آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۷، شماره ۲، اسفند ۱۳۹۸
DOI: 10.22092/jaep.2019.127133.1294

کارایی قارچکش بیولوژیک حاصل از جدایه‌های جهش‌یافته تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی ذغالی سویا

فرهاد گوهرزاد[۱]، محمد علی تاجیک قنبری[۲]✉، سمیرا شهبازی[۳]
۱و۲- به‌ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران
۳- استادیار پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، کرج
(تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۸)

چکیده

پوسیدگی ذغالی، مهم‌ترین بیماری قارچی سویا در کشور است. با توجه به نبود ارقام مقاوم، خاکبرد بودن و دامنه بیماری‌زایی وسیع *Macrophomina phaseolina*، کنترل شیمیایی و زراعی، به تنهایی موفق نیستند. برای ارتقای کارایی کنترل بیولوژیک بیماری در سویا، از گونه والد *Trichoderma koningii* NAS-K1 و جدایه جهش‌یافته منتخب NAS-K1M25، در شرایط گلخانه استفاده شد. القای جهش، موجب افزایش کارایی کنترل بیولوژیکی بیماری شد. کارایی بیوفرمولاسیون‌های پودر، گرانول و پوشش بذر، تهیه شده از این جدایه‌ها، به‌طور جداگانه ارزیابی شد. بیوفرمولاسیون پودر، بهترین نتیجه را در کاهش بیماری، بیوفرمولاسیون گرانول، بیشترین تأثیر را در افزایش رشد و عملکرد گیاه و بیوفرمولاسیون پوشش بذر، بهترین نتیجه را در بهبود خصوصیات جوانه‌زنی و شاخص ویگور داشت. با استفاده از این بیوفرمولاسیون‌ها، شاخص‌های رشد سویا نسبت به نمونه شاهد و تیمار سم شیمیایی، افزایش نشان داد. بیشترین افزایش عملکرد در حضور بیمارگر، با استفاده از تیمار بیوفرمولاسیون پوشش بذر با جدایه جهش‌یافته منتخب مشاهده شد. بررسی میزان زنده‌مانی ماده بیولوژیک در بیوفرمولاسیون‌های پودر و گرانول، نشان داد که این شاخص تا مدت ۱۱ ماه در دمای اتاق، کاهش ناچیزی داشته و همچنان مؤثر است اما نگهداری در دمای ٤ درجه سلسیوس تأثیر مثبت در فعال ماندن ماده بیولوژیک دارد.

واژه‌های کلیدی: القای جهش، پوسیدگی ذغالی، تریکودرما، سویا، قارچکش بیولوژیک.

Efficiency of biological fungicide prepared from mutant *Trichoderma* isolates on control of soybean charcoal rot disease

F. GOHARZAD[1], M.A. TAJICK GHANBARY[2]✉, S. SHAHBAZI[3]
1 &2. PhD. student & Associate professor, respectively; Department of Plant Protection, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran; 3. Assistant professor, Nuclear Agriculture School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Karaj, Iran

Abstract

Charcoal rot is the most important fungal disease on soybean in Iran. According to the absence of the resistant cultivars, soil inhabitant and the high pathogenicity rate of the pathogen, chemical and crop control alone is not succeed. To improve the efficiency of disease biological control on soybean in greenhouse, the wild type *Trichoderma koningii* NAS-K1 (non radiated) and the selective mutant NAS-K1M25 isolates were used. The induction of mutation in wild type increases the biological control efficiency of the disease. The efficiency of powder, granular and seed coating bio-formulations, were evaluated separately in greenhouse. Powder has the best effect in reducing the disease; granular bio-formulation has the best effect on plant growth and its yield and seed coating, has the best effect on seed germination characteristics and vigor index. The application of these bio-formulations increased soybean growth indices compared to the control and chemical treatments. The highest yield production increase in the presence of the pathogen was observed by seed coating treated with NAS-K1M25. Study on viability of biological agent in powder and granular bio-formulations, showed that it has slight decrease and still effective for a period of 11 months at room temperature, but keeping it at 4 °C has a positive effect on it.

Keywords: Biological fungicide, charcoal rot, induction of mutation, soybean *Trichoderma*.

✉**m.tajick@sanru.ac.ir**

مقدمه

سویا با نام علمی *Glycine max* (L.) Merril از گیاهان بومی شرق آسیا و مهمترین محصول از خانواده بقولات است. این خانواده گیاهی از نظر اهمیت، براساس میزان سطح زیر کشت و مقدار برداشت، در رتبه دوم پس از غلات قرار دارد، به‌نحوی که در سال ۲۰۱٦، متوسط سطح زیر کشت سویا در جهان حدود ۱۲۱/۵۳ میلیون هکتار، متوسط عملکرد جهانی ۲/۷٦ تن در هکتار و کل محصول تولید شده سویا حدود ۳۳٤/۸۹ میلیون تن گزارش شده است (Terzic *et al.*, 2018).

این گیاه، دولپه، یک ساله، خودگشن، گرمادوست و روز کوتاه بوده و به دو صورت بهاره و تابستانه کشت می‌شود. مهم‌ترین مناطق کشت سویا در کشور، در استان‌های مازندران، گلستان، لرستان، آذربایجان شرقی و اردبیل (دشت مغان) قرار دارد (Latifi, 1993). از گیاه سویا به‌عنوان منبع ازت و به‌منظور تقویت خاک برای کشت بعدی استفاده می‌شود (Timmers, 2008). براساس آمار وزارت جهاد کشاورزی در سال زراعی ۹٦-۱۳۹۵، از مجموع حدود ۱۱ میلیون هکتار سطح زیر کشت محصولات زراعی کشور، حدود ۳۹۵۳۷ هکتار مربوط به‌کشت سویا بوده است. این میزان سطح زیر کشت سویا فقط در پنج استان، به‌ترتیب شامل گلستان، اردبیل، مازندران، خوزستان و لرستان گزارش شده . طبق این آمار، مجموع تولید محصول سویا حاصل از کشت آبی و کشت دیم به‌مقدار ۹۱۳۳۵ تن بود و عملکرد این محصول به‌طور میانگین، در کشت آبی حدود ۲/۳۹۵ تن در هکتار و در کشت دیم حدود ۱/٤٦۸ تن در هکتار بوده است (Ahmadi *et al.*, 2017). دانه سویا به‌طور متوسط، حاوی ۱۸ درصد روغن و ٤٤ درصد پروتئین بوده که می‌تواند نقش مهمی به‌عنوان ماده اولیه صنایع روغن‌کشی و تولید فرآورده‌های پروتئینی و خوراک دام ایفا نماید. به‌دلیل مصارف متنوع دانه سویا، افزایش تولید آن، ضروری به‌نظر می‌رسد اما یکی از عوامل محدود کننده تولید این محصول در کشور، بیماری پوسیدگی ذغالی ناشی از قارچ *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid است. این قارچ، دامنه میزبانی وسیعی داشته و روی حدود ۷۵ خانواده و بیش از ۵۰۰ گونه گیاهی شامل سویا، کلم، فلفل، نخودفرنگی، کنجد، ذرت، بادام زمینی، لوبیا و... بیماری‌زا می‌باشد (Wrather *et al.*, 1998). در سال‌های خشک و کم باران، میزان آلودگی به این بیماری و خسارت ناشی از آن، بیشتر بوده و سبب کاهش کمیت و کیفیت محصول سویا می‌شود. این شرایط آب و هوایی باعث گسترش بیماری شده و اغلب، هنگامی که گیاه تحت استرس خشکی باشد بیماری اتفاق می‌افتد (Vasebi *et al.*, 2011).

