

ارزیابی جدایه‌های *Trichoderma* برای کنترل بیولوژیکی بیماری

پژمردگی فوزاریومی خربزه*

Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of Fusarium wilt of melon

آرزو اشرفی‌زاده، حسن رضا اعتباریان** و حمیدرضا زمانی‌زاده

گروه گیاهپزشکی مجتمع آموزش عالی ابوریحان دانشگاه تهران و واحد تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی

پذیرش ۸۳/۸/۱۳

دریافت ۸۱/۸/۱۴

چکیده

برای بررسی امکان کنترل بیولوژیکی *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه پنج جدایه *Trichoderma* *viride* DAR 74290، *T. harziaunm* T39، *T. viride*، *T. harziaunm* M 96 و *Trichoderma* sp 96 علیه قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای بررسی فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های فوق آزمایش‌های مختلفی به کمک روش متقابل و سلوفان انجام گرفت. مساحت پرگنه قارچ عامل بیماری هر روز اندازه‌گیری و درصد کاهش رشد در مقایسه با شاهد محاسبه شد. به‌منظور بررسی اثر جدایه‌های آنتاگونیست در کاهش بیماری در شرایط گلخانه جدایه‌های *Trichoderma* در روی سبوس و قارچ عامل بیماری در روی دانه گندم رشد داده شد و به

* این مقاله براساس قسمتی از نتایج بدست آمده از اجرای طرح تحقیقاتی شماره ۷۲۱/۱/۳۱۸ دانشگاه تهران تهیه گردیده است و بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول می‌باشد.

** مسئول مکاتبه

ترتیب به نسبت ۱۰ و ۱۴ گرم به ازای هر کیلوگرم خاک با خاک گلدان‌ها مخلوط گردید. درصد گیاهان زنده ۳۰ روز پس از کاشت در محاسبات آماری منظور گردید. در آزمایش‌های گلخانه‌ای و آزمایشگاهی از طرح کامل تصادفی استفاده گردید. کاهش رشد میسلیم عامل بیماری در مقابل جدایه‌های آنتاگونیست‌ها به طور معنی‌داری اختلاف داشت ($P < 0.01$) و درصد کاهش رشد در مورد جدایه‌های *Trichoderma* بین صفر تا ۱۰۰ درصد متغیر بود. مواد مترشحه توسط *T. virens* DAR 74290 به‌طور کامل از رشد قارچ عامل بیماری جلوگیری نمود و خاصیت قارچ‌کشی داشت. درصد گیاهان زنده در گلدانهائی که فقط با *Trichoderma* تیمار شده بودند و همچنین شاهد بدون آنتاگونیست و عامل بیماری ۱۰۰ درصد بود. اما درصد گیاهان زنده در تیمارهای تریکودرما به اضافه عامل بیماری نسبت به شاهد سالم از ۵/۳ تا ۶۱/۰۶ درصد متغیر بود. جمعیت عامل بیماری (cfu/g) در خاک گلدان‌ها در خلال آزمایش تقریباً ثابت ماند اما جمعیت جدایه‌های مختلف تریکودرما به مقدار جزئی کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: پژمردگی فوزاریومی، کنترل بیولوژیک، *Trichoderma*، *Fusarium oxysporum* f.

sp. melonis خریزه

مقدمه

بیماری پژمردگی فوزاریومی از بیماریهای مهم جالیز است که عامل آن *Fusarium oxysporum* Schelectend: Fr. f. *sp. melonis* (Lach & Currence) N. C. Snyder & H. N. Hansen می‌باشد که اولین بار در سال ۱۹۳۰ از ایالت‌های نیویورک و مینه‌سوتا گزارش گردید. در حال حاضر بیماری در مناطق وسیعی از آمریکای شمالی، اروپا و آسیا وجود دارد (Scherf & MacNab 1986). این بیماری اولین بار در ایران در سال ۱۳۴۷ از مشهد گزارش شد و نژاد عامل بیماری نژاد ۱ تعیین گردید بنی‌هاشمی (۱۹۶۸). در سال ۱۳۴۸ از طالبی در فارس و در سال ۱۳۵۱ از اصفهان و فارس روی طالبی و گرمک گزارش و نژاد آن در مناطق مذکور نژاد ۲، ۱ تعیین شد بنی‌هاشمی (۱۹۸۲، ۱۹۷۸ و ۱۹۶۸). در ضمن نژاد ۱ این قارچ در منطقه گرمسار شیوع دارد بنی‌هاشمی (۱۹۸۹). گیاهان در تمام مراحل رشدی ممکن است مورد حمله قرار گیرند. عامل بیماری باعث زردی، کوتولگی، پژمردگی و مرگ گیاه می‌شود. علائم بیماری معمولاً بعد از ظهور گل و تشکیل میوه ظاهر می‌گردد. در گیاهان بالغ علائم بیماری معمولاً به

صورت یک طرفه ظاهر شده و ابتدا یک قسمت از گیاه علائم زردی یا پژمردگی را از خود نشان می‌دهد و به تدریج به سایر قسمت‌های گیاه گسترش می‌یابد. ریشه گیاهان آلوده دارای پوسیدگی خشک بوده و ریشه‌های فرعی از بین می‌رود (Sherf & MacNab 1986, Banihashemi 1982). برای کنترل بیماری کاشت ارقام مقاوم، کاربرد سموم گازی و استفاده از سم بنومیل (Sherf & MacNab 1986) می‌تواند در کنترل بیماری مؤثر باشد.

از جمله روش‌های بهینه کنترل که در راستای اهداف زیست‌محیطی می‌باشد و خطر کمتری برای سلامت انسان و محیط زیست دارد کنترل بیولوژیک می‌باشد. وجود خاک‌های بازدارنده برخی از عوامل بیماری‌زا گزارش شده است. از جمله خاک بازدارنده *F. oxysporum* f. *sp. melonis* (F.O.M) در فرانسه توسط لوت و همکاران (Louvet et al. 1976) گزارش شده است. در این میان قارچ‌های جنس *Trichoderma* قابلیت مهارکنندگی جالب توجهی علیه بیماری‌های ناشی از گونه‌های فوزاریوم نشان داده است.

