

تأثیر قارچ تریکودرما بر سلامت و صفات فیزیولوژیکی و بیوشیمیایی ریزغده‌های تولیدی ارقام سیب‌زمینی تحت عامل بیماری ریزوکتونیا در شرایط گلخانه

محمد انتصاری^۱، بهنام کامکار^{۲*}، فرشید قادری فر^۳، مسعود احمدزاده^۳

۱. دانشجوی دکتری علوم و تکنولوژی بذر، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گرگان

۲. دانشیار گروه زراعت، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه گرگان

۳. استاد گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۸)

چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر تیمار قارچ *Trichoderma* بر تولید ریزغده‌های سیب‌زمینی در حضور بیمارگر *Rhizoctonia solani* آزمایشی در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با آرایش فاکتوریل در ۳ تکرار انجام شد. تیمارهای این پژوهش شامل ۳ جدایه قارچ‌های تریکودرما (*T. harzianum* (Tr1)، *T. virens* (Tr2)، *T. atroviride* (Tr3)، قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* AG3، و ارقام سیب‌زمینی شامل آگریا و سانته تهیه شده از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال بود. صفات اندازه‌گیری شده در این آزمایش شامل وزن خشک ریشه، ساقه، استولون، وزن تر ریزغده، تعداد ریزغده و استولون و همچنین شدت بیماری‌زایی قارچ در غده بود. نتایج نشان داد که استفاده از تیمار *Trichoderma* توانست تأثیر معنی‌داری بر صفات اندازه‌گیری شده در حضور بیمارگر داشته باشد و همچنین شدت بیماری‌زایی را نسبت به شاهد به طور معنی‌داری کاهش داد. ترکیب تیماری *T. harzianum* (Tr1) و رقم آگریا نسبت به سایر ترکیبات بر صفات اندازه‌گیری شده تأثیر بیشتری داشت، بطوریکه بیشترین وزن خشک ساقه، وزن تر ریزغده و تعداد ریزغده در ترکیب تیماری Tr1 و رقم آگریا به ترتیب با افزایش ۸۰، ۷۰ و ۱۷۵ درصدی نسبت به شاهد و وزن خشک استولون در رقم سانته به میزان ۵۲ درصد نسبت به شاهد به دست آمد. استفاده از تیمار Tr1 باعث افزایش فعالیت سیستم آنتی‌اکسیدانتی آنزیم آسکوربات پراکسیداز و محتوای پرولین و از طرف دیگر کاهش پراکسیداسیون لیپید گردید.

کلمات کلیدی: زیست کنترل، سلامت بذر، ریزغده سیب‌زمینی، *Rhizoctonia solani*، آنزیم، پرولین

The effect of *Trichoderma* on the seed health, physiological and biochemical characteristics tubers production of potato cultivars varieties under *Rhizoctonia solani* in greenhouse condition

M. Entesari, B. Kamkar*, F. Ghaderifar, M. Ahmadzadeh

1. Phd student of university of Gorgan
2. Associated professor of Gorgan university
3. professor of university of tehran

(Received: May. 15, 2017 – Accepted: Jan. 08, 2018)

Abstract

To evaluate the effect of *Trichoderma* fungus on potato production in the presence of *Rhizoctonia solani*, a greenhouse experiment was conducted in a Completely randomized block design, with three replications, three strains of *Trichoderma* (i.e. *Trichoderma harzianum* (Tr1), *Trichoderma virens* (Tr2), *Trichoderma atroviride* (Tr3)), one strains of *Rhizoctonia solani* AG3 fungus and two varieties of potato (*Agria* and *Sante*) which were provided by the seed and plant certification and registration institute. Root and shoot dry weight, stolon dry weight, tubers fresh weight, and the number of tubers and stolon were measured. The addition of *Trichoderma* significantly increased the amount of measured traits, particularly in the presence of the fungus (pathogen-infected condition) and significantly decreased the severity of virulence in comparison with the control treatment. Also, the combination of Tr1 treatment and *Agria* variety has led to increased measured traits in comparison with the other combined treatments. The highest of shoot dry weight, tubers fresh weight, and the number of tubers were observed in the combination of Tr1 treatment and *Agria* variety with an increase 80%, 70%, and 175% in comparison with the control treatment, respectively. While, the dry weight of stolon in the combination of Tr1 treatment and *Santhe* variety was 52% higher than control treatment. Also Tr1 treatment has led to increased antioxidant enzyme activity and proline content, and decreased lipid peroxidation.

Key words: Biocontrol, Seed health, Mini tuber of potato, *Rhizoctonia solani*, Antioxidant enzyme, Proline

* Email: behnam.kamkar@gmail.com

اختیار گیاه میزبان قرار می‌گیرند (Harman *et al.* 2004; Vinale *et al.* 2008). پراکسیداسیون لیپید مهمترین خسارتی است که گیاه در اثر افزایش رادیکال‌های آزاد اکسیژن متحمل می‌گردد و منجر به مختل گردیدن فعالیت‌های آنزیم (سوپراکسید دیسموتاز، کاتالاز، آسکوربات پراکسیداز و...) و غیر آنزیمی (آسکوربیک اسید، ویتامین E، پرولین و...) می‌گردد، که نقش قابل توجهی در برابر تنش‌های زیستی و غیر زیستی بر عهده دارند. از قابلیت‌های مهم برخی گونه‌های این جنس توانایی تولید آنتی‌بیوتیک و آنزیم‌ها و همچنین افزایش سطوح دفاعی وابسته به آنزیم‌های گیاهی (شامل پراکسیداز، کیتیناز، بتا ۱ و ۳ گلوکوناز و هیدروپراکسیداز لیاز)، دفع مسمومیت و افزایش انتقال قند و اسید آمینه در ریشه گیاهان، ایجاد مقاومت القائی^۳ در برابر تنش‌های محیطی، افزایش جذب عناصر غذایی با افزایش حلالیت عناصر، ترشح هورمون‌های رشد و شبه هورمون‌ها و تولید آنزیم‌های زیلاناز و سلولاز است که می‌توانند به طور مستقیم تولید اتیلن را در گیاه در و اکنش به حضور عامل بیماری‌زا تحریک نمایند (Małolepsza *et al.*, 2017; Shores *et al.*, 2010).

در برخی از سیستم‌های بیماری‌زای گیاهی، کاربرد مواد شیمیایی نمی‌تواند به تنهایی به کنترل قابل توجهی منتهی شوند و خسارات زیست‌محیطی متعددی بدنبال داشته و باعث کاهش عملکرد و کیفیت ریزغده‌های تولیدی می‌گردد. نظر به مطالعات اندک در خصوص تلقیح ریزغده سیب زمینی با عوامل کنترل زیستی و تحریک کننده رشد، لازم بود بر روی عملکرد و تولید ریزغده در شرایط آلودگی بیماری و تغییرات بیوشیمیایی نیز مطالعه شود. هدف از این تحقیق استفاده از عامل زیستی قارچ تریکودرما جهت تولید ریزغده‌های سیب‌زمینی عاری از بیماری ریزوکتونیا و بررسی فرایندهای آنزیمی دخیل در شرایط گلخانه بود.

مقدمه

ریزوکتونیا سولانی^۱ یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌های خاکزاد سیب‌زمینی می‌باشد که اندام‌های زیرزمینی این گیاه مثل ساقه، استولون و غده‌ها را آلوده می‌نماید. نتیجه چنین رویدادی ظهور غده‌های سبز رنگ بر روی ساقه، آسیب شدید به استولون‌ها و ساقه‌های زیرزمینی و در نتیجه تولید غده‌های با کیفیت پایین و کاهش عملکرد است (Brewer *et al.*, 2005; Larkin, 2016). روش‌های متعددی در مبارزه با این بیماری از جمله تناوب زراعی، خودداری از کشت سیب‌زمینی در زمین‌های آلوده به مدت ۳ تا ۴ سال و مبارزه با سموم شیمیایی همچون کربوکسیل، بنومیل و متیل بروماید که موجب از بین رفتن لایه ازون، بوجود آمدن سویه‌های مقاوم و عدم استفاده مداوم از آن در هر فصل می‌باشد، نتوانسته به عنوان روش‌های کنترلی موثر و متداومی مورد استفاده قرار گیرد (Arabiat & Khan, 2014; Wilkins & Spudman, 2013). بنابراین ضرورت وجود یک روش جایگزین احساس می‌شود. یکی از جدیدترین روش‌ها استفاده از عوامل زیست‌کنترل می‌باشد که دارای پتانسیل بالایی برای محافظت از محصولات تولیدی می‌باشند (Lakrin, 2016). کنترل زیستی قارچ ریزوکتونیا توسط تعدادی از قارچ‌های گونه تریکودرما^۲ و همچنین باکتری‌های گونه سودوموناس در مطالعات متعددی گزارش شده است (Kumar *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2008). جدایه‌های تریکودرما بوسیله کلونیزاسیون ریشه، باعث تولید فاکتورهای مرتبط با رشد (اکسین‌ها، سیتوکینین‌ها و اتیلن‌ها) و همچنین القای مقاومت سیستمیک به گیاه می‌شوند (Shores *et al.*, 2010). همزمان با ساخت یا تحریک هورمون‌های گیاهی اغلب جدایه‌های تریکودرما در محیط اطراف خود با ترشح اسیدهای آلی همچون اسید گلوکونیک، اسید سیتریک و اسید فوماریک، محیط را اسیدی می‌کنند و باعث حل شدن عناصر ریز مغذی همچون آهن، روی، منگنز و مس و ... گردیده که در

¹ *Rhizoctonia solan*

² *Trichoderma spp.*

³ systemic acquired resistance

مواد و روش‌ها

مانند در آورده شد و در ترکیب با آب استریل و کریوکسی متیل سلولز (۱٪) به عنوان چسباننده جهت اسپری بر روی ریزغده‌های بذری مورد استفاده قرار گرفت. پس از یک ساعت، بذره‌های تیمار شده در زیر هود سترون و روی کاغذهای سترون قرار گرفتند تا کاملاً خشک شوند. برای اطمینان از وجود اسپور تریکودرما در سطح بذر، یک بذر را در محلولی که حاوی آب و توین ۲۰ بود قرار داده و سری رقت تعیین گردید. در نهایت از سری رقت چهارم، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون روی محیط کشت PDA در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و تناوب نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی قرار گرفت و بعد از ۲۴ ساعت رشد اسپورها مشاهده شد (Cavalcante et al., 2008).