علائم پوسیدگی ذغالی در گیاهان جوان، شامل ایجاد لکه‌های سیاه و نامنظمی است که از پایه‌های لپه‌ها شروع شده و به سمت ساقه‌ها گسترش می‌یابد و در نهایت موجب مرگ گیاه می‌شود. با توجه به عوامل متعدد از جمله، شرایط رشدی گیاه، دما و رطوبت خاک و هوا، تنش‌های وارده به گیاه، این قارچ می‌تواند سبب از پا افتادگی، سوختگی گیاهچه، پوسیدگی طوقه و ساقه در بسیاری از محصولات مهم کشاورزی شود (Babu *et al.*, 2007).عامل این بیماری به ریشه و ساقه گیاه سویا حمله می کند. علائم بیماری، وابستگی زیادی به مرحله رشدی گیاه دارد. طوقه گیاهچه‌های آلوده در خط خاک، تغییر رنگ به قهوه‌ای مایل به قرمز تا سیاه می یابد. گیاه جوان آلوده شده، در شرایط مرطوب و خنک ممکن است زنده بماند، اما یک عفونت پنهان را تا وقتی که نشانه‌ها در فصلی با آب و هوای گرم و خشک ظاهر شوند، به همراه دارد (Hartman *et al.*, 1999). در سویای بالغ، نشانه‌های پوسیدگی ذغالی، شامل: بلوغ زودرس، عدم ریزش برگ، تغییر رنگ و پرشدن ناقص غلاف است. ریزسختینه‌ها ممکن است به صورت لکه-های سیاه در قسمت‌های چوبی ساقه و ریشه نمایان شوند. انتقال این قارچ به دو صورت خاکبرد و بذر زاد بوده که این روش‌های انتقال بیماری و قدرت زنده مانی آن به‌دلیل تولید ریزسختینه‌های بسیار مقاوم، کنترل آن را بسیار مشکل می-نماید. گرچه در حال حاضر، متأسفانه کشاورزان از کنترل شیمیایی برای کنترل بیماری پوسیدگی ذغالی استفاده می‌کنند

که استفاده نادرست از این روش بـه وقـوع مقاومـت درسـایر بیمارگرهادر برابر قارچکش‌ها کمک می‌کند، همچنـین کـاربرد قارچ‌کش‌ها در ابعاد وسیع، عواقب نـامطلوبی روی جانـداران غیـر هـدف دارد. اسـتفاده از میکروارگانیسـم‌هـایی ماننـد تریکودرما که آنتاگونیست بیمارگرهای گیـاهی هسـتند سـبب کاهش استفاده از قارچ‌کش‌ها و پیشگیری بیشتر از ایجـاد ایـن بیمـاری مـی‌شـود (Monte, 2001). گونـه‌هـای تریکودرمـا ازمیکروارگانیسم‌های شناخته شـده‌ای هسـتند کـه معمـولاً در قالب عوامل میکروبـی کنتـرل بیولوژیـک (Microbial Biological Control Agents (MBCAs)) در کشاورزی استفاده می‌شوند. ایـن موضوع، به‌دلیل توانایی آنهـا در حفاظـت از گیاهـان، افـزایش رشد رویشی و حفظ جمعیت بیمـارگر زیـر آسـتانه خسـارت اقتصادی، همچنین به عنوان اصلاح کننده خـاک بـرای بهبـود تغذیه، تجزیه و پوسـاندن ترکیبـات غـذایی، عمـل مـی کنـد (Abdel- lateif, 2017).

یکی از دلایل موفقیت محصولات MBCAs، تولید حجم فراوانی از پروپاگول‌های زنده است که در سیستم‌های صنعتی مختلف تولید می‌شـوند (Kumar, 2013). ویژگـی‌هـای مثبـت قارچ تریکودرما باعث شده است که محصـولات برپایـه ایـن قارچ در بازار کشاورزی دنیا، نه‌تنها به‌عنـوان یـک قـارچ‌کـش بیولوژیک علیه بیمارگرهای گیاهی، بلکه به‌عنوان یک زاد مایه زیستی معمولی که مقاومت گیاهان را به تنش‌های زنـده و یـا غیر زنده، القاء کرده و باعث افزایش رشـد و عملکـرد گیـاه و نیز بهبود اکوسیستم کشاورزی می شود (Abdel-lateif, 2017).

در زمینه استفاده از بیوفرمولاسیون‌های مختلف بـر پایـه قارچ تریکودرما که در کنترل انواع بیماری‌های گیـاهی، موفـق عمل کرده باشـند، گزارشـات و مقـالات علمـی متعـددی در سراسر جهان منتشر شـده اسـت. در ایـن مطالعـه، بـه‌منظـور افزایش کارایی بیوفرمولاسیون تهیه شـده از تریکودرمـا بـرای مدیریت بیماری پوسیدگی ذغالی، از جدایه‌هـای جهـش‌یافتـه تریکودرما استفاده شد. مطالعات قبلی نشان داد که جدایه‌هـای جهش‌یافته تریکودرما، قـدرت بازدارنـدگی از رشـد بـالاتری نسبت به جدایه والد خود، علیه برخـی بیمارگرهـای خـاکبرد گیـاهی از جملـه، *Rhizoctonia solan*i (Jayaraj *et al.*, 2003; Mohamadi *et al.*, 2014), *Fusarium. Oxysporum* (Mukherjee *et al.*, 2006), *Pythium ultimum* (Papavizas *et al.*, 1982), *M. phaseolina* (Abbasi *et al.*, 2014; Baharvand *et al.*, 2014) دارند.