سیوان و چت (Sivan & Chet, 1986) جدایه *T. harzianum* T39 را علیه قارچ‌های *F. oxysporum* f. *sp. melonis*، *F. oxysporum* f. *sp. vasinfectum* و *F. roseum* در خاک‌های طبیعی و آلوده بکار بردند. تیمار خاک و بذر توسط جدایه‌های آنتاگونیست تریکودرما تاثیر یکسانی در کنترل *F. oxysporum* f. *sp. melonis* داشت. ال‌رفائی و همکاران (El-Refaei, 1995) اثر کنترل‌کنندگی خوبی را با کاربرد *T. harzianum* و *Talaromyces flavus* علیه قارچ فوق در شرایط گلخانه و مزرعه مشاهده نمودند. همچنین قارچ‌های *T. viride* و *T. harzianum* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای اثر قابل توجهی در کنترل قارچ *F. oxysporum* f. *sp. lycopersici* عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی نشان دادند (نیک‌نژاد و شریفی‌تهرانی (۱۹۹۳).

در این بررسی اثر جدایه‌های مختلف *Trichoderma* در کنترل قارچ *F. oxysporum* f. *sp. melonis* در آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفته است که نتایج آن ارائه می‌شود.

روش بررسی

جدایه‌های عامل بیماری و *Trichoderma* مورد بررسی

در این بررسی از نژاد ۱ قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* جدا شده از طالبی گرمسار که توسط بنی‌هاشمی از دانشگاه شیراز در اختیار قرار گرفته بود استفاده گردید. جدایه‌های *Trichoderma harzianum* T39 که از ترکیب تجارتي Trichodex جدا شده بود (Etebarian et al. 2000) و *Trichoderma (Gliocladium) virens* که توسط آیلین اسکات از دپارتمان بیولوژی مولکولی کاربردی دانشگاه آدلاید استرالیا و جدایه‌های *T. harzianum* M و *Trichoderma viride* که توسط روحانی از دانشگاه بوعلی‌سینا همدان در اختیار قرار گرفته بود استفاده شد. در ضمن از جدایه *Trichoderma* sp. 96 که از ریزوسفر بوته‌های خیار گلخانه‌ای در منطقه ورامین جدا شده بود/شرفی‌زاده (۲۰۰۱) در آزمایش‌ها به کار برده شد.

اثر جدایه‌های *Trichoderma* روی قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* در آزمایشگاه

اثر جدایه‌های *Trichoderma* روی عامل بیماری با روش کشت متقابل

در این بررسی از ۵ جدایه تریکودرما که در فوق‌ذکر شد استفاده گردید. آزمایش در دو مرحله انجام گرفت. در مرحله اول جدایه‌های تریکودرما همزمان با عامل بیماری کشت داده شدند و در مرحله دوم جدایه‌های تریکودرما ۲۴ ساعت بعد از عامل بیماری کشت داده شدند. برای انجام آزمایش از تشتک پتری حاوی ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز‌آگار (PDA) استفاده شد. در یک طرف تشتک قرصی به قطر ۶ میلی‌متر از حاشیه کشت ۳ روز قارچ عامل بیماری و در طرف مقابل قرصی از حاشیه کشت جوان تریکودرما به فاصله یک سانتیمتر از لبه تشتک قرار داده شد (Dennis & Webster 1971a). برای شاهد از یک قرص محیط‌کشت PDA خالص به جای *Trichoderma* استفاده شد. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای 25°C نگهداری شدند. قطر کلنی قارچ عامل بیماری در هر روز اندازه‌گیری و سپس مساحت پرگنه محاسبه و درصد کاهش رشد با مقایسه با شاهد در هر روز محاسبه گردید. درصد‌های بدست آمده با استفاده از فرمول $\text{ArcSin}\sqrt{\%}$ تبدیل به اعدادی گردید که به توزیع نرمال نزدیکتر باشند و سپس اعداد بدست آمده در محاسبات آماری منظور گردید (Little & Hill 1978). داده‌های تبدیل شده با استفاده از نرم‌افزار MSTATC مورد تجزیه و

تحلیل آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح $P < 0.01$ انجام شده است.

بررسی اثر متابولیت‌های غیرفرار تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیموم قارچ عامل بیماری در این آزمایش اثر متابولیت‌های غیرفرار ۵ جدایه تریکودرما با روش سلوفان انجام گردید (Dennis & Webster 1971a, Etebarian et al. 2000). کاغذهای سلوفان (Australia Cellophane, Victoria) به اندازه تشتک پتری بریده و بین ورقه‌های کاغذ صافی در داخل بشر بزرگی با آب مقطر به مدت ۲۰ دقیقه در $121^{\circ}C$ اتوکلا گردید. سپس یک لایه کاغذ سلوفان خشک در روی سطح محیط کشت PDA قرار داده شد. یک قرص از هریک از جدایه‌های تریکودرما به قطر ۶ میلی‌متر در مرکز تشتک پتری روی کاغذ سلوفان قرار گرفت. در تشتک‌های پتری شاهد یک قرص PDA خالص گذاشته شد. اطراف تشتک‌های پتری‌ها با پارافیلیم برای حفاظت بیشتر پوشیده شد. تشتک‌های پتری در دمای $26^{\circ}C$ نگهداری گردید. در یک مرحله کاغذ سلوفان ۲۴ ساعت بعد و در مرحله دیگر ۴۰ ساعت بعد کاغذ سلوفان برداشته شد. قطر پرگنه تریکودرما در دو مرحله به ترتیب ۲/۵ و ۵ سانتیمتر اندازه‌گیری شد. بعد از برداشت سلوفان در وسط پتری از حاشیه کشت ۳ روزه قارچ عامل بیماری قرصی به قطر ۶ میلی‌متر قرار داده شد. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با ۶ تکرار انجام شد و قطر پرگنه قارچ عامل بیماری هر روز اندازه‌گیری و مساحت پرگنه محاسبه و درصد کاهش رشد نسبت به شاهد محاسبه گردید.

