته است. لی و همکاران (۲۰۰۵)، سوسپانسیون اسپور این میکوپارازیت را در کنار سوسپانسیون آسکوسپور این بیمارگر در شرایط مزرعه و آزمایشگاه بر روی گلبرگ‌های یونجه به کاربردند و رشد ساپروفیتیک این بیمارگر را مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه گرفتند که این میکوپارازیت بخوبی می‌تواند بلایت شکوفه یونجه (ناشی از عامل کپک سفید) را کنترل کند. در *C. minitans* مشخص شده است که توانایی جدایه‌ها در کاهش بیماری کپک سفید بسیار متفاوت است (گریلاف و همکاران ۱۹۹۴) و با توجه به پایین بودن قدرت بیماری‌زایی جدایه به کار رفته در این تحقیق در کاهش قدرت جوانه زنی میسلیوژنیک سختینه‌ها، به

های قارچ عامل بیماری کردند. میکوپارازیتسم قارچ‌های عامل بیماری توسط بعضی جدایه‌های تریکودرما و تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک از قبیل کیتیناز و گلوکاناز در طی مراحل میکوپارازیتسم به اثبات رسیده است. این حالت در اکثر تحقیقات کنترل بیولوژیک مورد توجه واقع شده است (هرموزا و همکاران ۲۰۰۴ و مکین تاپر و همکاران ۲۰۰۴). در آزمون کشت متقابل، *T. koningii*، *T. ceramicum* و *T. viridescens* از دیگر عوامل بیوکنترل موفق‌تر ظاهر شدند. هر سه گونه مذکور در بررسی ترکیبات فرار نیز بسیار موثر بودند. به طور کلی، اغلب استرین‌های تریکودرما مواد خارج سلولی فرار و غیر فرار سمی تولید کرده که رشد عوامل بیماری‌زای قارچی را متوقف می‌کنند و یا به طرز چشمگیری کاهش می‌دهند (خت و همکاران ۱۹۹۷). در بین مواد خارج سلولی مترشحه در گونه‌های تریکودرما می‌توان به اسید هارزیانیک، آلامتیسین، تریکولین، پیتابولها، آنتی بیوتیک‌ها، ۶- فنیل - آلفا - پیرون، ویریدین، گلايوویریدین و هپتلیدیک اسید اشاره کرد (وی و همکاران ۲۰۰۱). بر اساس مطالعات خت و همکاران (۱۹۹۷)، موتانت‌هایی از *T. virens* که میزان زیادی گلايوویرین تولید می‌کنند، گیاهچه‌های پنبه را از *P. ultimum* (عامل مرگ گیاهچه) حفاظت کردند. در تحقیقات دنیس و وبستر (۱۹۷۱)، شریمباک و همکاران (۱۹۹۴) و کوک و کیوانک (۲۰۰۴)، به نقش گونه‌های تریکودرما در تولید آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون تریکودرمین، تریکودرمول، هارزیانوم آ و هارزیانولید اشاره شده است. یکی از بهترین راه‌های کاهش سختینه‌ها در خاک به کارگیری عوامل بیوکنترلی در خاک است. عوامل بیوکنترلی متعددی (قارچ‌ها، باکتری‌ها) جهت مبارزه با بیماری کپک سفید مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. در این تحقیق ۵ گونه تریکودرما به اضافه یک جدایه *C. minitans* مورد مطالعه قرار گرفتند. کارآیی این عوامل بیوکنترل در کاهش بیماری کپک سفید به دفعات به اثبات رسیده است که به عنوان مثال می‌توان به استفاده از *T. virens* توسط تو (۱۹۸۰)، کاربرد *T. viride* و *T. koningii* توسط دوسانتوس و

T. ceramicum قابلیت بالایی را در بیوکنترل این بیمارگر از خود نشان داد، به طوری که قابلیت جوانه زنی سختینه‌ها را در خاک سترون و غیر سترون به میزان ۴۵-۵۰ درصد تقلیل داد. *T. viridescens* نیز می‌تواند به عنوان یک عامل بیوکنترل قوی در کاهش خسارت کپک سفید در نظر گرفته شود زیرا در کشت متقابل با عامل بیماری توانست به میزان ۱۰۰٪ از تشکیل سختینه در پتری جلوگیری کند و در بقیه آزمایشات *in vitro* نیز توانست به میزان چشمگیری باعث کاهش تشکیل سختینه شود و نیز به میزان ۴۵-۴۲ درصد از جوانه زنی سختینه‌ها در خاک استریل و غیر استریل جلوگیری کرد. شیوع این بیماری در اثر آبیاری بارانی در مزارع سیب زمینی و ناکارآمد بودن کنترل شیمیایی آن، کاربرد جدایه‌های دارای توان بیوکنترلی بالا با توجه به اینکه آبیاری بارانی شرایط مساعد استقرار و رشد تریکودرما را به خوبی مهیا می‌کند، توصیه می‌شوند.

نظر می‌رسد که باید به جداسازی جدایه‌هایی با قدرت بیماری زایی بیشتر اقدام شود. در این تحقیق، هر چند *T. koningii* موثرترین عامل بیوکنترل در بین گونه‌های به کار رفته نبود ولی در مجموع بسیار موثر ظاهر گردید و در کشت متقابل مانع از بوجود آمدن سختینه در پتری شد. تراژمن و کین (۱۹۹۰) نیز *T. koningii* را در شرایط آزمایشگاه و مزرعه لوبیا مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این قارچ می‌تواند در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در مدت دو هفته ۵۰٪ سختینه‌ها را در شرایط *in vitro* آلوده کند. در رابطه با این عامل بیوکنترلی، نتایج این تحقیق در تضاد با نتایج تحقیقات عمرانی (۱۳۷۸) بود زیرا او *T. koningii* را دارای کمترین توانایی در لیز کردن سختینه‌ها می‌داند.