هدف اصلی از انجام این مطالعه، بررسی میـزان کـارایی بیوفرمولاسیون‌های تهیـه شـده از جدایـه‌هـای جهـش‌یافتـه و منتخب تریکودرما بود تا بتـوان بـرای تولیـد قـارچکش‌هـای جدید، بومی، قابل رقابت و ایمن در کنترل بیمارگرهـای خـاکبرد ازجمله، بیماری پوسیدگی ذغالی سویا، از آن استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

گونه‌های قارچی مورد استفاده

از بین شبه‌گونه‌های تریکودرمای موجـود در کلکسـیون گروه گیاهپزشکی پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، پنج جدایـه شـامل *T. harzianum* (NAS-H1)، *T. viridae* (NAS-V1)، *T. koningii* (NAS-K1)، *T. atroviride* (NAS-A1) و *T. virens* (NAS-Vi-1) برای ارزیابی قدرت آنتاگونیسـتی علیـه بیمـارگر *M. phaseolina* انتخاب شدند. جدایه Mp-2 از قـارچ بیمـارگر *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid از کلکسـیون دکتـر ناصر صفایی– دانشگاه تربیت مـدرس تهـران، دریافـت گردیـد و بیماری‌زایی آن، روی میزبان سویا رقم ویلیامز براساس اصول کـخ انجام شده بود و برای انجام این تحقیق مورد استفاده قرار گرفـت. بذر سویا، رقم ویلیـامز از کلکسـیون موسسـه تحقیقـات ثبـت و گواهی نهال و بذر تهیه شد و درخصوص ترکیـب تجـاری مـاده بیولوژیک، از تریکودرمین– ب شرکت تلفیقدانه، استفاده شد.

انتخاب شبه‌گونـه آنتاگونیسـت و جهـش یافتـه آن بـا اسـتفاده از آزمون کشت متقابل هم زمان، و ارزیابی قـدرت آنتاگونیسـتی آنها در مقابل *M. phaseolina* بررسی شد (Mishra, 2010)، تا از بین پنج گونه اشاره شده، گونه با بالاترین قدرت بازدارنـدگی از رشد بیمارگر، انتخاب شود.

به این منظور ابتدا یک قرص پنج میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه سه روزه قارچ‌های تریکودرما، به فاصله ۱/۵ سانتیمتر از حاشیه تشتک پتری هشت سانتی‌متری در محیط PDA کشت گردید. سپس یک قرص پنج میلیمتری از حاشیه فعال پرگنه سه روزه قارچ بیمارگر *M. phaseolina* در طرف مقابل قرص قارچی آنتاگونیست و به فاصله ۱/۵ سانتی‌متری از حاشیه تشتک پتری، قرار داده شد. در تیمار شاهد، از قرص پنج میلی‌متری قارچ بیمارگر در مرکز محیط PDA استفاده شد. میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در مقایسه با شاهد، در دو زمان متفاوت (۲٤ ساعت و ۷۲ ساعت بعد از کشت) براساس فرمول زیر، محاسبه و یادداشت گردید. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد.

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

IG= درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر

C= قطر پرگنه قارچ بیمارگر در شاهد

T= قطر پرگنه قارچ بیمارگر در تیمار

برای تهیه جمعیت جدایه‌های جهش‌یافته از گونه منتخب، سوسپانیون اسپور تازه آن گونه، با استفاده از دستگاه گاماسل (Gamma cell Issledovatle PX30, Germany) با چشمه کبالت٦٠، اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۲۳ گری در ثانیه، مستقر در پژوهشکده کشاورزی هسته‌ای، تحت پرتوتابی با پرتو گاما در محدوده دامنه دز ۲۵۰ گری قرار گرفت. این دامنه دز براساس حفظ توانایی جوانه‌زنی ٤۳/٤ درصد از اسپورهای پرتو دیده برای هر یک از گونه‌های قارچ، تعیین شده بود (Shahbazi *et al.*, 2018).

در جداسازی اسپورهای جهش‌یافته از یکدیگر، با استفاده از روش سریال رقت، سوسپانسیون‌های اسپور با رقت‌های 10^{-2} تا 10^{-6} از سوسپانسیون اسپورهای پرتوتابی شده و به‌صورت تکرارهای سه‌تایی روی محیط کشت PDA، کشت سطحی داده شدند. با استفاده از میکروسکوپ نوری (بزرگنمایی ۱۰ و ٤۰) اسپورهای جوانه‌زده، جداسازی و به محیط کشت تازه PDA انتقال داده شدند و در مدت ١٦ ساعت در دمای ۲۸ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. واکشت، تا هفت مرتبه برای اطمینان از ثبات ویژگی‌های شکل‌شناسی ادامه یافت (Shahbazi *et al.*, 2018). شکل و رنگ جدایه‌های پرتودیده، سرعت رشد، تعداد اسپور، در گونه آنتاگونیست برتر و جدایه‌های جهش‌یافته آنها، در محیط PDA ، اندازه‌گیری و ثبت گردید. برای سنجش ابعاد اسپورهای قارچ آنتاگونیست، حداقل ۳۰ اسپور از هر جدایه با میکروسکوپ نوری (٤۰x) اندازه‌گیری شد.

انتخاب جدایه‌های جهش‌یافته منتخب

با استفاده از آزمون کشت متقابل، قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های جهش‌یافته تریکودرما علیه *M. phaseolina* بررسی گردید تا از بین جدایه‌های جهش‌یافته، آنهایی که دارای بالاترین میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر هستند، تعیین و برای ادامه آزمایشات انتخاب شوند. میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در مقایسه با شاهد در دو زمان متفاوت (٢٤ ساعت و ۷۲ ساعت بعد از کشت) براساس فرمول اشاره شده قبل، محاسبه و یادداشت گردید (Mishra, 2010).

ارزیابی کنترل بیمارگر توسط جدایه‌های جهش‌یافته منتخب در شرایط گلخانه

برای انتخاب جدایه جهش‌یافته مورد استفاده در تهیه بیوفرمولاسیون، ابتدا میزان کاهش بیماری توسط دو گونه جهش‌یافته منتخب از ارزیابی‌های درون‌شیشه‌ای در شرایط گلخانه، با گونه والد (پرتو ندیده) مقایسه شد. برای تهیه زادمایه قارچ آنتاگونیست، قطعات یک سانتی‌متری از حاشیه میسلیوم فعال جدایه‌های رشد یافته (والد و دو جدایه جهش‌یافته) روی محیط کشت PDA، به داخل ظروف محتوی دانه‌های گندم که به‌مدت دو روز به‌طور متوالی و به فاصله ٢٤ ساعت، اتوکلاو شده بودند (فشار ۵۰ پوند و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه)، منتقل و پس از سه روز، هر روز با استفاده از تکان دادن متوالی ظروف، هوادهی و انتشار زادمایه در بستر انجام شد.