بررسی اثر متابولیت‌های فرار (گازی) تریکودرما در رشد میسلیموم قارچ

Fusarium oxysporum f. sp. melonis

در این آزمایش نیز از ۵ جدایه تریکودرما ذکر شده استفاده شد. برای انجام این آزمایش قرصی به قطر ۶ میلی‌متر از حاشیه کشت جوان ۳ روزه تریکودرما در وسط تشتک پتری حاوی PDA قرار داده شد. بعد از گذشت ۲۴ ساعت از حاشیه کشت جوان ۳ روز قارچ عامل بیماری قرصی در وسط پتری حاوی PDA قرار داده شد. با رعایت شرایط سترون درب تشتک پتری حاوی قارچ آنتاگونیست و بیماری برداشته شد و تشتک پتری حاوی قارچ عامل بیماری روی

تشتک پتری حاوی آنتاگونیست وارونه گردید. دور تشتک پتری با نوار پارافیلیم مسدود شد. تشتک‌ها در انکوباتور بادمای 26°C نگهداری شدند و درصد کاهش رشد محاسبه شد. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی شامل ۵ تیمار (جدول ۳) و ۵ تکرار انجام گردید.

بررسی اثر *Trichoderma* روی بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه و طالبی (افزودن آنتاگونیست به خاک) در شرایط گلخانه

برای تهیه مایه قارچ عامل بیماری ۱۰۰ گرم گندم در داخل ارلن‌مایر ریخته و ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. ارلن‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دو مرحله در دو روز متوالی سترون شدند. پس از سرد شدن ارلن‌ها، در کنار شعله و با رعایت احتیاط به هر کدام از ارلن‌ها شش قرص (به قطر ۶ میلیمتر) از کشت جوان (سه روزه) قارچ عامل بیماری در روی محیط کشت PDA اضافه گردید و ارلن‌ها به مدت ۴ هفته در دمای 25°C نگهداری شدند. محتویات ارلن‌ها به داخل پاکت‌های کاغذی سترون منتقل و در دمای اتاق نگهداری، خشک و آسیاب شدند. پودر بدست آمده به مقدار ۱۴ گرم در کیلوگرم خاک اضافه گردید (Frommel et al. 1991). در این آزمایش از نژاد ۱ *F. oxysporum* f. sp. *melonis* استفاده شد. برای تهیه مایه *Trichoderma* سبوس گندم را به مقدار لازم در کیسه‌های پارچه‌ای ریخته و پس از خیساندن آن در آب مقطر با فشار دادن کیسه، آب اضافی سبوس خارج گردید. سپس در هر ارلن‌مایر یک لیتری ۵۰۰ میلی‌لیتر از این سبوس مرطوب اضافه شد. ارلن‌ها در دو روز متوالی هر روز به مدت یکساعت در دمای 120°C در فشار یک اتمسفر اتوکلاو گردید. پس از سرد شدن ارلن‌ها در شرایط سترون به ازای هر ۱۰۰ میلی‌لیتر سبوس 10^8 اسپور از جدایه تریکودرما که در ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون رقیق شده بود اضافه گردید و ارلن‌ها در داخل ژرمیناتور با دمای 27°C زیر نور فلورسنت در رطوبت نسبی ۷۰ درصد به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند (Elad et al. 1980).

در این بررسی از گونه‌های *T. harzianum* M، *T. harzianum* T39، *T. viride*، *T. virens* DAR 74290 و *Trichoderma* sp. 96 و همچنین از مخلوط دو جدایه *T. viride*+*T. harzianum* Bi که در شرکت تلفیق دانه فرموله شده توسط روحانی در اختیار قرار

گرفته بود استفاده شد. آزمایش در قالب یک طرح کامل تصادفی با ۱۴ تیمار (جدول ۴) و سه تکرار انجام شد.

در تیمارهای حاوی تریکودرما میزان ۱۰ گرم مایه تریکودرما روی سبوس به هر کیلوگرم خاک اضافه شد. برای آزمایش‌های گلخانه‌ای از خاک مزرعه + خاک برگ به نسبت ۱ و ۳ استفاده شد. خاک مورد استفاده در سه مرحله پی‌درپی به مدت ۱ ساعت در فشار ۱ اتمسفر و 120°C اتوکلاو شد.

ابعاد گلدانهای مورد استفاده $13 \times 9/5 \times 8$ سانتیمتر بود و همزمان با اضافه کردن آنتاگونیست به خاک ۶ عدد بذر خربزه رقم محلی گرمسار در هر گلدان کاشته شد. بر روی بذر کاشته شده به قطر ۱ سانتیمتر خاک سترون ریخته شد. گلدانها در دمای 25°C در روز و 20°C در شب و شرایط نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی نگهداری شدند. آماربرداری از تعداد گیاهان سالم و بیمار و اندازه‌گیری روند رشدی گیاهان (ارتفاع) هر هفته یک بار به طور مرتب انجام شد و از ساقه گیاهان آلوده، قارچ عامل بیماری مجدد جداسازی گردید. پس از تبدیل درصدهای بدست آمده توسط فرمول $ArcSin\sqrt{\%}$ (Little & Hills 1978). با استفاده از نرم‌افزار MSTATC مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند.

تاثیر جدایه‌های تریکودرما در کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی طالبی از طریق آغشته نمودن بذر به سوسپانسیون اسپور

در این بررسی جدایه‌های تریکودرما که در آزمایش قبلی استفاده شده بود به کار رفت. این آزمایش در قالب یک طرح کامل تصادفی با ۱۲ تیمار (جدول ۴) و ۳ تکرار انجام گرفت. در این آزمون خاک گلدانهای آزمایشی غیر از تیمار شاهد سالم و تیمار تریکودرما یک روز قبل به نسبت ۱۴ گرم با مایه *F. oxysporum* f. sp. *melonis* طبق روشی که در فوق‌ذکر شده بود مخلوط شد. به منظور آغشتن بذر به اسپور تریکودرما ابتدا بذرها توسط هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت ۴ دقیقه ضدعفونی و سه بار توسط آب مقطر شسته شدند و در اتاقک کشت، خشک شدند و سپس به مدت ۵ دقیقه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول ۲ درصد متیل سلولز قرار گرفتند (Vaartaja et al. 1979). بذور چسبناک به مدت ۲ ساعت در سوسپانسیون اسپور

تریکودرما به غلظت ($10^4 \times 0.7 - 0.2$) اسپور در هر میلی‌لیتر قرار داده شدند (Burgess & Hepworth 1996). به منظور تهیه سوسپانسیون اسپور تریکودرما از کشت ده روزه جدایه‌های تریکودرما روی محیط کشت PDA استفاده شد و سوسپانسیون‌هایی با رقت ذکر شده تهیه گردید. کاشت و همچنین نحوه آماربرداری و تجزیه و تحلیل شبیه آزمایش قبلی بود.