شدت بیماری‌زایی

غده‌های بذری سبب‌زینی شامل ارقام آگریا و سانته با ویژگی عاری‌بودن از بیماری‌های ویروسی بذرزاد و بیماری‌های قارچی و باکتریایی و دارا بودن گواهی مؤسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال با اندازه بذری (۳۰-۲۵ میلی‌متر) تهیه گردید. برای کشت، گلدان‌هایی با قطر دهانه ۲۰ سانتی‌متر و عمق ۲۰ سانتی‌متر با مخلوط پیت‌ماس و پرلیت اتوکلاو شده (به نسبت حجمی ۱ به ۱) تا نیمه پر شده و یک عدد ریزغده در آن قرار داده شد. قارچ ریزوکتونیا سولانی جهت تلقیح به خاک گلدان‌ها ابتدا بر روی بذر ارزن که در اتوکلاو (۳ ساعت دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر) استریل گردیده بود به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس رشد داده شد و سپس به نسبت ۱/۵ گرم در هر کیلوگرم خاک مورد استفاده قرار گرفت. گیاهان در درجه حرارت گلخانه (۲±۲۵ درجه سلسیوس در روز و ۲±۱۸ درجه سلسیوس در شب) و نور طبیعی روز همراه نور تکمیلی با تناوب نوری (۱۲ ساعت نوری و ۱۲ ساعت تاریکی) و تشعشع فعال فتوسنتزی حدود ۱۱۰۰-۱۰۰۰ میکرومول فوتون بر مترمربع در ثانیه نگهداری شدند (دستگاه لوکس متر مدل MS6612).

به منظور ارزیابی تاثیر تیمار قارچ تریکودرما بر تولید غده‌های بذری سبب‌زینی در حضور بیمارگر *Rhizoctonia solani* آزمایشی گلخانه‌ای بصورت فاکتوریل در قالب بلوک‌های کامل تصادفی با ۳ تکرار در سال ۱۳۹۴ انجام شد. تیمارهای این پژوهش ۳ جدایه از قارچ‌های تریکودرما شامل (*T.harzianum* (Tr1)، *T.atroviride* (Tr3)، *T.virens* (Tr2) دانشگاه تهران (karimian et al., 2014)، قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* AG3 و ارقام سبب‌زینی شامل آگریا و سانته تهیه شده از موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال بود. تیمارهای مورد استفاده شامل ۳ جدایه تریکودرما و شاهد (۴ تیمار)، حالت بیمارگر و بدون بیمارگر (۲ تیمار) و ارقام سبب‌زینی (۲ تیمار) در ۳ تکرار بود.

روش آغشته سازی بذر با قارچ تریکودرما

پرگنه‌های جدید قارچ روی محیط ^۱PDA تهیه شد. پس از رشد قارچ و اسپوردهی فراوان و متراکم قارچ، به داخل ارلن سترون ریخته شد. تعداد اسپورها شمارش شد و اسپورهای جدایه‌های تریکودرما با غلظت 3×10^7 با استفاده از روش رقت سریالی با آب مقطر استریل تهیه شد (Harman et al., 2008). سپس ۷۰ گرم سبوس گندم را با ۱۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل ظرف شیشه‌ای درب دار قرار داده و بعد از اتوکلاو کردن در دمای ۱۲۰ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر به مدت دو روز متوالی، زادمایه تهیه شده اسپور به میزان ۵۰ میلی‌لیتر، به آن اضافه گردید و به مدت ۱۰ روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در داخل ژرمیناتور (۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی) نگهداری شد. سپس، مواد روی کاغذ پهن و اجازه داده شد تا برای ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۲۰ تا ۵۰ درصد خشک گردد. ماده خشک شده به حالت پودر

¹Potato dextrose agar

شد و ۲ میلی لیتر از محلول صاف شده به همراه ۲ میلی لیتر محلول ناین هیدرین و ۲ میلی لیتر اسید استیک درون یک لوله آزمایش ریخته شد و به مدت یک ساعت در دمای ۳۶ درجه سلسیوس در بن ماری قرار گرفت. برای متوقف شدن واکنش، لوله‌های حاوی محلول بلافاصله در یخ قرار داده شدند. سپس ۶ میلی لیتر تولوئن به محلول اضافه و بعد از تکان دادن، محلولی دوفازی تشکیل شد که فاز بالایی برای اندازه گیری پرولین به کار گرفته شد. نمونه‌ها در طول موج ۵۲۰ نانومتر طیف سنجی شدند. محتوای پرولین براساس میکرومول پرولین در گرم بذر محاسبه شد.

اندازه گیری محتوی مالون دی آلدهید

اندازه گیری پراکسیداسیون لیپید به روش هت و پاکر (Heath & Packer, 1968) همراه با تغییراتی انجام شد. در این روش، ۰/۲ گرم بذر سیب زمینی با ۵ میلی لیتر تری کلرو استیک اسید ۰/۱ درصد در هاون چینی کوبیده و هموژنیزه گردید. عصاره هموژنیزه به لوله سانتریفیوژ منتقل و به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۴۰۰۰g و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس سانتریفیوژ گردید. فاز میانی در زیر لایه لیپیدی برای اندازه گیری میزان پراکسیداسیون لیپید مورد استفاده قرار گرفت. به ۲۵۰ میکرو لیتر از این عصاره، ۲ میلی لیتر معرف TBA ۰/۲۵ درصد اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. بلافاصله پس از این مرحله لوله های آزمایش به مدت ۱۵ دقیقه در یک ظرف یخ قرار گرفتند. بعد از این مدت، محلول‌ها دوباره به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ شدند و میزان جذب نور نمونه ها در طول موج های ۴۴۰، ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر قرائت شد. محلول بلانک حاوی ۲۵۰ میکرو لیتر تری کلرو استیک ۰/۱ درصد بود که با ۲ میلی لیتر معرف TBA ۰/۲۵ درصد مخلوط شده بود و تمامی تیمارها با محلول بلانک سنجیده شد. میزان پراکسیداسیون لیپید بر اساس مقدار مالون دی آلدهید (MDA) موجود در هر عصاره طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

برای رقم سانتی ۱۰۰ روز و رقم آگرا ۱۱۲ روز بعد از پایان رشد ریشه‌ها و غده‌های حاصله به ملایمت در زیر آب شسته شدند و شدت بیماری آنها بر اساس مقیاس یک تا شش از روش آتکینسون و همکاران (Atkinson *et al.*, 2010) و به شرح زیر ارزیابی گردید. در این روش، برای ارزیابی گیاهان سالم و بدون هیچ گونه آلودگی ارزش صفر، یک تا ۵ درصد ارزش ۱، ۶ تا ۱۰ درصد ارزش ۲، ۱۱ تا ۲۵ درصد ارزش ۳، ۲۶ تا ۵۰ درصد ارزش ۴، ۵۱ تا ۷۰ درصد ارزش ۵ و ۷۶ تا ۱۰۰ درصد ارزش ۶ در نظر گرفته شد.

اندازه گیری فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز

سنجش فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز در غده‌های بذری سیب زمینی، به روش اسپکتروفتومتری (مدل Shimadzu uv 180) و در دمای 25 ± 1 سلسیوس و با استفاده از روش ناکانو و اسدا (Nakano & Asda, 1987) انجام شد. در این راستا از بافر فسفات پتاسیم (۷/۸ pH) ۵۰ میلی مولار به میزان ۱۵۰۰ میکرو لیتر، هیدروژن پراکسید ۰/۱ میلی مولار به میزان ۴۰۰ میکرو لیتر، آسکوربیک اسید ۳۰ درصد به میزان ۴۰۰ میکرو لیتر، EDTA ۰/۱ میلی مولار به میزان ۶۰۰ میکرو لیتر و عصاره استخراج شده به میزان ۱۰۰ میکرو لیتر استفاده شد و در نهایت حجم کل محلول به ۳۰۰۰ میکرو لیتر رسید. فعالیت ویژه آنزیم برای آسکوربات پراکسیداز با استفاده از ضریب خاموشی ($\epsilon = 2/8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) به صورت تعداد میکرومول آسکوربات تجزیه شده در دقیقه در میلی گرم پروتئین انجام شد.