پس از گذشت سه هفته در شرایط ضدعفونی شده (Aseptic)، زادمایه قارچ در دمای ۴۰ درجه سلسیوس در آون، خشک و با استفاده از آسیاب برقی کاملاً آسیاب شد تا به ازای هر کیلوگرم خاک گلدان، پنج گرم زادمایه خشک با خاک مخلوط شود. از روش مشابه به منظور تهیه زادمایه از قارچ بیمارگر نیز استفاده شد با این تفاوت که به جای گندم از شلتوک برنج دوبار اتوکلاو شده به عنوان سوبسترا استفاده شد و مراحل خشک و آسیاب کردن نیز، مورد نیاز نبود. بر اساس ترتیب مایه زنی، ابتدا بیمارگر(به مقدار پنج گرم زادمایه خشک به ازای هر کیلوگرم خاک گلدان) به خاک اضافه شد و یک هفته بعد، تریکودرما (والد و دو جدایه جهش‌یافته)، به‌مقدار مساوی با بیمارگر، به خاک افزوده شد. آزمایش‌ها در قالب طرح بلوک‌های کامل تصادفی با نه تیمار و سه تکرار اجرا شدند. تیمارهای آزمایشی شامل: شاهد آلوده به بیمارگر در خاک سترون، شاهد غیر آلوده به بیمارگر در خاک سترون، تیمار آنتاگونیست (والد و دو جدایه جهش‌یافته) در خاک سترون ، تیمار آنتاگونیست (والد و دو جدایه جهش‌یافته) به‌همراه بیمارگر در خاک سترون، تیمار قارچکش (تیابندازول با نام تجاری تکتو؛ پودر وتابل؛ شرکت آریا بذر جوانه؛ با دُز مصرف دو در هزار) به همراه بیمارگر در خاک سترون، بودند. گلدان‌ها با مخلوط خاک ضدعفونی شده، پرلیت و پیتماس (به نسبت ۱:۱:۱) اتوکلاو شده، در دمای ۲۸ درجه سلسیوس و رطوبت ۴۰ درصد نگهداری و یکروز در میان آبیاری شدند. بذور سویا رقم ویلیامز قبل از کاشت در محلول هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی شده و سه بار با آب مقطر سترون، هر بار به‌مدت دو دقیقه شستشو و در هرگلدان پنج بذر کشت شد. داده‌های به دست آمده از اندازه‌گیری شاخص‌های طول ساقه، ریشه، همچنین وزن تر و خشک اندام‌های هوایی و ریشه و درصد وقوع بیماری (Vasebi *et al.*, 2011)، برای انتخاب جدایه با قدرت کنترل بهتر بیمارگر پس از ۴۵ روز در گلخانه استفاده شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS Ver.13 و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد، صورت گرفت.

تهیه بیوفرمولاسیون از جدایه‌های منتخب و بررسی کارایی آنها در گلخانه

برای تهیه بیوفرمولاسیون‌های مختلف از جدایه جهش یافته منتخب و گونه والد و مقایسه عملکرد آنها در شرایط گلخانه، ابتدا، توده زنده از هریک از جدایه‌ها با روش اشاره شده قبل، تهیه شد. سه بیوفرمولاسیون گرانول، پودر و پوشش‌دهی بذر از این ماده زنده تهیه گردید. برای پوشش دهی بذر از اسپور خالص جدایه‌های منتخب (با جمعیت ۵×۱۰^{۱۰} اسپور در هر گرم) در محلول ۳۳ درصد صمغ عربی به انضمام ۰/۰۲۵ درصد (وزن/ حجم) رنگ کونگورد، توئین ۸۰ به میزان ۰/۲ درصد (وزن/حجم)، ۱ درصد گلیسرول و ۱ درصد گلوکز استفاده شد. جمعیت نهایی ماده بیولوژیک (تعداد اسپور) با غلظت معادل $۱۰^{۸}$ اسپور در هر میلی‌لیتر از این محلول تنظیم گردید و بذور در شرایط ضدعفونی شده با این محلول به‌طور کامل آغشته شدند (Shahbazi *et al.*, 2018). بیوفرمولاسیون گرانول با استفاده از سیستم گرانول‌سازی بر پایه آلژینات به قطر متوسط سه میلی‌متر و با رطوبت ۸ درصد تهیه شد (Shahbazi *et al.*, 2018) . تعداد اسپور زنده (CFU) در هر گرانول، به‌طور متوسط، ۳×۱۰^{۸} تعیین گردید.

بیوفرمولاسیون پودر، به‌صورت اختلاط ماده بیولوژیک (اسپور فعال قارچ) با تالک به همراه ۰/۵ درصد کربوکسی متیل سلولز، تهیه شد. تعداد اسپور زنده (CFU) در هر گرم از بیوفرمولاسیون ، $۱۰^{۸}$ شمارش گردید (Shahbazi *et al.*, 2018).

یکی از فاکتورهای مهم در انتخاب بیوفرمولاسیون‌ها، تعیین شرایط نگهداری آنها برای کاربرد مؤثر و مدت مفید نگهداری آنهاست. به‌منظور پاسخ به این دو پرسش اساسی، برای بیوفرمولاسیون‌های پودر و گرانول در دمای اتاق (۲۵ درجه سلسیوس) و یخچال معمولی (۴ درجه سلسیوس) تا ۱۵ ماه نگهداری میزان اسپور فعال (CFU) محاسبه شد. برای بررسی میزان اسپور فعال، از روش تهیه سریال رقت حاصل از

بیوفرمولاسیون‌های مورد بررسی و کشت آنها در محیط کشت PDA (حاوی آنتی بیوتیک کلرامفنیکل) و شمارش پرگنه‌های رشد کرده در طول دوره نگهداری، استفاده شد. در مورد بیوفرمولاسیون پوشش بذر با دو تیمار (پوشش با گونه والد و پوشش با جدایه جهش‌یافته) و شاهد (بودن پوشش)، شاخص‌های درصد جوانه زنی، طول ریشه‌چه، طول ساقه‌چه، طول گیاهچه، وزن تر ریشه‌چه، وزن تر ساقه‌چه، وزن تر گیاهچه، وزن خشک ریشه‌چه، وزن خشک ساقه‌چه، وزن خشک گیاهچه و شاخص بنیه گیاهچه (شاخص ویگور VI: شاخص طولی بنیه گیاهچه با فرمول زیر) محاسبه گردید.

$$VI = \frac{\%GR \times SL}{100}$$

VI: شاخص بنیه گیاهچه، GR: درصد جوانه‌زنی، SL: طول گیاهچه

ارزیابی کارایی بیوفرمولاسیون‌ها در شرایط گلخانه، مشابه بخش قبل درقالب طرح بلوک کامل تصادفی در سه تکرار و شانزده تیمار انجام گرفت. ترکیب تجاری تریکودرمین- ب، براساس توصیه ثبت شده روی قوطی آن، استفاده شد. شاخص‌های رشدی از جمله ارتفاع بوته، وزن تر و خشک، عملکرد بوته و درصد وقوع بیماری (Vasebi *et al.*, 2011)، پس از ۱۲۰ روز اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS Ver.13 و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال پنج درصد انجام شد.