تعیین جمعیت عامل بیماری در مایه و خاک

در این آزمایش از محیط کشت انتخابی GNA (Dhingra & Sinclair 1995) که شامل گالاکتوز ۱۰ گرم، نیترات سدیم ۲ گرم، $K_2S_2O_8$ ۳ گرم، آگار ۱۵ گرم و آب یک لیتر بود استفاده گردید. در هر مرحله ۵ گرم از خاک هر گلدان در مجموع ۱۵ گرم از خاک هر تیمار توزین شد. سپس نمونه‌های خاک در هر تیمار در داخل تشتک پتری در دمای محیط قرار گرفت تا خشک شود (Lumsden *et al.* 1989, Chang *et al.* 1986). پس از خشک شدن نمونه‌ها ۱ گرم از نمونه خاک هر تیمار وزن شد و در لوله آزمایش محتوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون ریخته شد. لوله‌های آزمایش هر کدام به مدت یک دقیقه در روی شیکر لوله قرار داده شدند و سپس سوسپانسیونی به رقت 10^{-4} تهیه گردید. از این سوسپانسیون یک میلی‌لیتر در روی محیط کشت GNA ریخته و توسط یک میله شیشه‌ای L مانند به طور یکنواخت روی سطح محیط پخش شد. برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته، تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد تا ظهور پرگنه نگهداری شدند. سپس پرگنه ظاهر شده شمارش و CFU آن در هر گرم خاک محاسبه شد (Etebarian *et al.* 2000). برای تعیین جمعیت عامل بیماری در مایه قارچ یک گرم از گندم آغشته به عامل بیماری پس از خشک شدن در یک هاون چینی سترون خرد شده و سپس سوسپانسیونی با رقت 10^{-4} از آن تهیه گردید و یک میلی‌لیتر آن روی محیط کشت GNA پخش گردید. پس از ظهور کلنی‌ها تعداد آنها شمارش و CFU/g محاسبه گردید.

تعیین جمعیت *Trichoderma* در خاک و همراه با بذر

برای جمعیت تریکودرما در خاک از همان روشی که در فوق گفته شد (Etebarian et al. 2000, Chang et al. 1986, Lumsden et al. 1989) و محیط کشت انتخابی تریکودرما (Elad et al. 1982b) استفاده شد. برای تعیین جمعیت اسپور چسبیده به بذرها به صورت تصادفی تعداد ۳ بذر آغشته شده به هر جدایه تریکودرما انتخاب و در یک لوله آزمایش حاوی ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر در روی شیکر به مدت یک دقیقه خوب تکان داده شد و پس از رقیق نمودن یک میلی‌لیتر از آن محلول روی سطح محیط کشت انتخابی تریکودرما به طور یکنواخت پخش شد. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته، تعداد کلنی‌های ظاهر شده (CFU) برای هر بذر در هر جدایه محاسبه گردید. جمعیت تریکودرما در خاک در ۴ مرحله در زمانهای ۵، ۱۰، ۴۰ و ۷۰ روز پس از کاشت بذر انجام گرفت.

نتیجه

اثر جدایه‌های تریکودرما روی عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه با روش کشت متقابل جدایه‌های تریکودرما مورد بررسی ضمن رشد سریع مانع از رشد و توسعه میسلیوم‌های عامل بیماری شدند. لکن هیچ پیشروی در روی هیف‌های عامل بیماری مشاهده نگردید. در ناحیه برخورد جدایه‌های تریکودرما و عامل بیماری، رشد میسلیوم‌های آنها بسیار اندک و کم تراکم بود. هنگامی که عامل بیماری و جدایه‌های تریکودرما همزمان کشت داده شدند، بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید. موقعی که قارچ عامل بیماری در مقابل جدایه‌های *T.harzianum* M 74290، *T.vires* DAR 96 و *Trichoderma* sp. 96 قرار داده شد در ۱۶۸ ساعت پس از رشد قارچ عامل بیماری نسبت به شاهد به ترتیب ۶۵/۳۹، ۵۸/۱۲ و ۶۸/۵۸ درصد، کاهش رشد مشاهده شد. هنگامیکه عامل بیماری ۲۴ ساعت قبل از تریکودرما کشت شد، درصد کاهش رشد عامل بیماری در مقابل جدایه *Trichoderma* sp. 96 ۵۹/۳۹ درصد بود (جدول ۱).

جدول ۱- درصد بازدارگی از رشد میسلیوم قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* نسبت به

شاهد در بررسی کشت متقابل با آنتاگونیست‌ها ۱۶۸ ساعت بعد از مایه‌زنی

Table 1. Percentage of growth reduction of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* in dual culture to antagonistics 168 h after inoculation

جدایه‌های تریکودرما <i>Trichoderma</i> isolates	% growth inhibition درصد کاهش رشد	
	کشت همزمان Simultaneous culture of Pathogen and <i>Trichoderma</i>	کشت غیرهمزمان culture of pathogen before <i>Trichoderma</i>
<i>T.harzianum</i> M	65.39 a	53.36 b
<i>Trichoderma</i> sp. 96	68.58 a	59.39 a
<i>T.virens</i> DAR 74290	58.12 a	42.2 b
<i>T.viride</i>	10.04 b	0 c
<i>T.harzianum</i> T39	-	46.15 b

اعداد متن جدول میانگین چهار تکرار هستند

تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شدند با آزمون دانکن در سطح $P < 0.01$ دارای اختلاف معنی‌دار دارند.