اندازه گیری محتوای پرولین

میزان پرولین تجمع یافته در گیاه با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۲۰ نانومتر و با توجه به منحنی استاندارد حاصل از غلظت‌های مختلف پرولین اندازه گیری شد (Bates *et al.*, 1973). ۵۰۰ میلی گرم از بذر سیب زمینی به داخل هاون چینی انتقال یافت و با افزودن ۴۶ میلی لیتر اسید سولفوسالیسیلیک ۹ درصد به آن در هاون کوبیده شد. سپس محلول حاصل از کاغذ صافی عبور داده

جمله، تعداد کل ریز غده تولید شده در هر بوته، تعداد استولون، وزن تر ریزغده، وزن خشک ریشه، ساقه و استولون با ترازوی دیجیتال تا دو رقم اعشار بر حسب گرم در بوته محاسبه و یادداشت گردید. برای محاسبات آماری از نرم افزار SAS نسخه ۹/۴ و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون LSD در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی همه تیمارها و اثرات متقابل بعضی از تیمارها بر صفات اندازه‌گیری شده معنی‌دار بود (جدول ۱). نظر به معنی‌داری اثرات اصلی و متقابل، مقایسه میانگین تیمارها به منظور بررسی ترکیب تیماری مطلوب مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱- تجزیه واریانس میانگین مربعات صفات مطالعه شده در ارقام سیب‌زمینی تحت تیمار تریکودرما در حضور و عدم حضور بیمارگر

Table 1- Analysis of variance on mean square of the studied traits under *Trichoderma* treatment in infected and non- infected potato cultivars

منابع تغییرات S. O. V	درجه آزادی df	تعداد استولون Stolon number	تعداد ریز غده Tuber number	وزن تر ریزغده Mini tuber fresh weight	وزن خشک Stolon dry weight	وزن خشک ساقه Shoot dry weight	وزن خشک ریشه Root dry weight
تکرار Replication	2	1. 001	0. 158	38. 42	0. 002	0. 165	0. 0932
تریکودرما (A) Trichoderma	3	51. 45**	37. 94**	4163. 6**	0. 142**	25. 81**	1. 700**
رقم (B) Cultivar	1	1. 80*	2. 59**	676. 12**	0. 005*	2. 104**	0. 169**
بیمارگر (C) Pathogen	1	76. 53**	32. 81**	4575. 6**	0. 212**	13. 75**	2. 537**
A×B	3	1. 41*	0. 14 ^{ns}	91. 64**	0. 0039*	0. 542**	0/002 ^{ns}
A×C	3	0. 488 ^{ns}	0. 72**	33. 58 ^{ns}	0. 0013 ^{ns}	0. 466**	0. 016 ^{ns}
B×C	1	0. 722 ^{ns}	2. 32**	91. 43*	0. 002 ^{ns}	0. 245*	0. 107**
A×B×C	3	0. 80 ^{ns}	0. 72**	29. 92 ^{ns}	0. 0022 ^{ns}	0. 118 ^{ns}	0. 006 ^{ns}
اشتباه آزمایشی Error	30	0. 441	0. 110	17. 53	0. 0012	0. 053	0. 015
ضریب تغییرات (درصد) C. V(%)		5. 03	5. 08	4. 54	5. 03	3. 85	5. 14

^{ns}, * و ** به ترتیب غیرمعنی‌دار و معنی‌دار در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد

^{ns}, * and ** No-significant and significant at 1 and 5% level of probability, respectively

$$LP (nmol. ml^{-1}) = \left[\frac{(A_{532} - A_{600}) - [(A_{440} - A_{600}) / (MA)]}{157000} \right]^{10^6} \quad (1)$$

که MA جذب مولی ساکارز در غلظت های ۱۰-۱ میلی مولار در ۵۳۲ و ۴۴۰ نانومتر است که به ترتیب ۸/۴ و ۱۴۷ محاسبه شد که نسبتی معادل ۰/۰۵۷۱ می باشد (Du & Bramlage., 1992). میزان پراکسیداسیون لیپید بر اساس نانومول MDA موجود با ازای هر گرم بذر بیان گردید.

انجام عملیات سرزنی (حذف اندام هوایی بوته‌ها) که در رقم سانه در فاصله زمانی ۱۰۰ روز و در رقم آگریا در ۱۱۲ روز پس از کشت صورت گرفت. این زمان مقارن با رسیدگی فیزیولوژیک گیاه است که این مرحله زمانی در نظر گرفته شد که ۷۰ درصد برگ‌ها در هر گلدان رو به زردی رفته و پیر شده باشند. در این مرحله ویژگی‌هایی از

جدول ۲- تجزیه واریانس میانگین مربعات مربوط به شدت بیماری زایی Black scurf در ارقام سیب زمینی تحت تیمار تریکودرما در حضور بیمارگر

Table 2- Analysis of variance on mean square of the Black scurf under *Trichoderma* treatment in infected potato cultivars

منابع تغییرات S. O. V	درجه آزادی df	Black scurf
تکرار Replication	2	29. 81
تریکودرما (A) Trichoderma	3	3164. 435**
رقم (B) Cultivar	1	278. 21**
A× B	3	31. 80**
اشتباه آزمایشی Error	14	2. 82
ضریب تغییرات (درصد) C V(%)		4. 95

ns, * و ** به ترتیب غیر معنی دار و معنی دار در سطوح احتمال ۱ و ۵ درصد

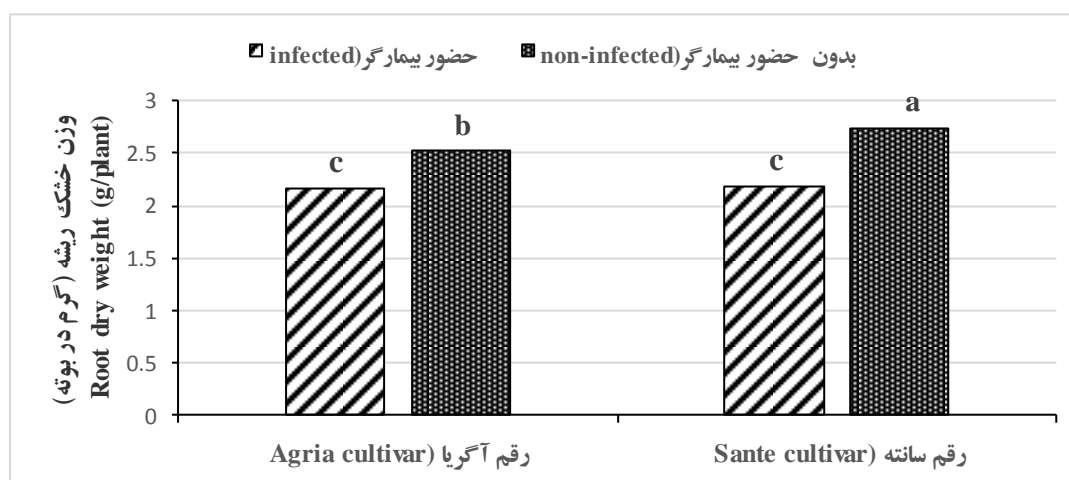
ns, * and ** No-significant and significant at 1 and 5 percent% level of probability, respectively

مشاهده گردید که هر دو رقم در اثر حضور بیمارگر دارای کاهش معنی داری در میزان وزن خشک ریشه در هر بوته بودند، به صورتی که رقم سانتا با میزان ۲/۳۳ گرم در بوته در شرایط شاهد دارای بیشترین وزن خشک ریشه بود. تفاوت معنی داری بین ارقام در شرایط حضور بیمارگر در این صفت مشاهده نشد (شکل ۱).

نتایج حاصل از تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات اصلی و متقابل تیمارهای مورد استفاده بر شدت بیماری زایی Black scurf معنی دار بود (جدول ۲). با توجه به معنی داری اثرات متقابل مقایسه میانگین داده‌ها به منظور تعیین ترکیب تیماری مطلوب مورد بررسی قرار گرفت.