نتایج

نتایج ارزیابی درون شیشه‌ای بازدارندگی از رشد بیمارگر با گونه‌های تریکودرما

نتایج حاصل نشان داد که گونه *T. koningii* (NAS-k1) با ٦٤/٥٦ درصد، دارای بالاترین قدرت آنتاگونیستی در مقابل ریسه‌های قارچ *M. phaseolina* می‌باشد. این میزان قدرت آنتاگونیستی با استفاده از آزمون دانکن در مقایسه میانگین بازدارندگی از رشد بیمارگر در سطح ۱ درصد با سایر گونه‌ها، دارای تفاوت معنی‌داری بود بنابراین، این گونه برای القای جهش و انتخاب جدایه جهش‌یافته برای ادامه مطالعات استفاده شد (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج آنالیز درصد بازدارندگی از رشد قارچ بیمارگر *Macrophomina phaseolina* با آزمون کشت متقابل با گونه‌های تریکودرما

Table 1. The result of the percent analysis of growth inhibition of *Macrophomina phaseolina* by *Trichoderma* species in dual culture

***Trichoderma* Isolates**	**Precentage of growth inhibition of** *Macrophomina phaseolina*
T. harzianum	43.95[c]±1.70
T. viride	41.40[c]±0.85
T. koningii	64.56[a]±0.61
T. virens	40.83[c]±1.38
T. atroviride	51.05[b]±4.74

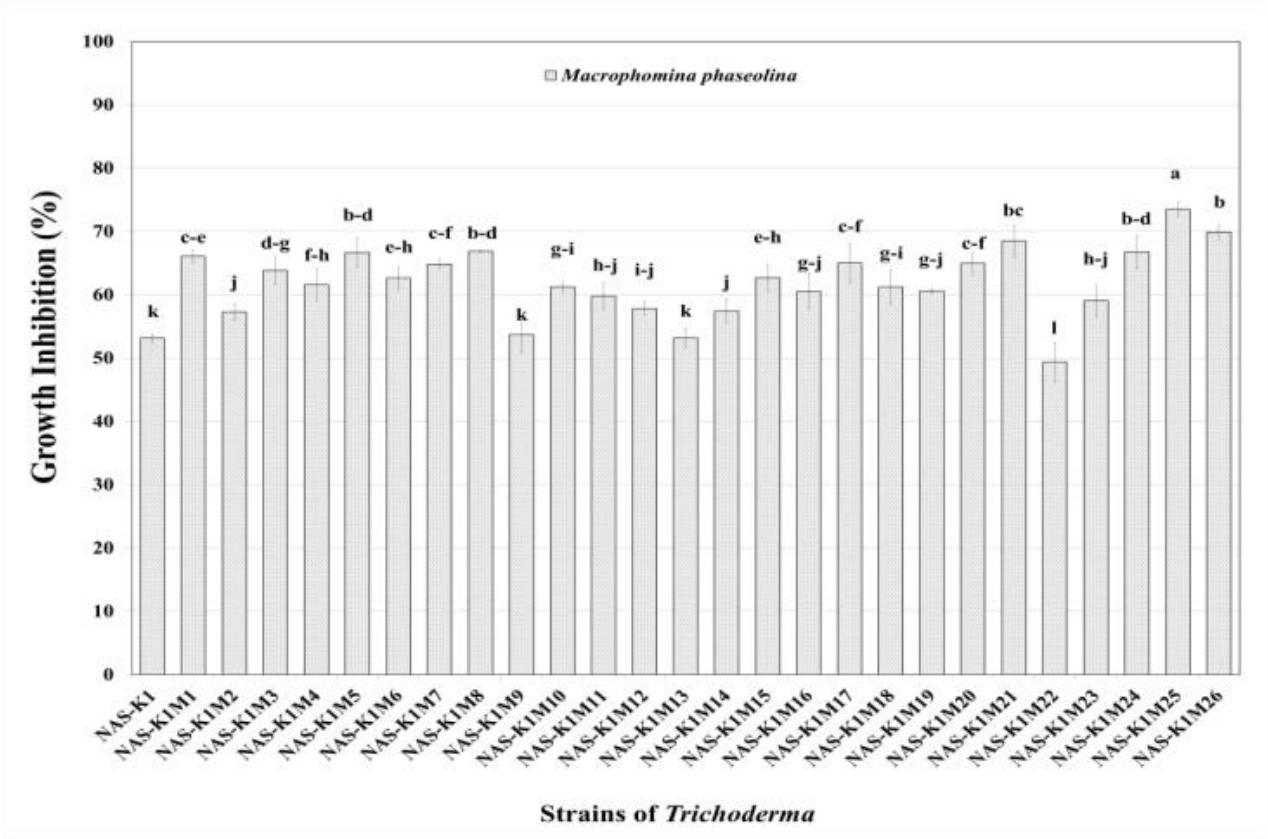
نتایج ارزیابی درون شیشه‌ای بازدارندگی از رشد بیمارگر با جدایه‌های جهش‌یافته تریکودرما

۲۷۰ جدایه خالص‌سازی شده از پرتوتابی با دز ۲۵۰ گری، به‌دست آمد. آن دسته از جدایه‌های خالص سازی شده که فاقد اسپور یا با سرعت رشد پایین‌تری از جدایه والد (پرتو ندیده) بودند و یا میزان تولید اسپور کمتری از والد داشتند، در این مرحله حذف شدند و تعداد جدایه‌ها به ۲۵۰ عدد رسید. از بین جدایه‌های اخیر، هفت بار واکشت روی محیط کشت تازه PDA انجام و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد تا از ثبات صفات شکل‌شناسی هر جدایه، اطمینان حاصل شود و از بین جدایه‌های جهش‌یافته‌ای که ثبات خصوصیات شکل‌شناسی و دفرمه نبودن ریسه و کنیدیوم به اثبات رسید، ٢٦ جدایه جهش‌یافته انتخاب شدند و مشخصات کلنی آنها (شکل و رنگ کلنی و پشت پلیت، ابعاد و تعداد اسپور تولیدی و سرعت رشد میسلیوم) ثبت شد. همچنین، میزان بازدارندگی از رشد بیمارگر در کشت متقابل بررسی گردید. از مجموع این بررسی‌ها، جدایه‌های جهش یافته NAS-K1M25 و NAS-K1M1، بالاترین قدرت بازدارندگی از رشد و ویژگی‌های شکل‌شناسی بهتری داشتند. بنابراین، برای تهیه بیوفرمولاسیون و ارزیابی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند (شکل ۱).