=- تیمار مورد نظر مورد آزمایش قرار نگرفت

Data are means of 4 replicates.

Significant differences are denoted by different letters within each column at $P < 0.01$ according to Duncan's Multiple range Test.

= Treatments was not included

بررسی اثر متابولیت‌های مایع خارج سلولی تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری

در هنگامیکه کاغذ سلوفان پس از ۲۴ ساعت برداشت شد و عامل بیماری در روی محیط کشت قرار گرفت مشخص گردید متابولیت‌های خارج سلولی *T. vires* DAR 74290 با میانگین ۶۵/۶۲ درصد بازداری بیشترین و *T. viride* با ۳/۳۳ درصد بازداری کمترین میانگین تأثیر را به ترتیب در ۴۸ و ۱۶۸ ساعت بعد از مایه‌زنی در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ عامل بیماری داشتند (جدول ۲).

در هنگامیکه کاغذ سلوفان ۴۰ ساعت بعد از قرار دادن گونه‌های تریکودرما برداشته شد و عامل بیماری در روی محیط کشت قرار گرفت. بین جدایه‌های تریکودرما از نظر تأثیر متابولیت‌های غیرفرار در جلوگیری از رشد میسلیم عامل بیماری اختلاف معنی‌داری

وجود داشت. متابولیت‌های تولید شده توسط *T. virens* DAR 74290 صد درصد از رشد قارچ عامل بیماری جلوگیری نمودند. در صورتیکه در جدایه *T. viride* میانگین درصد بازداری در ۴۸ ساعت و ۱۶۸ ساعت بعد از مایه‌زنی به ترتیب ۱۴ و ۶ درصد بود (جدول ۲).

جدول ۲ - میانگین درصد بازداری رشد میسلیم قارچ *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* نسبت به شاهد در بررسی اثر متابولیت‌های خارج سلولی تریکودرما با روش سلوفان

Table 2. Percentage of growth inhibition of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* by metabolites produced by different isolates of *Trichoderma* using cellophane overlay technique

* زمان برداشتن سلوفان با قارچ آنتاگونیست				
Time of removed of cellophane with antagonistic fungi *				
جدایه‌های تریکودرما <i>Trichoderma</i> isolates	۲۴ ساعت 24 h.		۴۰ ساعت 40h	
	زمان بعد از کشت بیمارگر** Time after pathogen inoculation			
	۴۸ ساعت 48h	۱۶۸ ساعت 168h	۴۸ ساعت 48h	۱۶۸ ساعت 168h
<i>T.virens</i> DAR74290	56.62 a	28.65 a	100 a	100 a
<i>T.harzianum</i> T39	-	-	97.8 b	93.6 ab
<i>T.harzianum</i> M	36.17 b	25.02 a	96.94 b	76.42 ab
<i>Trichoderma</i> sp. 96	22.08 c	21.17 b	51.2 c	30.2ab
<i>T.viride</i> M	3.33 d	8.17 b	14 d	6 b

* مدت زمانی که آنتاگونیست روی سلوفان در تماس با محیط کشت بود.

** مدت زمانی که بیمارگر روی محیط کشت بالا قرار گرفته بود.

اعداد متن جدول میانگین ۶ تکرار می‌باشد.

تیمارهایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون دانکن $P < 0.01$ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

- مورد آزمایش قرار نگرفته است.

Duration at which antagonistic fungi was on cellophane in contact media.

Time the pathogen grew on above media.

Data are means of 6 replicate plates.

Significant differences are denoted by different letters within each column at $P < 0.01$ according to Duncan,s Multiple Range Test

-= Treatments were not included.

بررسی اثر متابولیت‌های فرار در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ *F. oxysporum* f.sp. *melonis*

درصد بازداری از رشد قارچ عامل بیماری در ۱۶۸ ساعت بعد از مایه‌زنی در مورد قارچ *T. virens* DAR 74290، ۵۳/۵۵ حداکثر بوده در مورد قارچ *T. harzianum* T39، ۴۵/۳۴ درصد بود (جدول ۳).

تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* در کاهش بیماری پژمردگی فوزاریومی خربزه در شرایط گلخانه همانطوری که از جدول ۴ استنباط می‌شود بین تیمارهای آزمایشی به احتمال ۹۹ درصد اختلاف معنی‌دار وجود دارد. آلوده کردن خاک گلدان‌های آزمایشی با مایه عامل بیماری باعث ۱۰۰ درصد مرگ در گیاهچه‌های خربزه گردید. بیشترین درصد تعداد گیاهان سالم در تیمار *T. harzianum* T39 و سپس *T. virens* DR 74290 به همراه مایه عامل بیماری مشاهده گردید. کمترین درصد تعداد گیاهان سالم در اثر افزودن اینوکولوم *T. viride* به خاک گلدان آغشته به قارچ عامل بیماری به میزان ۵/۳ درصد مشاهده گردید. جدایه *T. virens* DAR 74290 بیشترین میزان تأثیر را در افزایش رشد گیاهان نشان داد. در آزمایش تأثیر جدایه‌های *Trichoderma* از طریق آغشتن بذر به سوسپانسیون اسپور آنتاگونیست، بیشترین درصد تأثیر در تیمار *T. harzianum* T39 به همراه مایه عامل بیماری به میزان ۸۳/۶۵ درصد دیده شد. تیمار *T. virens* DAR 74290 بیشترین میزان تأثیر را در افزایش رشد گیاه نشان داد (جدول ۴).

تعیین جمعیت عامل بیماری در مایه و خاک

در مایه قارچ عامل بیماری 10^6 CFU (0.58 ± 0.7) در هر گرم تعیین گردید. جمعیت (cfu/g) در آزمایش مربوط به اضافه نمودن تریکودرما به خاک یا بذر تقریباً ثابت ماند. به عنوان مثال جمعیت عامل بیماری هنگامیکه تریکودرما به خاک اضافه شده بود در تیمار *T. virens*+FOM 10^5 (0.45 ± 0.12) در ۵ روز بعد از مایه‌زنی به 10^5 (0.07 ± 0.07) در ۴۰ روز بعد از مایه‌زنی تغییر یافت. در همین تیمار هنگامیکه بذر با تریکودرما آغشته شده بود جمعیت عامل بیماری از 10^5 (0.1 ± 0.3) در ۴۰ روز بعد از مایه‌زنی به 10^5 (0.3 ± 0.2) در ۷۰ روز بعد از مایه‌زنی تغییر کرد.