وزن خشک ریشه

در مقایسه میانگین اثرات متقابل رقم در بیمارگر



شکل ۱- اثر متقابل دو گانه رقم و بیمارگر بر وزن خشک ریشه (گرم در بوته) در ریز غده دو رقم سیب زمینی (آگریا و سانتا)

Figure 1- Dual interaction of the cultivar and pathogen on root dry weight of different potato cultivars (g/Plant)

جدول ۳. مقایسه میانگین بین تاثیر قارچ‌های تریکودرما و شاهد بر وزن خشک ریشه (گرم در بوته)

Table 3- Comparison of means between *Trichoderma* spp. and Ctrl on root dry weight (g/plant)

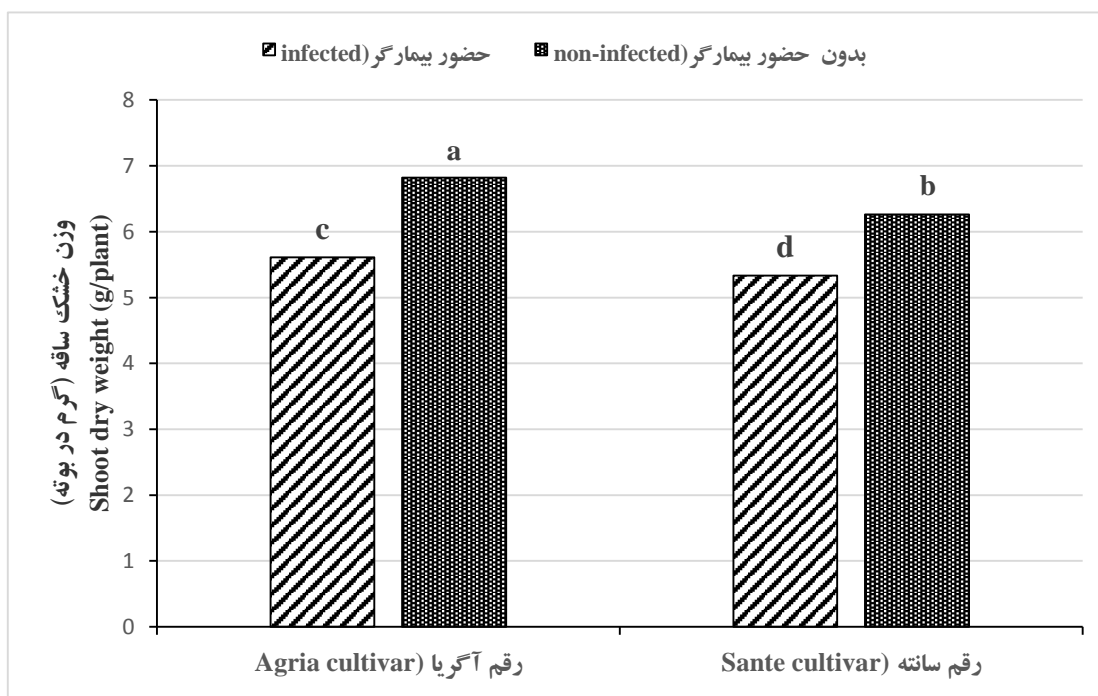
تریکودرما ۱	تریکودرما ۲	تریکودرما ۳	شاهد
Tr1	Tr2	Tr3	ctrl
2.83 a	2.53 b	2.25 c	1.95 d

آنزیم‌ها می‌گردد و در نتیجه باعث افزایش وزن خشک ریشه و بدنبال آن باعث جذب مواد غذایی بیشتر و تاثیر بر وزن زیست توده و عملکرد گیاه می‌گذارد. همچنین در مطالعات دیگر نیز تحریک هورمون‌های داخلی نظیر اکسین و اتیلن را دلیل افزایش ریشه‌های جانبی و در نتیجه افزایش وزن ریشه عنوان نموده‌اند (Harman, 2011).

وزن خشک ساقه

مقایسه میانگین وزن خشک ساقه در هر بوته نشان داد که رقم آگریا در هر دو شرایط تیمار و شاهد (به ترتیب با ۶/۸۲ و ۵/۶۰ گرم در بوته) اختلاف معنی‌دار با رقم سانته در شرایط مشابه داشت.

نتایج حاصل از جدول (۳) مبین این بود که بین جدایه‌های تریکودرما و همچنین شاهد اختلاف معنی‌داری وجود دارد بطوریکه جدایه Tr1 بیشترین تاثیر را بر افزایش وزن خشک ریشه داشت، بصورتی که نسبت به شاهد دارای افزایش ۴۵ درصدی بود. تحقیقی که توسط شورش و همکاران (Shoresh *et al.*, 2008) در خصوص پروتئومیکس ذرت صورت پذیرفت منجر به کشف پروتئین‌های جدیدی در منطقه ریشه و ساقه گردید که دلیل این امر را منوط به وجود آنزیم‌های کتینولیتیک، فروکتوکیناز، پراکسیداز و همچنین پروتئین‌های دخیل در فرآیند فتوسنتز و سنتز کربوهیدرات در گیاه می‌دانستند که در حضور وجود تریکودرما باعث افزایش فعالیت این

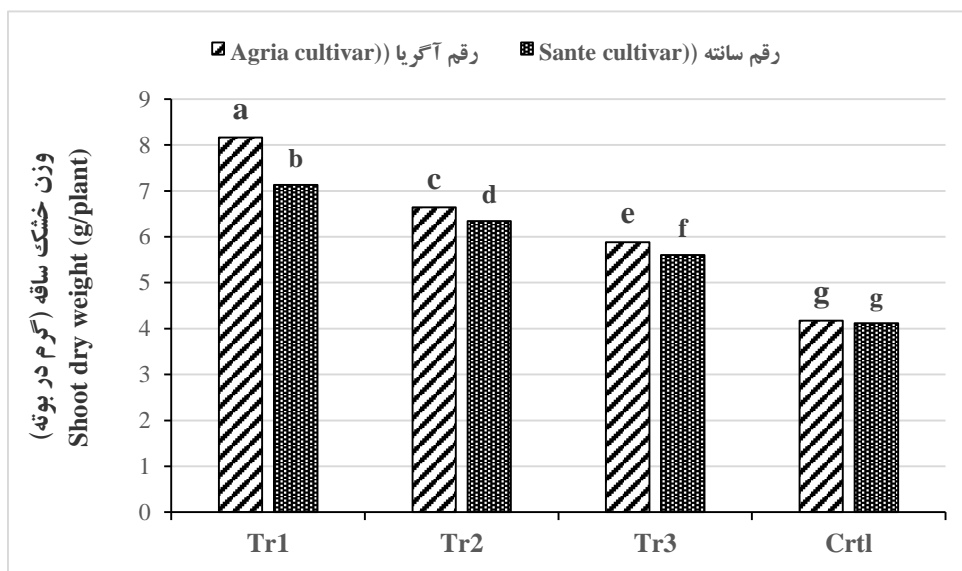


شکل ۲- اثر متقابل رقم و بیمارگر بر وزن خشک ساقه (گرم در بوته) در ریزغده سیب‌زمینی

Figure 2- Interactions of cultivar and pathogen on the shoot dry weight of potato mini tubers (g/plant)

نتایج نشان داد (شکل ۳) که پاسخ رقم آگریا به تیمارهای مورد استفاده در مقایسه با رقم سانته بهتر بود همچنین در مقایسه با شاهد ترکیب تیماری Tr1 و رقم آگریا با ۹۵ درصد افزایش وزن خشک ساقه روبرو شد.

بر اساس نتایج به دست آمده (شکل ۲)، تیمارهای قارچ تریکودرما دارای تاثیر معنی داری روی وزن خشک ساقه در ارقام مورد مطالعه داشت و در بین تیمارها ترکیب تیماری Tr1 و رقم آگریا با ۶/۸۲ گرم وزن خشک ساقه در بوته نسبت به سایر تیمارها تاثیرپذیری بیشتری داشت.

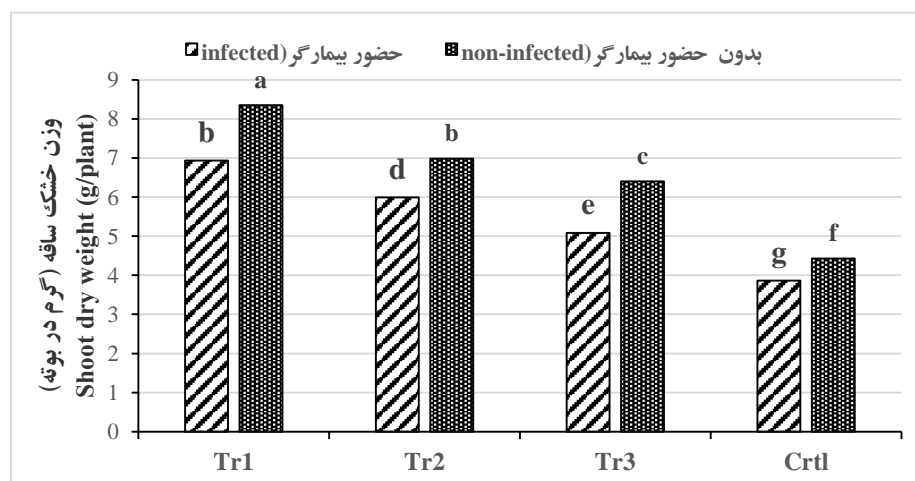


شکل ۳- اثر متقابل دوگانه رقم و تریکودرما بر وزن خشک ساقه (گرم در بوته) در ریزغده‌های سیب‌زمینی

Figure 3- Dual interactions of the cultivar and *Trichoderma* on the shoot dry weight of the potato mini tubers (g/plant)

کاهش در تیمار Tr1 (۶/۹۳ گرم در بوته، افزایش ۸۰ درصدی نسبت به شاهد) مشاهده گردید.