نتایج ارزیابی کارایی جدایه‌های منتخب در شرایط گلخانه

در ارزیابی‌های گلخانه، شاخص‌های متعددی شامل ارتفاع ساقه، طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه و ساقه و درصد وقوع بیماری در گیاهان سویا تحت تیمار با سوسپانسیون اسپور تریکودرما (والد NAS-K1 و دو جدایه جهش‌یافته منتخب

NAS-K1M25 و NAS-K1M1) بررسی شدند. همه فاکتورهای مورد ارزیابی در تیمارهای مختلف، در سطح پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند و داده‌ها، بیانگر تأثیر تیمار گیاه با تریکودرما، بر تغییرات شاخص‌های مورد ارزیابی بود. بالاترین طول ساقه گیاه در تیمار جدایه جهش‌یافته NAS-K1M25 مشاهده گردید. این تیمار، اختلاف معنی‌داری از نظر اندازه طول ساقه با تیمار قارچ والد NAS-K1 نداشت ولی به‌میزان بیش از ۳۰ درصد نسبت به نمونه شاهد، افزایش طول ساقه در گیاه سویا مشاهده شد. کمترین میزان رشد طولی ساقه در گیاه آلوده به‌عامل بیمارگر *M. phaseolina* مشاهده گردید. تیمار قارچکش شیمیایی، اختلاف معنی‌داری از نظر طول ساقه گیاه در مقایسه با نمونه شاهد نشان نداد ولی همه تیمارهای قارچ تریکودرما (والد و جدایه جهش‌یافته) در حضور عامل بیمارگر، مقادیر بالاتری از رشد طولی ساقه را نسبت به نمونه شاهد و تیمار شیمیایی از خود نشان دادند. بالاترین میزان طول ریشه، در نمونه‌های تیمار شده با قارچ تریکودرما، به‌ویژه در تیمار گیاه با جدایه تریکودرمای جهش‌یافته NAS-K1M25، هم بدون حضور قارچ بیمارگر و هم در حضور قارچ بیمارگر، مشاهده گردید. بالاترین میزان طول ریشه گیاه در تیمار NAS-K1M25+P مشاهده شد که علی‌رغم حضور عامل بیمارگر، این میزان افزایش طول ریشه حدود ٤٠ درصد بیشتر از نمونه شاهد بود. کمترین میزان طول ریشه در نمونه گیاه بیمار در حضور عامل بیمارگر *M. phaseolina* مشاهده گردید. همچنین؛ بالاترین میزان وزن تر ساقه گیاه نیز در نمونه تیمار شده با قارچ‌های جهش‌یافته NAS-K1M25 و NAS-K1M1 مشاهده شد که دارای اختلاف قابل توجهی نسبت به نمونه شاهد بودند و مقادیر بالاتری را نسبت به گیاهان تیمارشده با قارچکش شیمیایی نشان می‌دادند. کمترین میزان وزن تر ریشه نیز در گیاه بیمار تیمار شده با عامل بیمارگر *M. phaseolina* و نمونه شاهد مشاهده گردید. بالاترین میزان وزن تر ریشه با اختلاف قابل توجهی نسبت به نمونه شاهد (حدود دو برابر) در نمونه تیمار شده با قارچ تریکودرمای جهش‌یافته NAS-K1M25 مشاهده شد. حتی در حضور عامل بیمارگر نیز توانایی این جدایه جهش‌یافته در افزایش وزن تر ریشه، قابل توجه بود و بالاترین میزان وزن تر گیاه را نسبت به تیمارهای دیگر از خود نشان داد. تیمار قارچ جدایه تریکودرمای جهش‌یافته NAS-K1M25 از نظر وزن خشک ساقه، اختلاف آماری با نمونه شاهد نداشت اما در حضور عامل بیمارگر، این شاخص افزایش نشان داد و از نظر آماری دارای مقادیر بالاتری نسبت به تیمارهای دیگر و نمونه شاهد بود. همچنین؛ همه تیمارهای گیاه سویا با قارچ تریکودرما، دارای مقادیر وزن خشک ریشه بالاتری نسبت به نمونه شاهد بودند و بالاترین این میزان در نمونه تیمار شده با قارچ جدایه تریکودرمای جهش‌یافته NAS-K1M25 و به‌ویژه، در حضور عامل بیمارگر، مشاهده گردید. البته این مقادیر، اختلاف معنی‌داری با نمونه تیمار شیمیایی از خود نشان ندادند. پایین‌ترین میزان وزن خشک ریشه در گیاه بیمار با عامل بیمارگر *M. phaseolina* مشاهده گردید. همه تیمارهای قارچ تریکودرما از نظر ارزیابی شاخص وقوع بیماری، اختلاف آماری با نمونه شاهد از خود نشان ندادند که این موضوع نشان می‌دهد علاوه بر اینکه خود قارچ تریکودرما به تنهایی تأثیر منفی بر فاکتورهای رشدی گیاه سویا ندارد، بلکه خود به‌عنوان آنتاگونیست، منجر به بهبود رشد و جلوگیری از بیمار شدن گیاه در حضور عامل بیمارگر *M. phaseolina* شده است. حتی مشخص شد که کارایی این قارچ نسبت به تیمار سم شیمیایی، بهتر بوده و نتایج، دارای اختلاف آماری بودند. به‌طور کلی، نتایج نشان داد که عامل بیمارگر *M. phaseolina* منجر به کاهش فاکتورهای رشد گیاه از جمله طول ساقه، طول ریشه و وزن تر و خشک ریشه و ساقه و موجب بوته میری گیاه شد ولی در صورت استفاده از عامل آنتاگونیست قارچ تریکودرما، این شاخص‌ها، بهبود یافته و گاهی حتی از تیمار شیمیایی نیز بهتر بودند و گیاه تیمار شده، شرایط رشد بهتری را نسبت به گیاه شاهد دارا بود. بهترین نتایج در بین تیمارهای مورد ارزیابی، در نمونه‌های گیاه تیمار شده با NAS-K1M25 مشاهده گردید (جدول ۲).