جدول ۳ - درصد بازداری از رشد میسلیم قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* در اثر

متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما در زمانهای مختلف بعد از مایه‌زنی

Table 3. Percentage of growth inhibition of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* by different isolates of *Trichoderma* (volatile metabolites) various period after inoculation

جدایه‌های تریکودرما <i>Trichoderma</i> isolates	ساعت بعد از مایه‌زنی	
	Hours after inoculation	
	48	168
<i>T.virens</i> DAR 74290	0d	53.35 a
<i>Trichoderma</i> sp. 96	16.27 bc	35.11 b
<i>T.harzianum</i>	37.86 a	37.82 b
<i>T. harzianum</i> T39	25.53 b	45.34 ab
<i>T.viride</i> M	13.89 c	18.45 c

اعداد متن جدول میانگین ۵ تکرار می‌باشند

تیمارهایی که در هر ستون با حروف مختلف نشان داده شدند، با آزمون دانکن در سطح $P < 0.01$ دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

Data are means of 5 replicate plates

Significant differences are denoted by different letters within each column at $P < 0.01$ according to Duncan's Multiple Range Test.

تعیین جمعیت *Trichoderma*

جمعیت تریکودرما (cfu/g) در ۵، ۱۰، ۴۰، ۷۰ روز بعد از مایه‌زنی اندازه‌گیری گردید. به طور کلی جمعیت تریکودرما هنگامی که خاک تریکودرما آغشته گردید کاهش یافت. به عنوان مثال جمعیت تریکودرما در تیمار *T. virens* DAR74290+FOM در ۵، ۱۰، ۴۰ و ۷۰ روز بعد از مایه‌زنی به ترتیب $۲/۴ \times ۱۰^۶$ ، $(۹ \pm ۱/۴) \times ۱۰^۴$ ، $(۷ \pm ۲/۴) \times ۱۰^۴$ و $(۵/۰۵ \pm ۰/۳۶) \times ۱۰^۴$ اندازه‌گیری گردید. جمعیت CFU در بذر در هنگام کاشت در تیمارهای مختلف از $۳/۳ \times ۱۰^۴$ تا $۴/۶ \times ۱۰^۴$ متغیر بود.

جدول ۴- اثر جدایه‌های مختلف *Trichoderma* در کنترل بیولوژیکی بیماری پژمردگی

Table 4. Effect of *Trichoderma* isolates for biological control of *Fusarium* wilt of melon under glasshouse condition

تیمار Treatments	افزودن تریکودرما به خاک Soil treatments		افزودن تریکودرما به بذر Seed treatments	
	ارتفاع بوته (سانتیمتر) Plant height (cm)	درصد گیاهان سالم %healthy plants	ارتفاع بوته (سانتیمتر) Plant height (cm)	درصد گیاهان سالم %healthy Plant
T.v. DAR	23.83 a	100a	25.2 a	100a
T.h. 39	22.73 ab	100a	23.3 abc	100a
T.h. M	21.17 abc	100 a	23. 4 abc	100a
T.v.	22.33 abc	100a	24.6 ab	100a
T.96	20.33 abc	100a	22.27 abc	100a
(T.v.+T.hBi)	18.67 bc	100a	-	-
FOM+T.h39	21.17 abc	61.06 b	22.1 abc	83.65 a
FOM + T.v DAR	19.83 abc	49.97 b	24.27 abc	81.47 ab
FOM+ T.h. M	19 abc	38.87 bc	25.1 a	75.47 ab
FOM+T.96	19.33 abc	21.76 bcd	20. 8 c	44.02 b
FOM	17.67 c	16.43 cde	-	-
+(T.v.+T.hBi)				
FOM+T.v.	19.4 abc	5.3 de	21.37 bc	37.72 b
شاهد سالم (Healthy control)	19.8 abc	-	22.47 abc	-
شاهد آلوده (Pathogen control)	9.33 d	0 e	11.67 d	5 c

اعداد متن جدول مربوط به ارتفاع بوته، میانگین ارتفاع ۱۸ گیاه می‌باشند. اعدادیکه به درصد نشان داده شده‌اند میانگین درصد گیاهان سالم موجود در سه تکرار می‌باشد.

* = مخلوط *T. harzianum* Bi و *T. viride* در شرکت تلفیق دانه به صورت فرموله تهیه شده است. تیمارهایی که با حروف مختلف نشان داده شده‌اند با آزمون دانکن ($P < 0.01$) دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند.

Data on plant height are the means of 18 plants and data on % healthy plants are the means of percentage of healthy plants in 3 replicate pots.

Significant differences are denoted by different letters within each column according to Duncan's Multiple test ($P < 0.01$).

T.viride+ *T.harzianum* Bi was formulated by Talphighe –Daneh Co. Iran
(T.v.+T.hBi) and FOM + (T.v.+T.hBi) were not included in seed treatment test.

T.v. DAR=*T. virens* DAR 74290, T.v.= *T.viride*. T.h39=*T.harzianum*T39

T.hM= *T.harzianum* M, T.hBi= *T.harzianum* Bi (Trichdermin B)