طبق اطلاعات مندرج در شکل (۴)، در شرایط حضور بیمارگر وزن خشک ساقه با کاهش روبرو شد، به طوری که بیشترین کاهش در شاهد (۳/۸۶ گرم در بوته) و کمترین



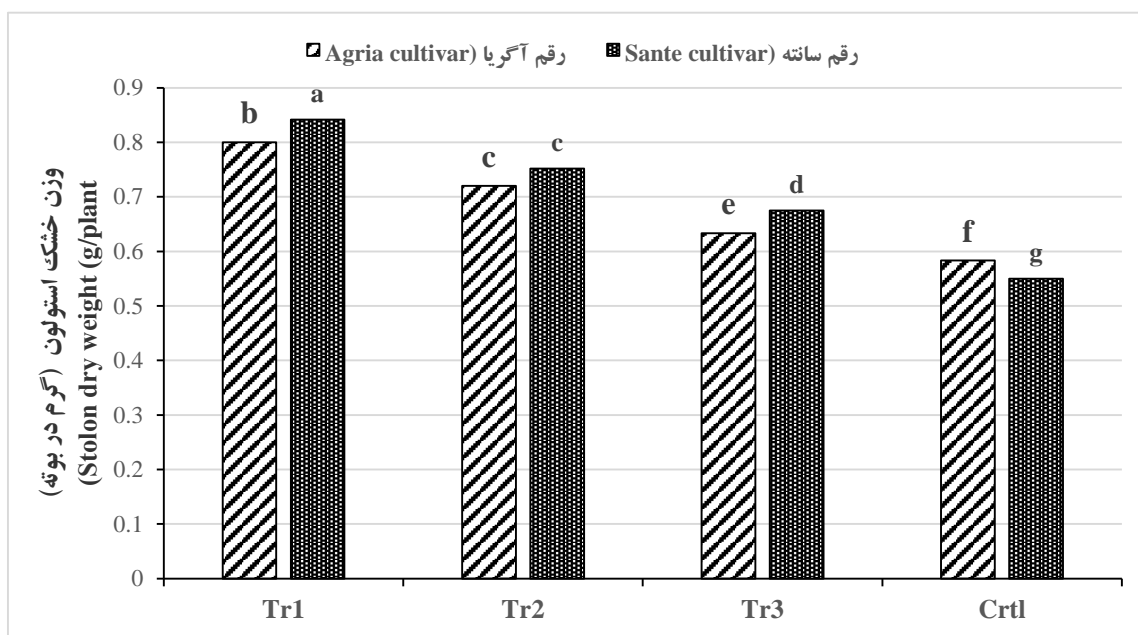
شکل ۴- اثر متقابل دوگانه بیمارگر و تریکودرما بر وزن خشک ساقه (گرم در بوته) در ریزغده‌های سیب‌زمینی

Figure 4- Dual interactions of the pathogen and *Trichoderma* on the shoot dry weight of potato minitubers (g/plant).

وزن خشک استولون

اثر متقابل تریکودرما و رقم روی وزن خشک استولون در هر بوته معنی دار گردید (جدول ۱). نتایج نشان داد که رقم سانته نسبت به رقم آگریا در همه تیمارها دارای افزایش معنی داری بود (شکل ۵)، در صورتیکه در شرایط شاهد وزن خشک استولون در رقم آگریا بیشتر بود. نتایج نشان داد که بیشترین وزن خشک استولون در ترکیب تیماری Tr1 و رقم سانته به دست آمد و اختلاف معنی داری نسبت به سایر تیمارهای مورد استفاده داشت (۵۲ درصد افزایش نسبت به شاهد).

نتایج به دست آمده با نتایج شورش و همکاران (Shoresh *et al.*, 2010) و پیترز و همکاران (Pieterse *et al.*, 2014) مطابقت داشت. ایشان در مطالعات خود، جذب عناصر ریز مغذی و همچنین تحریک هورمون‌های داخلی همچون اکسین و سیتوکینین را عامل افزایش ماده خشک عنوان نمودند. از طرفی با توجه به اینکه بعضی از گونه‌های تریکودرما از جمله، *T. harzianum* و *T. viride* با برخورداری توأم از خواصی مثل میکوپارازیسیسم، آنتی‌بیویزیس و قابلیت رقابت ساپروفیتی قادرند جمعیت قارچ‌های بیماری‌زا را به میزان قابل توجهی کاهش دهند (Harman *et al.*, 2012) و بدین ترتیب باعث بهبود رشد گیاه می‌گردند.



شکل ۵- اثر متقابل دوگانه رقم و تریکودرما بر وزن خشک استولون (گرم در بوته) در ریزغده‌های سیب‌زمینی

Figure 5- Dual interactions of the cultivar and *Trichoderma* on stolon dry weight of the potato mini tubers (g/plant).

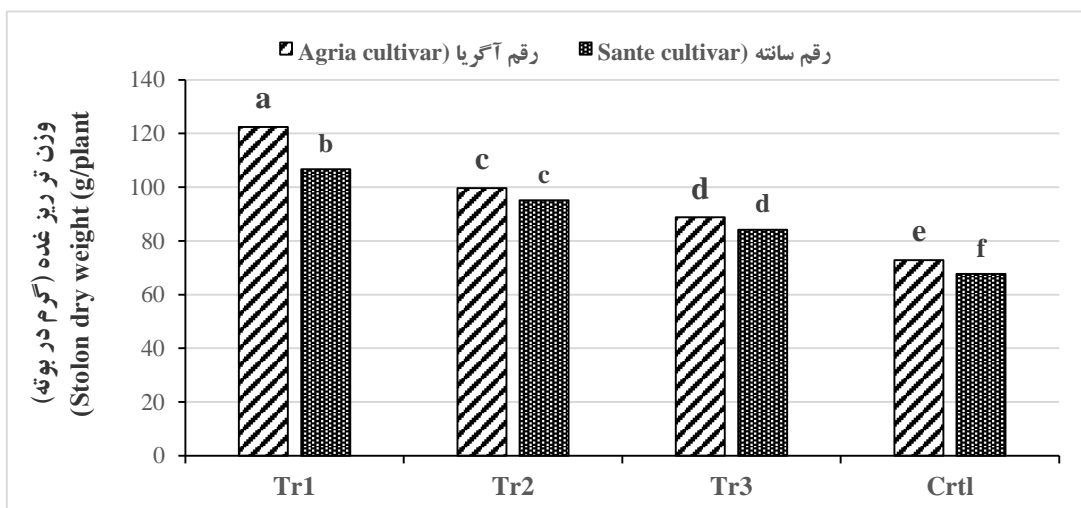
نشان داد که بیشترین وزن ریزغده در ترکیب تیماری Tr1 و رقم آگریا (۱۲۲/۴۲ گرم) مشاهده شد که نسبت به شاهد افزایش ۷۰ درصدی نشان داد. در کل نتایج نشان داد که استفاده از قارچ تریکودرما سبب افزایش وزن ریزغده‌های تولید شده گردید. تریکودرما از طریق

وزن تر ریزغده

وزن تر ریزغده در هر بوته نیز تحت تاثیر معنی دار تیمارهای مورد استفاده قرار گرفت، بطوریکه صرفاً پاسخ ارقام نسبت به جدایه Tr1 معنی دار بود و اختلافی بین ارقام در استفاده از سایر جدایه‌ها بدست نیامد (شکل ۶). نتایج

باعث افزایش منابع دسترس گیاه و ظرفیت فتوسنتزی گردیده و منجر به بهبود زیست توده گیاه مثل وزن تر ریزغده، وزن خشک استولون، وزن خشک ریشه و ساقه می گردد (Harman, 2011; Shores et al., 2010).

افزایش سطح برگ، میزان کلروفیل برگ، میزان قند و کربوهیدراتها و بواسطه فراهمی مواد غذایی از طریق ترشح اسیدهای آلی همچون اسید گلوکونیک اسید سیتریک و اسید فوماریک، حل کردن فسفات، ریزغده‌ها، آهن، منگنز و منیزیم را بهبود بخشیده که

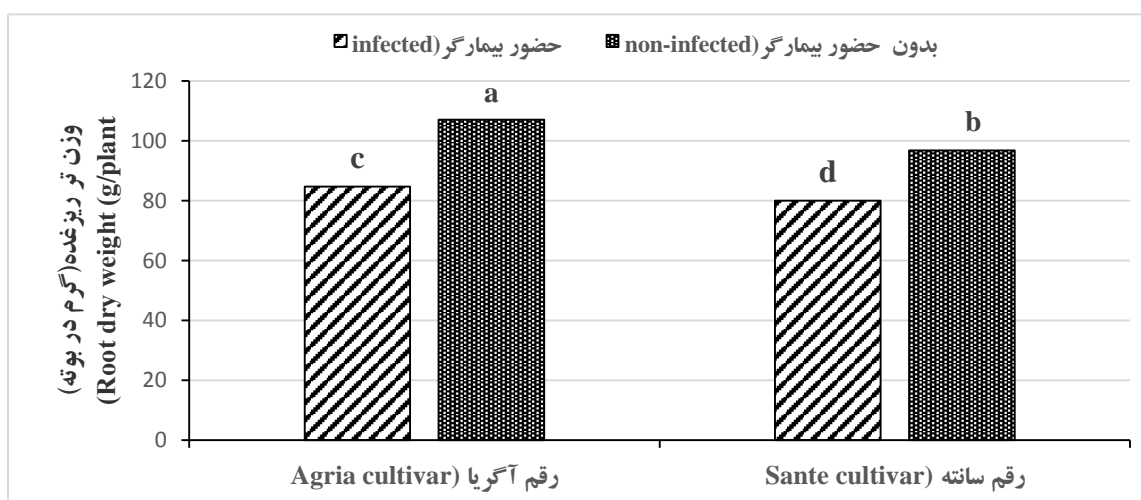


شکل ۶- اثر متقابل دوگانه رقم و تریکودرما بر وزن تر ریزغده‌های (گرم در بوته) سیب‌زمینی

Figure 6- Dual interactions of the cultivar and *Trichoderma* on the fresh weight of the potato mini tubers (g/plant).