در رابطه با بیوکنترل بیماری کپک سفید توسط *T. ceramicum koningiopsis* و *T. viridescens* هیچ گونه منبع تحقیقی یافت نگردید بنابراین این سه گونه می‌توانند به عنوان عوامل بیوکنترل جدید علیه کپک سفید معرفی شوند. هر سه گونه مذکور قابلیت بازدارندگی بسیار بالایی را در کشت متقابل نشان دادند. *T. koningiopsis* در کلیه مراحل انجام این تحقیق، در بیوکنترل کپک سفید موثر عمل می‌نمود به طوری که ۹۵٪ سختینه‌ها را بر روی

منابع مورد استفاده

- عمرانی خ، ۱۳۷۸. کنترل بیولوژیکی و شیمیایی *Sclerotinia sclerotiorum* عامل کپک سفید بادمجان. پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده کشاورزی.
- Adams PB, 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. Annu Rev Phytopathol 28: 59-72.
- Atallah ZK and DA. Johnson. 2004. Development of *Sclerotinia* stem rot in potato fields in south-central Washington. Plant Dis 88: 419-423.
- Boland GJ and R. Hall. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can J Plant Pathol 16: 93-100.
- Chet I, Inbar J and Hadar I, 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. Pp. 165-184. In: Wicklow DT and Soderstrom B, (eds). The mycota IV: Environmental and microbial relationships. Springer- verlag, Berlin.

- Dennis C and Webster J, 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. Hyphal interactions. Trans Brit Mycol Soc 57: 363-369.
- Dos Santos AF and Dhingra OD, 1982. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can J Bot 60: 472-475.
- Ervio LR, Halkilahti AM and Pohjakallio O, 1964. The survival of sclerotia in soil. Experimental Mycol 5: 212-273.
- Ethue LZ, Blume E, Muniz M, Silvia ACF, Stefanela DR and Rocha EK, 2005. Fungi anagonic to *Sclerotinia sclerotiorum* on cucumber grown in greenhouse. Fitopathologia Brasileira 30: 127-133
- Gerlagh M, Kruse HM and Whipps JM, 1994. Growth and survival of *Coniothyrium minitans* on lettuce leaves in contact with soil in the presence and absence of *Sclerotinia sclerotiorum*. Europ J Plant Pathol 100: 55-59
- Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E and Garcia-Acha I, 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Appl Environ Microbiol 66: 1890-1898.
- Hooker WJ, 1990. Compendium of potato diseases. The American Phytopathological Society.
- Huang HC and Hoes JA, 1976. Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. Can J Bot 54: 406-410.
- Huang HC, Bremer E, Hynes RK and Erickson RS, 2000. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Biol Control 18: 270-276.
- Jones EE, Mead A and Whipps JM, 2003. Evaluation of different *Coniothyrium minitans* inoculum sources and application rates on apothecial production and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. Soil Biol and Biochem 35 : 409-419
- Karhuvaara L, 1960. On parasites of the sclerotia of some fungi. Acta Agric Scand 10: 127-134.
- Kucuk C and Kivanc M, 2004. *In vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. Turk. J Biol 28: 111-115.
- Li GQ, Huang HC, Acharya SN and Erickson RS, 2005. Effectiveness of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma atroviride* in suppression of sclerotinia blossom blight of alfalfa. Plant Pathol 54: 204-211.
- McIntyre M, Nielsen J, Arnau J, Van der Brink H, Hensen K and Madrid S, 2004. Biocontrol mechanisms of trichoderma strains. Pp. 249-260. Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. Copenhagen, Denmark.
- McLaren DL, Huang HC, Kozub GC and Rimmer SR, 1994. Biological control of *Sclerotinia* wilt of sunflower with *Talaromyces flavus* and *Coniothyrium minitans*. Plant Dis 78: 231-235.

- Purdy LH, 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. *Phytopathol* 69: 875–880.
- Schirmbock M, Loroto M, Wang YL, Hayes CK, Arisan- Atac I, Scala F, Harman GE and Kubicek CP, 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. *Appl Environ Microbiol* 60: 4364-4370.
- Simon A and Sivasithamparam K, 1989. Pathogen suppression: A case study in biological suppression of *Gaeumannomyces graminis* in soil. *Soil Biol Biochem* 21: 331-337.
- Trutmann P and Keane PJ, 1990. *Trichoderma koningii* as a biocontrol agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in Southern Australia. *Soil Biol Biochem* 22 (1): 43-50.
- Tu JC, 1980. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Phytopathol* 70: 670-674.
- Tu JC, 1986. Integrated disease control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in navy bean (*Phaseolus vulgaris*). *Int Symp Crop Prot* 39: 731–740.
- Venette J, 1998. *Sclerotinia* spore formation, transport, and infection. Pp. 4-7. Proceedings of the *Sclerotinia* Workshop. Fargo, North Dakota, USA.
- Vey A, Hoag IRE and Butt TM, 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. Pp. 311-346. In: Butt, TM Jackson, C and Magan N (eds). *Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential*. CAB International , Bristol.