FOM= *Fusarium oxysporum* f.sp.melonis

در بررسی ماکروسکوپی تقابل جدایه‌های تریکودرما با استفاده از کشت متقابل مشاهده شد که جدایه های تریکودرما رشد *F. oxysporum* f.sp. *melonis* را محدود ساخته ولی قادر به پیشروی روی می‌سلیم‌های عامل بیماری نبودند. بیشترین درصد بازداری از رشد به میزان ۶۸/۵۸ درصد در تقابل همزمان جدایه 96 *Trichoderma* sp. با عامل بیماری مشاهده شد و مشخص گردید که این قارچ قدرت رقابت تغذیه بالاتری نسبت به سایر جدایه‌ها در تقابل با قارچ FOM دارد. نتایج بررسی‌های پیغامی و نیشابوری در سال ۱۹۹۱ نیز نشان داد که سه استرین *T. harzianum* مورد بررسی در تقابل با *F. oxysporum* که از ریشه خیار جدا شده بود قادر به پیشروی در روی پرگنه فوزاریوم نبوده و فقط از رشد می‌سلیم ممانعت می‌نماید. در محل برخورد تریکودرما و عامل بیماری ریشه‌های دو قارچ بسیار تنک و کم تراکم مشاهده شدند. نتایج بررسی‌های بهبودی (۱۹۹۶) و اعتباریان و همکاران (۲۰۰۰) موید قدرت تغذیه‌ای بالای تریکودرما می‌باشد. در آزمایش بررسی اثر متابولیت‌های خارج سلولی تریکودرما با روش سلوفان مشخص شد که غلظت ترکیبات غیرفرار جدایه‌های تریکودرما در محیط کشت با افزایش مدت زمان ماندن قارچ در روی ورقه سلوفان افزایش یافته و به تبع آن درصد بازداری از رشد نیز افزایش می‌یافت. همچنین نتایج بررسی درصد بازداری از رشد در زمان‌های مختلف مطالعه شده در هر آزمایش نشان داد که درصد تأثیر مواد مترشحه در کاهش رشد می‌سلیمی قارچ نسبت به شاهد با افزایش زمان کاهش یافت. اثر جدایه *T. vires* 74290 در روی نژاد ۱ قارچ عامل بیماری به صورت Fungicidal مشاهده شد. پس از انتقال قطعه اولیه به محیط جدید نیز رشدی انجام نگرفت. نتایج بدست آمده با مشاهدات اعتباریان و همکاران در سال ۲۰۰۰ که اثر این جدایه را روی *P. erythroseptica* نیز بررسی نموده‌اند مطابقت دارد. باتوجه به اینکه عامل بیماری در مجاورت قارچ عامل بیماری (کشت متقابل) رشد چندانی نداشت و ضمناً همانطوریکه در روش سلوفان مشاهده شد متابولیت‌های تولید شده توسط گونه‌های تریکودرما از رشد قارچ جلوگیری نموده و حتی برخی از آنها خاصیت قارچ‌کشی دارد می‌توان نتیجه گرفت که رقابت غذایی و همچنین متابولیت شده می‌تواند در کنترل عامل بیماری مؤثر باشد. در مورد نوع مواد موجود در متابولیت‌های غیرفرار تریکودرما تحقیقات زیادی توسط سایر پژوهشگران انجام شده و مشخص شده است که

آنزیم‌های سلولاز، کیتیناز، بتا ۱ و ۳- گلوکاناز، اندوگلوکاناز، اگزوگلوکاناز و همچنین آنتی‌بیوتیک‌هایی مانند Gliotoxin, Trichotoxin, Paracelsin, Alamethicin, Trichodermin, Viridin توسط استرین‌های مختلف تریکودرما تولید می‌شوند که نقش مؤثری در چگونگی کنترل بیولوژیکی ایفا می‌کنند (Papavizas, 1985 Elad *et al.* 1982a, Dannis & Webster 1971b). تولید Gliotoxin توسط *T. virens* به‌عنوان مهم‌ترین آنتی‌بیوتیک بازدارنده آن در برابر قارچ‌های عامل بیماری گزارش گردیده است (Howell & Stipanovic 1983). همچنین *T. virens* آنزیم اندوکیتیناز تولید می‌نماید که به همراه Gliotoxin در ممانعت از جوانه‌زنی کیندیوم‌های *Botrytis cinerea* اثر سینرژیست دارد (Dipietro *et al.* 1993).

T. harzianum نیز دامنه وسیعی از آنتی‌بیوتیک‌ها (Ghisalbeerti & Sivasithanparam 1991) و آنزیم‌ها (Lorito *et al.* 1994) را علیه قارچ‌های مختلف تولید می‌کند. هرچند که مواد تولیدی جدایه *T. harzianum* T39 شناخته نشده است اما چت و بیکر (Chet & Baker 1980) نشان دادند که *T. harzianum* در برابر *Rhizoctonia solani* و *Sclerotium rolfisii* آنزیم‌های 3-(1,3)-glucanase و کیتیناز تولید نمود که سبب exolysis ریشه گردید و تولید آنتی‌بیوتیک مشاهده نشد.

متابولیت‌های فرار (گازی) تریکودرما در جلوگیری از رشد می‌سلیوم قارچ عامل بیماری هنگامی که جدایه‌های تریکودرما ۲۴ ساعت قبل از FOM کشت داده شدند مؤثر بود. ترکیبات فرار جدایه *T. harzianum* T39 با ۳/۵۴ درصد بازداری و مواد فرار *Trichoderma* sp. 96 با ۱۸/۴۵ درصد بازداری به‌ترتیب بیشترین و کمترین اثر را در جلوگیری از رشد عامل بیماری داشتند. درصد بازداری از رشد قارچ FOM در اثر ترکیبات با گذشت زمان افزایش یافته و یک روند صعودی نسبت به زمان داشت که ممکن است به دلیل تجمع بیشتر ترکیبات فرار طی گذشت زمان در محیط بسته داخل تشتک پتری باشد. زپا و همکاران (Zeppa *et al.* 1991) به متابولیت‌های فرار متعددی شامل لاکتون‌ها، الکل‌ها، مشتقات ترپن و آلفا پیرون را در شرایط کشت متفاوت از *T. viride* به دست آورده و نشان دادند که جدایه‌های قارچ، مواد و روش کشت در کمیت و کیفیت تولید متابولیت‌های فرار مؤثرند. متابولیت‌های غیرفرار و فرار می‌توانند در خلل و فرج خاک انتشار یافته و نیازی به تماس مستقیم با عامل بیماری برای

تأثیرگذاری آنها نیست. شعاع تأثیر و نفوذ این آنتی‌بیوتیک‌ها احتمالا دایره‌ای است که شعاع آن رابطه معکوس با وزن مولکولی ماده شیمیایی تولید شده، ماهیت جذبی محیط و توانایی سایر ارگانسیم‌ها برای مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و رابطه مستقیم با حلالیت و رطوبت خاک دارد (Baker & Cook 1974).