بیمارگر و در رقم آگریا (۱۰۷/۰۴۶ گرم) و کمترین وزن تر ریزغده در شرایط حضور بیمارگر و رقم سانه (۸۰/۱۰۳) حاصل شد.

اطلاعات مندرج در شکل (۷) نشان می‌دهد که حضور بیمارگر تاثیر معنی‌داری بر وزن تر ریزغده داشت، بطوریکه بیشترین وزن تر ریزغده در شرایط بدون حضور



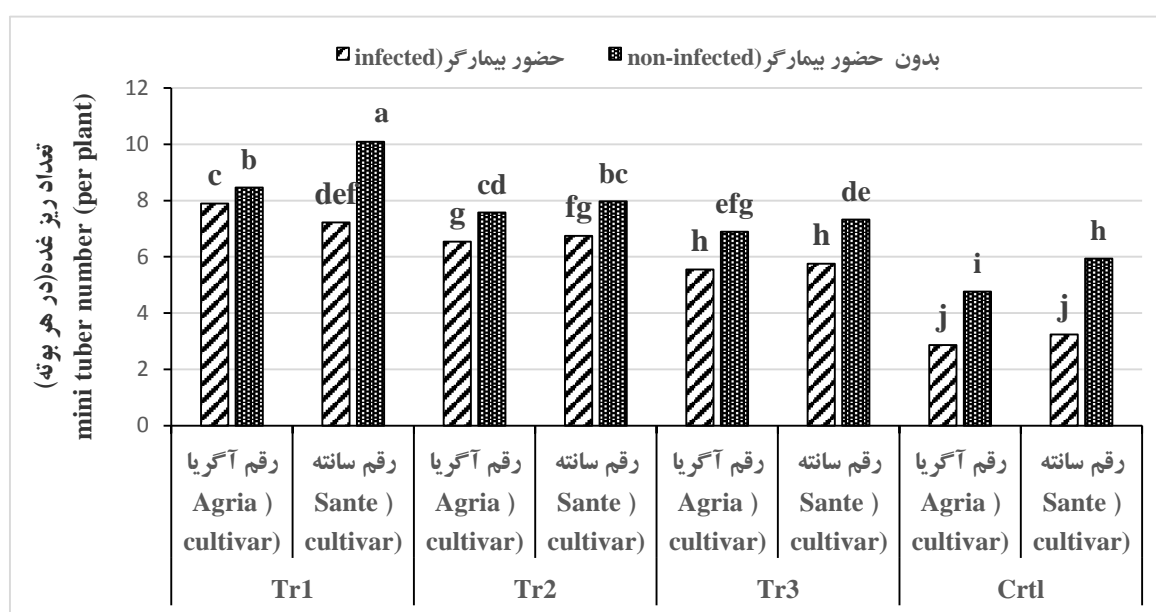
شکل ۷- اثر متقابل دوگانه رقم و بیمارگر بر وزن تر ریزغده (گرم) در ریزغده سیب‌زمینی

Figure 7- Dual interactions of the cultivar and Pathogen on the potato mini tubers Fresh weight (g/plant).

شاهد افزایش ۱۷۵ درصدی بود. حسنی و همکاران (Hassani *et al.*, 2016) گزارش نمودند که استفاده از عوامل زیستی (باکتری‌های محرک رشد) بر عملکرد و جذب عناصر غذایی تاثیر گذاشته و تعداد ریز غده سیب زمینی را به طور معنی داری افزایش داده است. که این امر بواسطه کاهش استفاده از نهاده‌های شیمیایی صرفه اقتصادی بیشتری را برای تولید کننده به همراه خواهد داشت.

تعداد ریز غده

تعداد ریز غده تولیدی در هر بوته تحت تاثیر معنی دار اثرات متقابل سه گانه قرار گرفت. بیشترین تعداد ریز غده در ترکیب تیماری Tr1 بدون حضور بیمارگر رقم سانته (۱۰/۰۹) به دست آمد که نسبت به شرایط مشابه در شاهد افزایش ۷۰ درصدی نشان داد. در شرایط حضور بیمارگر ترکیب تیماری Tr1 و رقم آگریا منجر به تولید بیشترین تعداد ریز غده گردید (۷/۸۹) که نسبت به شرایط مشابه



شکل ۸- اثر متقابل سه گانه رقم، تریکودرما و شرایط حضور یا عدم حضور عامل بیماری‌زا بر تعداد ریز غده در ارقام سیب زمینی (در هر بوته)

Figure 8- Triple interaction of the cultivar, *Trichoderma*, and the free and infected of the pathogen on the number of the mini tuber in different potato cultivars (per plant).

درصد آلودگی) روی داد که این میزان در تیمار Tr1 با ۸۶ درصد کاهش نسبت به شاهد معادل ۹/۲۶ درصد بود (شکل ۱۰). نتایج همچنین نشان داد که شدت بیماری‌زایی در بین ارقام نیز معنی دار بود، بطوری که شدت آلودگی به بیماری در رقم آگریا (۳۰ درصد) نسبت به سانته (۳۸ درصد) کمتر و معنی دار بود (شکل ۱۱). تریکودرما از طریق مکانیسم‌های متفاوتی همانند رقابت، آنتی بیوز، میکوپارازیتسم و ... باعث کنترل عوامل بیماری‌زا می‌گردند (Harman *et al.*, 2012). تریکودرما از طریق تولید آنتی بیوتیک‌ها و مواد ضد میکروبی

تعداد استولون

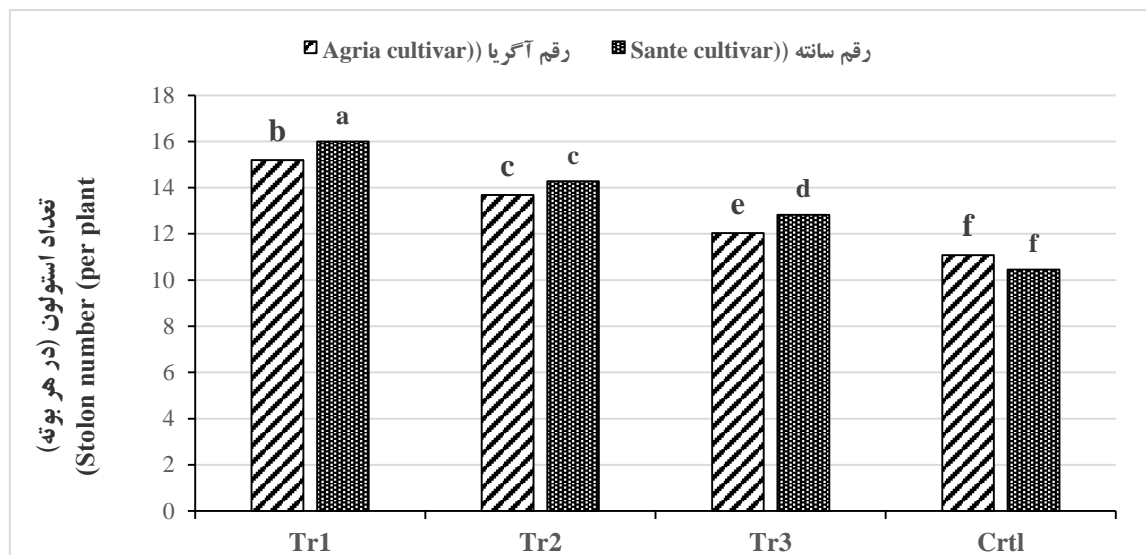
بررسی تاثیر تیمارها بر تعداد استولون در هر بوته نشان داد که اثر تیمار Tr1 و Tr3 بر تعداد استولون معنی دار بود، بطوریکه بیشترین تعداد استولون (۱۵/۹۹) در رقم سانته مشاهده شد که نسبت به شرایط مشابه شاهد دارای افزایش ۵۳ درصدی بود (شکل ۹).

شدت بیماری‌زایی

مقایسه میانگین تیمارها نشان داد که بیشترین شدت Black scurf در شرایط شاهد و بدون حضور تریکودرما (۶۵

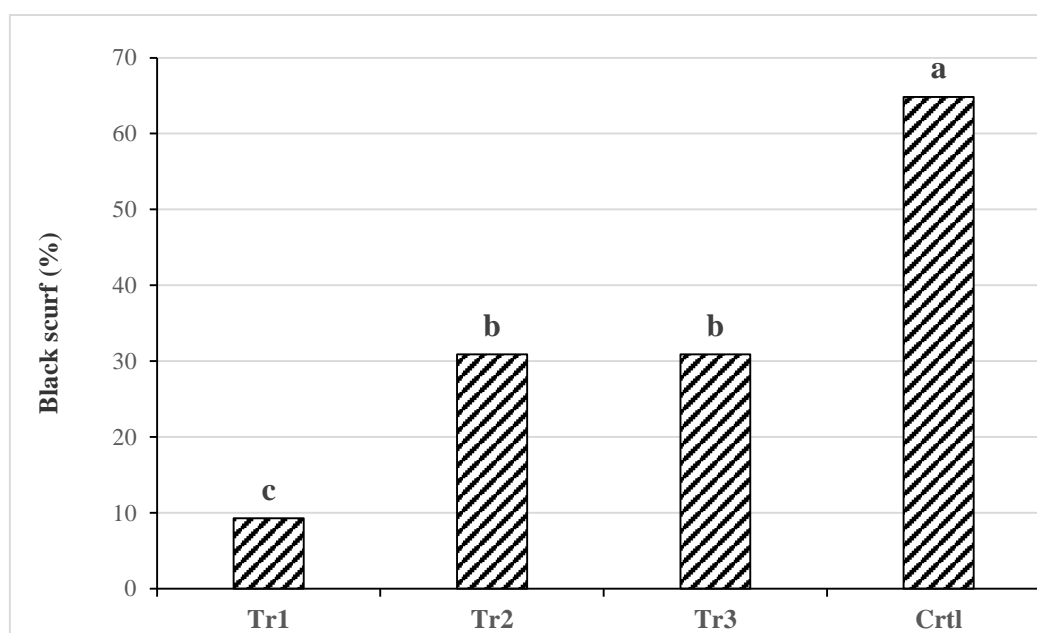
تولید اتیلن را در گیاه در واکنش به حضور عامل بیماری زا تحریک نمایند و باعث کاهش شدت بیماری در گیاه گردند (Druzhinina *et al*, 2011; shoresh *et al.*, 2010).