شکل ۱- نتایج بازدارندگی از رشد بیمارگر *Macrophomina phaseolina* با آزمون کشت متقابل با جدایه‌های جهش‌یافته تریکودرما ، حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در سطح ۵ درصد می‌باشد

Fig. 1. The result of the growth inhibition of *Macrophomina phaseolina* by *Trichoderma* mutants dual culture. The different letters in each column are significantly difference at the 5% level

جدول ۲- مقایسه میانگین شاخص‌ها (طول ساقه، طول ریشه، وزن تر و خشک ریشه و ساقه و شاخص وقوع بیماری) در گیاهان سویا تحت تیمار با سوسپانسیون اسپور تریکودرما (والد NAS-K1 و دو جدایه جهش‌یافته منتخب NAS-K1M25 و NAS-K1M1).

Table 2. The comparison of soybean growth parameters (shoot length, root length, fresh and dry weight of root & shoot and the disease index) treated with *Trichoderma* spore suspension (wild type NAS-K1 and two mutant selective isolates NAS-K1M1 & NAS-K1M25).

Treatment	Root dry weight	Shoot dry weight	Root wet weight	Shoot wet weight	Root length	Shoot length	Disease Incidence
control	0/08±0/23^{cd}	0/70±1/37^{bc}	0/44±0/80^{de}	2/41±4/14^{bc}	3/23±19/54^{e}	1/65* ± 21/24^{d}	0/00±1/00^{c}
NAS-K1	0/11±0/42^{ab}	0/42±1/82^{ab}	0/37±1/21^{a-d}	1/08±4/47^{bc}	5/18±25/80^{cd}	2/65±30/30^{ab}	0/00±1/00^{c}
NAS-K1+P	0/11±0/34^{ab}	0/28±1/44^{bc}	0/58±1/36^{a-c}	1/09±4/35^{bc}	5/00±30/57^{ab}	2/52±28/28^{b}	0/52±1/38^{c}
NAS-K1M1	0/11±0/38^{ab}	0/48±1/42^{bc}	0/51±1/17^{a-d}	0/94±3/25^{c}	4/33±26/61^{b-d}	2/24±29/35^{b}	0/00±1/00^{c}
NAS-K1M1+P	0/06±0/32^{bc}	0/21±1/82^{ab}	0/17±0/97^{c-e}	0/57±5/14^{ab}	3/53±25/78^{cd}	4/34±28/65^{b}	0/46±1/25^{c}
NAS-K1M25	0/10±0/44^{a}	0/41±1/49^{bc}	0/52±1/49^{ab}	1/23±3/45^{c}	3/57±29/48^{a-c}	4/91±32/94^{a}	0/00±1/00^{c}
NAS-K1M25+P	0/12±0/40^{ab}	0/97±2/11^{a}	0/65±1/61^{a}	2/04±6/00^{a}	4/03±32/14^{a}	4/65±26/61^{bc}	0/35±1/13^{c}
M. phaseolina	0/03±0/15^{d}	0/25±1/05^{c}	0/28±0/54^{e}	0/57±3/17^{c}	2/66±13/31^{f}	1/37±17/51^{e}	0/52±3/63^{a}
Chemical	0/08±0/33^{bc}	0/42±1/61^{a-c}	0/36±1/05^{b-d}	1/17±4/36^{bc}	4/98±22/48^{de}	3/92±23/95^{cd}	0/52±2/38^{b}

* حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵ درصد می باشد

* The different letters in each column are significantly difference at the 5% level

نتایج ارزیابی کارایی بیوفرمولاسیون‌ها در گلخانه

از جدایه برتر جهش‌یافته NAS-K1M25 و والد اولیه قارچ NAS-K1، برای تهیه سه بیوفرمولاسیون مختلف پوشش‌دهی بذر، پودر و گرانول استفاده شد و کارایی بیوفرمولاسیون‌های مختلف در حضور و عدم حضور قارچ عامل بیمارگر *M. phaseolina* در مقایسه با تیمار قارچکش شیمیایی، نمونه شاهد و قارچکش بیولوژیک تجاری (تریکودرمین – ب، شرکت تلفیقدانه) ارزیابی شد. نوع تیمارهای به‌کار رفته در این مرحله، در جدول ۳؛ آورده شده است. در شکل ۲؛ مقایسه میانگین طول ساقه، تعداد گره در ساقه، وزن خشک ساقه و تعداد شاخه در ساقه نشان داده شده است. همه تیمارهای مورد ارزیابی از نظر شاخص‌های مورد بررسی، دارای اختلاف معنی‌دار آماری در سطح پنج درصد بودند. در بررسی میزان رشد طولی ساقه، مشخص گردید که تیمارهای قارچ جهش‌یافته تریکودرما، تأثیر بیشتری در افزایش طول نسبت به تیمارهای قارچ والد دارند. تیمار بیوفرمولاسیون گرانول قارچ جهش‌یافته، بالاترین میزان افزایش طول ساقه را نشان داد. همچنین، تیمارهای پوشش‌دهی بذر، دارای اختلاف معنی‌دار آماری در مقایسه با نمونه شاهد بودند و مشابه با تیمار سم شیمیایی، قادر به‌کنترل عامل بیمارگر بودند. همچنین؛ بالاترین میزان وزن خشک ساقه در تیمارهای پوشش‌دهی بذر و پودر (هم در قارچ والد و هم در قارچ جهش‌یافته) مشاهده شد. تیمار سم شیمیایی از نظر آماری مقادیر پایین‌تری حتی نسبت به نمونه شاهد از خود نشان داد و اختلاف معنی‌داری نسبت به نمونه گیاه آلوده به بیمارگر *M. phaseolina* نداشت. همچنین، نشان داده شد که تیمارهای پودر وتابل و پوشش‌دهی بذر، به‌طور قابل ملاحظه‌ای منجر به افزایش تعداد گره‌های موجود روی ساقه می‌شوند. هر سه بیوفرمولاسیون پوشش‌دهی بذر، پودر وتابل و گرانول حاوی قارچ جهش‌یافته، منجر به افزایش تعداد شاخه در گیاه سویا شدند.

تیمار قارچکش بیولوژیک تجاری اشاره شده، در شاخص‌های مورد بررسی، اختلاف معنی‌دار آماری با نمونه شاهد از خود نشان نداد ولی تیمارهای قارچکش بیولوژیک تریکودرما، دارای اختلاف معنی‌دار آماری با نمونه شاهد بودند.