در شرایط گلخانه تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست تریکودرما برای کنترل بیماری پژمردگی فوزاریومی مورد بررسی قرار گرفت. در روش افزودن مایه *T. harzianum* T39 به نسبت ۱۰ گرم به هر کیلوگرم خاک آلوده به قارچ عامل بیماری درصد تعداد گیاهان سالم نسبت به شاهد ۶۱/۰۶ درصد بود. حداقل میزان مؤثر آنتاگونیست تریکودرما در خاک حدود 10^5 CFU در هر گرم خاک است (Adams 1990). افزودن ۱۰ گرم مایه تریکودرما به هر کیلوگرم خاک 10^7 - 10^5 CFU فراهم می‌نماید که به شرایط طبیعی نزدیک می‌باشد. در روش آغشتن بذر به اسپور تریکودرما درصد تعداد گیاهان سالم نسبت به شاهد سالم و کاشت بذر در خاک آلوده در مورد *T. harzianum* T39 و *T. viride* به ترتیب ۸۳/۶۵ و ۸۱/۷۲ درصد بود.

در ایران تأثیر گونه‌های جنس *Trichoderma* روی قارچ عامل بیماری پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی توسط نیک نژاد و شریفی تهرانی (۱۹۹۳) مورد بررسی قرار گرفته و نتیجه گرفته‌اند که در شرایط گلخانه‌ای جدایه کرج *T. harzianum* به میزان ۶۸ درصد، جدایه اهواز *T. harzianum* به میزان ۶۳ درصد، جدایه شهریار *T. viride* به میزان ۶۰ درصد و جدایه *T. viride* مؤسسه بررسی آفات و بیماریهای گیاهی به میزان ۵۷ درصد باعث کاهش میزان پژمردگی فوزاریومی گوجه‌فرنگی شده است.

نتایج بررسی‌ها با تحقیقات داتا و همکاران (Datta et al. 2000) در کنترل *R. solani* توسط اسپور *T. harzianum* و کاربرد متیل سلولز برای پوشش بذر مطابقت داشت در این آزمایش نیز برای ثبات اسپور بر روی بذر از متیل سلولز دو درصد استفاده شد.

در جمعیت عامل بیماری در خاک در طول آزمایش کاهش چشمگیری مشاهده نشد. بهرحال سیوان و چت (Sivan & Chet 1986) نشان دادند که افزودن آنتاگونیست تریکودرما به خاک باعث کاهش جمعیت عامل بیماری (*F. oxysporum* f. sp. *melonis*) ۲۴ روز پس از کاشت شد. همچنین مشاهده گردید که افزودن ۵ یا ۱۰ گرم در کیلوگرم مایه سبوس گندم آلوده به

تریکودرما به خاک پس از ۲۴ روز هیچ اختلاف معنی‌داری در CFU موجود در خاک بین دو تیمار وجود ندارد و CFU به میزان 10^6 برآورد گردید. در آزمایش انجام شده در اکثر جدایه‌ها کاهش نسبی CFU آنتاگونیست در خاک مشاهده شد اما دامنه جمعیت آنها بین 10^4 و 10^7 متغیر بود. طبق بررسی‌های اعتباری و همکاران (۲۰۰۰) جمعیت آنتاگونیست تریکودرما بعد از ۳۰ روز درحالیکه مایه آنتاگونیست ۵ گرم در کیلوگرم در ابتدا به خاک اضافه شده بود 10^5 - 10^4 CFU/g برآورد شد.

در این بررسی اثر آغشتن بذر به آنتاگونیست تریکودرما تأثیر بیشتری در کنترل بیماری نسبت به افزودن مایه به خاک نشان داد. سیوان و چت (Sivan & Chet 1986) نیز پوشش بذر با آنتاگونیست را در پیشگیری *F. roseum* مناسب گزارش نمود. بررسی‌های کی و استوارت (Kay & Stewart 1994) نشان داد که گونه‌های *Trichoderma* شیوع بیماری پوسیدگی پیاز را زمانی که به صورت تیمار خاک به کار رفت نسبت به زمانی که به صورت پوشش بذر به کار برده شد کاهش بیشتری داد. جدایه‌های تریکودرما باعث افزایش رشد گیاهچه‌ها نسبت به شاهد سالم شد. تولید متابولیت‌های رشدی توسط تریکودرما ثابت شده است. همچنین افزایش رشد گیاهانی مانند میخک توسط گونه‌های تریکودرما مشاهده شده است (Weber et al. 2000). یافتن زمان و مقدار مناسب افزودن آنتاگونیست به خاک و بذر برای کنترل بیماری قابل توجه می‌باشد و برای دستیابی به کنترل مناسب بیماری باید به شناخت کافی عامل بیماری، وقوع بیماری، بستر مناسب و فرمولاسیون مناسب آنتاگونیست دست یافت. بنابراین به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز می‌باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از مدیریت مجتمع آموزش عالی ابوریحان، معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تهران، مجتمع آزمایشگاهی واحد علوم و تحقیقات و همچنین از سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی که بودجه و امکانات لازم را در اختیار قرار داده‌اند تشکر می‌نمایند. ضمناً از آقای دکتر ضیاءالدین بنی‌هاشمی (دانشگاه شیراز) که نژاد ۱ قارچ عامل بیماری را در اختیار قرار داده‌اند و همچنین از آقای دکتر حمید روحانی (دانشگاه بوعلی سینا) که برخی از

جدایه‌های تریکودرما را در اختیار قرار داده‌اند تشکر می‌شود.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (17-20) متن انگلیسی مراجعه شود.

نشانی نگارندگان: حسن‌رضا اعتباریان، گروه گیاهپزشکی مجتمع آموزش عالی ابوریحان
دانشگاه تهران صندوق‌پستی: ۱۱۳۶۵/۴۱۱۷ تهران و آرزو اشرفی‌زاده و
حمیدرضا زمانی‌زاده، واحد علوم و تحقیقات دانشگاه آزاد اسلامی تهران