همچون هارزیانیک، آلامتیسین، تریکولین، پیتابولها، آنتی بیوتیکها، ۶-فیل-آلفا-پیرون، ویریدین، گلايوویریدین و هپتیدیک اسید باعث تولید آنزیمهای زیلاتاز و سلولاز و همچنین متابولیت‌های غیر آنزیمی که می‌توانند به طور مستقیم



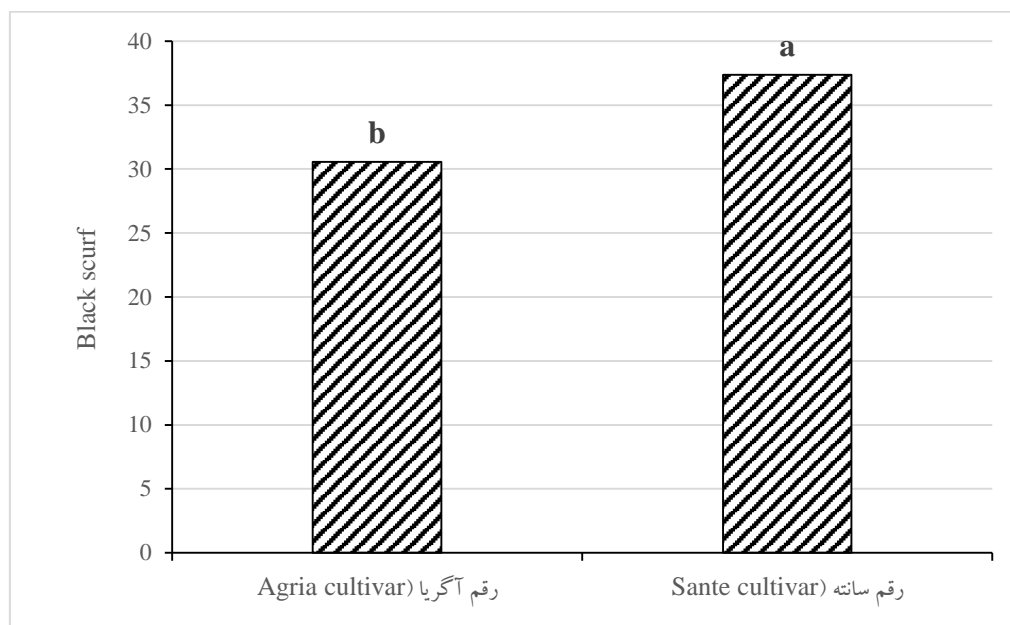
شکل ۹- اثر متقابل دوگانه رقم و تریکودرما بر تعداد استولون در ریزغده سیب‌زمینی (در هر بوته)

Figure 9- Dual interaction of the cultivar and *Trichoderma* on the stolon number in different mini tuber of potato cultivars (per plant).



شکل ۱۰- اثر تریکودرما بر شدت بیماری زایی Black scurf در ریزغده سیب‌زمینی

Figure 10- The effect of *Trichoderma* on the Black scurf severity in the potato mini tubers



شکل ۱۱- مقایسه میانگین ریزغده ارقام سیب زمینی در برابر اثر شدت بیماری زایی Black scurf

Figure 11- Copmpertion of mean on the Black scurf severity in the potato mini tubers

نسبت به شاهد افزایش معنی داری نشان داد. البته حضور بیمارگر نیز باعث افزایش میزان پرولین گردید ولی در شرایط شاهد تغییر معنی داری صورت نپذیرفت. بیشترین میزان پرولین در شرایط حضور بیمارگر به ترکیب تیماری Tr1 و رقم آگریا (با افزایش ۳۰۵ درصدی نسبت به شاهد) تعلق داشت (جدول ۴). انباشت پرولین نقش بسیار موثری در تطابق و سازگاری گیاه با شرایط تنش دارد. نقش مهمی در تنظیم اسمز درون سلولی، پایدار کردن ساختار پروتئین و غشاء سلولی، جاروب کردن گونه‌های اکسیژن رادیکال (ROS)، تنظیم PH سلولی و واکنش‌های اکسیداسیون و احیاء دارد و ارتباط مستقیمی با سیستم‌های دفاعی گیاه در برابر پاتوژن‌ها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانسی دارد (Cecchini *et al.*, 2011). همانطور که نتایج نشان داد تیماری که باعث افزایش محتوی پرولین گردید توانست در شرایط حضور عامل بیماری باعث بهبود مولفه‌های رشدی و همچنین فعالیت آنزیمی گردد.

بررسی صفات بیوشیمیایی ریز غده‌های

سیب زمینی

فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز (APX)

با توجه به نتایج مندرج در جدول (۴)، در خصوص فعالیت آنزیم APX در شرایط عدم حضور بیمارگر، تیمار Tr1 در هر دو رقم باعث افزایش معنی داری در میزان فعالیت این آنزیم گردید، به طوری که بیشترین میزان فعالیت در رقم آگریا با افزایش ۱۶۸ درصدی نسبت به شاهد صورت پذیرفت. حضور بیمارگر باعث تشدید فعالیت آنزیم گردید، به نحوی که در این تیمار، حداکثر فعالیت آنزیم APX در رقم آگریا با افزایش ۲۱۶ درصدی نسبت به شاهد مشاهده شد.

محتوی پرولین

نتایج در خصوص محتوی پرولین نشان داد که در شرایط بدون حضور بیمارگر، تیمار Tr1 تاثیر معنی داری بر این صفت داشت، چرا که در هر دو رقم محتوی پرولین

جدول ۴- تاثیر رقم و تریکودرما بر فعالیت آنزیم آسکوربات پراکسیداز، محتوای پرولین و مالون دی آلدهید در ریزگده سیب

زمینی در برابر قارچ *Rhizoctonia solani*

Table 4- The effect of cultivar and *Trichoderma* on APX activity, proline and malondialdehyde activity in the potato minitubers against *Rhizoctonia solani*

تیمار Treatment	Cultivar	آسکوربات پراکسیداز (میکرومول آسکوربات بر دقیقه در میلی گرم پروتئین) APX activity, $\mu\text{mol ascorbate oxidized}/(\text{min mg}^{-1} \text{ protein})$		محتوای پرولین (میکرومول در وزن تر) Proline content ($\mu\text{mol/g FW}$)		مالون دی آلدهید (میکرومول بر وزن تر) MDA ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{ FW}$)	
		بدون بیمارگر Pathogen-free	با بیمارگر Pathogen-infected	بدون بیمارگر Pathogen-free	با بیمارگر Pathogen-infected	بدون بیمارگر Pathogen-free	با بیمارگر Pathogen-infected
		Tr1	آگریا Agria	43.66 ^c	76.66 ^a	8.22 ^c	14.69 ^a
	سانته Sante	44 ^c	65.66 ^b	8.15 ^c	11.56 ^b	3.97 ^d	8.28 ^b
Ctrl (شاهد)	آگریا Agria	32 ^d	19 ^{ef}	5.97 ^d	3.57 ^e	3.35 ^d	13.33 ^a
	سانته Sante	16 ^f	24 ^{de}	2.98 ^e	3.60 ^e	3.62 ^d	14.2 ^a

پراکسیداسیون لیپید (MDA)

نتایج (جدول ۴) مبین آن بود که پراکسیداسیون لیپید نیز تحت تاثیر تیمار تریکودرما قرار گرفت، بطوری که کمترین پراکسیداسیون لیپید در تیمار Tr1 و رقم آگریا (۵/۶۱ میکرومول بر وزن تر) بود که نسبت به شاهد دارای کاهش ۶۰ درصدی بود. نظر به اینکه پراکسیداسیون لیپید یکی از مارکرهای اندازه گیری در خصوص میزان مقاومت و تغییرات آنزیم های آنتی اکسیدانتی می باشد بنابراین طبق نتایج به دست آمده، استفاده از تیمار Tr1 توانست باعث کاهش پراکسیداسیون لیپید گردد که یکی از علل آن را می توان به نقش مهم فعالیت سیستم آنتی اکسیدانتی و همچنین محتوای بالای پرولین ارتباط داد. نتایج تحقیق حاضر با نتایج شورش و همکاران (Shoresh et al, 2010) که نشان دادند قارچ تریکودرما محرک مناسبی برای القاء شدن آنزیم ها از جمله منابع مورد استفاده سنتز پراکسیداز و ساز و کارهای دفاعی گیاه شده است، انطباق دارد، این آنزیم در فرایند سنتز برخی ترکیبات دفاعی از جمله پراکسید هیدروژن و لیگنینی شدن

دیواره سلولی گیاه دخالت دارد. همچنین باعث ایجاد پل های عرضی هیدروکسی پرولین موجود در دیواره سلول های ریشه می شود که نتیجه آن، مقاوم سازی بافت های ریشه در برابر عامل بیمارگر است. این کارکردها نشان از اهمیت این آنزیم در فرایندهای مرتبط با و اکنش های دفاعی گیاه دارد.

نتایج تحقیق حاضر با نتایج ویلسون و همکاران (Wilson et al., 2008) که نشان دادند استفاده از تریکودرما باعث کاهش تولید غده های ریز، افزایش وزن و تعداد غده های تولیدی و همچنین کاهش معنی دار شدت Black scurf غده های تولیدی تحت تیمار مذکور می شود، انطباق داشت. نتایج مطالعات نشان داده که افزایش آلودگی استولون و ساقه که منجر به کاهش وزن و تعداد آن می شود ارتباط معنی داری با کاهش تعداد غده های تولیدی دارد (Atinkson et al., 2011; Brierley 2016). در مجموع با نظر به این که غده سیب زمینی در انتهای استولون پس از تورم آن و ورود به فاز غده زایی شکل می گیرد، هر عاملی که زمینه ساز

ساز و کارهای دفاعی گیاه می‌شود.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج این تحقیق نشان داد که استفاده از جدایه‌های تریکودرما با زادمایه سبوس گندم تأثیر بسزایی در کنترل بیماری ریزوکتونیا سولانی دارد. آلودگی به این بیماری خسارات جبران‌ناپذیری بر تولید و عملکرد سیب‌زمینی وارد می‌کند و از سویی یکی از مهم‌ترین شاخص‌های اندازه‌گیری سلامت بذرهای گواهی شده به شمار می‌رود. ترکیب تیماری Tr1 و رقم آگریا تأثیر گذارترین تیمار در کنترل بیماری بود و در سایر شاخص‌های گیاهی و همچنین تولید ریزغده سیب‌زمینی هم تأثیر معنی‌دار و محسوسی داشت. نتایج این تحقیق می‌تواند در خصوص تولید بذرهای با کیفیت بیشتر با استفاده از عوامل کنترل‌کننده زیستی و ارتقای شاخص‌های سلامت بذر بسیار تأثیرگذار و مفید باشد.

افزایش تعداد استولون شود و همچنین وزن خشک آن را افزایش دهد به عنوان یک گزینه در راستای افزایش تعداد و وزن ریزغده‌های تولیدی قابل توجه خواهد بود.

استفاده از تریکودرما باعث کنترل بیماری در سیب‌زمینی گردید که این مهم بوسیله، فعال‌سازی سیستم آنتی‌اکسیدانتی و افزایش پروتئین‌های مرتبط با دفاع بر علیه پاتوژن‌ها^۱ در گیاه می‌باشد؛ وجود سیستم‌های آنتی‌اکسیدانتی به ویژه آنزیم‌های گلوکاتایون پراکسیداز (GPX)، آسکوربات پراکسیداز (APX) و نظایر آن که نقشی اساسی در تقویت دیواره سلولی داشته و باعث تحریک سیستم ایمنی گیاه (از جمله مسیرهای غیر آنزیمی سالیسیلیک اسید و جاسمونیک اسید) می‌شوند و از طرفی کاهش پراکسیداسیون لیپیدها را به همراه دارند، از عوامل مهم دیگر در کنترل بیماری می‌باشند (Malolepsza et al., 2017; Martinez-Medina et al., 2013). قارچ تریکودرما محرک مناسبی برای القاء شدن یک‌سری از آنزیم‌ها از جمله منابع مورد استفاده سنتز پراکسیداز و

Reference

منابع

- Arabi, S.I., and M. Khan. 2014. Sensitivity of *Rhizoctoniasolani* to fungicides. Oral Technical Session: Disease Control and Pest Management. 2014 APS-CPS Joint Meeting, August 9-13, Minneapolis, Minnesota, USA.
- Atkinson, D., M.K. Thornton, and J.S. Miller. 2011. Development of *Rhizoctoniasolani* on Stems, Stolon and Tubers of Potato II. Efficacy of Chemical Applications. *Am. J. Potato Res.* 88:96–103.
- Bates, L.S., R.P. Waldren, and L.D. Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* 39: 205-207.
- Brewer, M.T., and R.P. Larkin. 2005. Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solanion* potato. *Crop Prot.* 24: 939–950.
- Cavalcante, R.S., H.L.S. Lima., G.A.S. Pinto., C.A.T Gava, and S. Rodrigues. 2008. Effect of Moisture on *Trichoderma Conidia* Production on Corn and Wheat Bran by Solid State Fermentation. *Food Bioprocess Technol.* 1:100–104.
- Cecchini, N.M., M.I. Monteoliva, and M.E. Alvarez. 2011. Proline dehydrogenase contributes to pathogen defense in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 155: 1947–1959.
- Druzhinina, I.S. V. Seidl-Seiboth., A. Herrera-Estrella., B.A. Horwitz., C.M. Kenerley., E. Monte., P.K. Mukherjee., S. Zeilinger., I.V. Grigoriev, and C.P. Kubicek. 2011. *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9: 749–759.

¹ Pathogenesis-related protein

- Du, Z., and W.J. Bramlage. 1992.** Modified thiobarbituric acid assay for measuring lipid oxidation in sugar-rich plant tissue extracts. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1566-1570.
- Harman, G.E., T. Björkman., K. Ondik, and M. Shores.** 2008. Changing paradigms on the mode of action and uses of *Trichoderma* Spp. For Biocontrol. *Outlooks Pest Manage.* 19: 24-9.
- Harman, G.E. A.H. Herrera-Estrella., B.A. Horwitz, and M. Lorito.** 2012. Special issue: *Trichoderma* – from basic biology to biotechnology. *Microbiol.* 158: 1–2.
- Harman, G.E., C.R. Howell., A. Viterbo., I. Chet, and M. Lorito.** 2004. *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2: 43–56.
- Hassani, F., A. Asgharzadeh., M. Ardakani, and A. Hamidi.** 2016. The impact of potato mini-tuber inoculation with plant growth promoting rhizobacteria on tuber yield and nutrients uptake. *j. crop. improv.* 17: 911-924. (In Persian, with English Abstract)
- Heath, R.L., and L. Packer.** 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: Kinetics an stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 125:189–198.
- Karimian, B., M. Javan-Nikkhah., D. Zafari., Kh.B. Fotouhifar, and S Naeimi.** 2014. Phylogenetic structure of *Trichoderma harzianum* s. l. from some climates of Iran. *Iran. J. Plant. Prot. Sci.* 45: 59-69. (In Persian, with English Abstract)
- Kumar, S.S. M.R. Krishna Rao., , R. Deepak Kumar., S. Panwar, and C. S. Prasad.** 2013. Biocontrol by plant growth promoting *rhizobacteria* against black scurf and stem canker disease of potato caused by *Rhizoctoniasolani*. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 46: 487–502.
- Larkin, P., and B. Robert.** 2016. Impacts of biocontrol products on *Rhizoctonia* disease of potato and soil microbial communities, and their persistence in soil. *Crop Prot.* 90: 96-105.
- Malolepsza, U., J. Nawrocka, and M. Szczech.** 2017. *Trichoderma virens* 106 inoculation stimulates defence enzyme activities and enhances phenolic levels in tomato plants leading to lowered *Rhizoctoniasolani* infection. *Biocontrol. science technol.* 27: 180–199.
- Martinez-Medina, A., I. Fernandez., M.J. Sánchez-Guzman., S.C. Jung., J.A. Pascual., and M.J. Pozo.** 2013. Deciphering the hormonal signalling network behind the systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* in tomato. *Front. Recent Dev. Plant Sci.* 206: 1–12.
- Nakano, Y., and K. Asada.** 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* 22: 867-880.
- Pieterse C.M.J J. C. Zamioudis., R.L. Berendsen., D.M. Weller., S.C.M VanWees, and P.A.H.M. Bakker.** 2014. Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 52:347–75.
- Shores, M., G.E. Harman, and F. Mastouri.** 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents *Annu. Rev.* 48:1-23.
- Shores, M., and G. Harman.** 2008. The Molecular Basis of Shoot Responses of Maize Seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 Inoculation of the Root: A Proteomic Approach. *Plant Physiol.* 147: 2147–2163.
- Vinale, F., K. Sivasithamparam., E.L. Ghisalberti., R. Marra., S.L. Woo., and M. Lorito.** 2008. *Trichoderma* plant- pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1–10.
- Wilkins, D., and S. Spudman.** 2013. Seed Treatments [Online] Available at <http://spudman.com/index.php/magazine/article/seed-treatments>.
- Wilson, P.S., E.O. Ketola., P.M. Ahvenniemi., M.J. Lehtonen, and J.P.T. Valkonen.** 2008. Dynamics of soilborne *Rhizoctonia solani* in the presence of *Trichoderma harzianum* : effects on stem canker, black scurf and progeny tubers of potato. *Plant Pathol.* 57: 152–161.