این نتایج، نشان داد استفاده از این بیوفرمولاسیون‌ها باعث می‌شود علاوه بر اینکه در حضور عامل بیمارگر، اختلاف معنی‌داری با گیاهان تیمار شده بدون عامل بیمارگر نداشته باشند، بلکه مقادیر بالاتری از شاخص‌های رشد بوته سویا نسبت به نمونه شاهد و تیمار سم شیمیایی را از خود نشان بدهند. همچنین، در گیاهان بیمار که دچار بوته‌میری نشده بودند، میزان تولید بذر به‌طور معنی‌داری پایین بود و نمونه تیمار قارچکش بیولوژیک تجاری، اختلاف معنی‌داری با نمونه شاهد و تیمار شیمیایی نداشت. بیشترین میزان افزایش عملکرد در شرایط وجود بیمارگر، با استفاده از تیمار بیوفرمولاسیون پوشش بذر با جدایه جهش‌یافته NAS-K1M25 مشاهده شد که نشان می‌دهد القای جهش در عامل بیولوژیک به بهبود کارایی تریکودرما در افزایش محصول در شرایط گلخانه کمک می‌کند. بیوفرمولاسیون‌های پودر و گرانول تهیه شده از جدایه جهش‌یافته نیز، در حضور بیمارگر، دارای توانایی بهبود عملکرد قابل توجهی بودند به‌طوریکه میزان عملکرد بوته با شاهد (بدون بیمارگر) تفاوت معنی‌دار آماری نداشت (شکل ۳).

میزان شاخص وقوع بیماری در بیوفرمولاسیون‌های مختلف به‌شکل معنی‌داری در مقایسه با شاهد بیمار، کاهش یافت و نتایج مربوط به این شاخص برای بیوفرمولاسیون‌های تهیه شده از تریکودرمای والد و جهش‌یافته، نسبت به سم شیمیایی و قارچکش تریکودرمین– ب، به‌طور معنی داری، کمتر بود. در بیوفرمولاسیون‌های گرانول و پوشش‌دهی بذر تهیه شده از جدایه جهش‌یافته NAS-K1M25، بهترین نتایج به‌دست آمد که نشان داد القای جهش در عامل بیوکنترل به‌طور معنی‌داری کارایی بیوفرمولاسیون را افزایش داده است (شکل ٤).

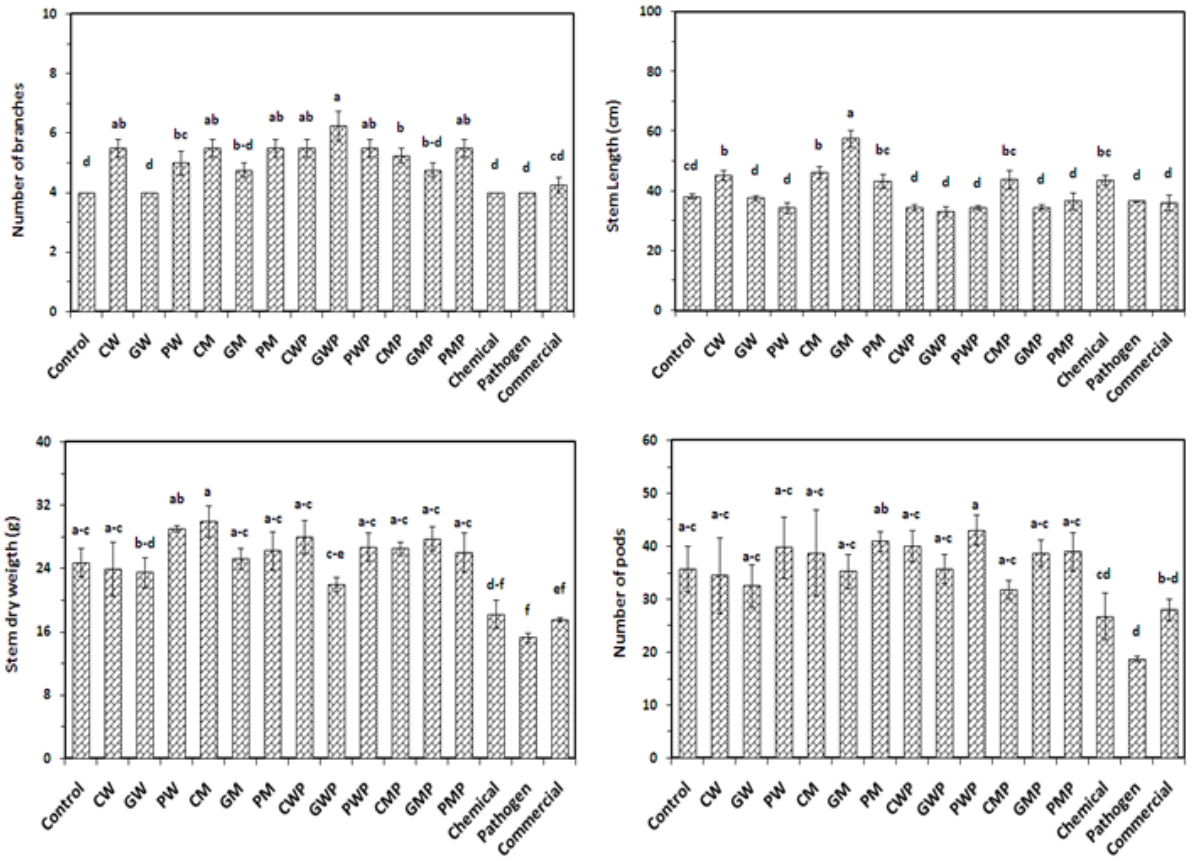
جدول ۳- تیمارهای به‌کار گرفته شده در مرحله ارزیابی کارایی بیوفرمولاسیون‌ها بر شاخص‌های رشد بوته سویا در شرایط گلخانه

Table 3. Treatments used in the evaluation stage of bio-formulation effectiveness on soybean growth indices in greenhouse conditions

Control	(GWP) Granola & wild type & Pathogen
(CW) Seed coating & Wild type	(PWP) Powder & wild type & Pathogen
(GW) Granola & wild type	(CMP) Seed coating & Mutant &Pathogen
(PW) Powder & wild type	(GMP) Granola & Mutant & Pathogen
(CM) Seed coating & Mutant	(PMP) Powder & Mutant & Pathogen
(GM) Granola & Mutant	(Pathogen) *M. phaseolina*
(PM) Powder & Mutant	(Chemical) Tiabendazole
(CWP) Seed coating & Wild type & Pathogen	(Commercial) Trichodermin-B

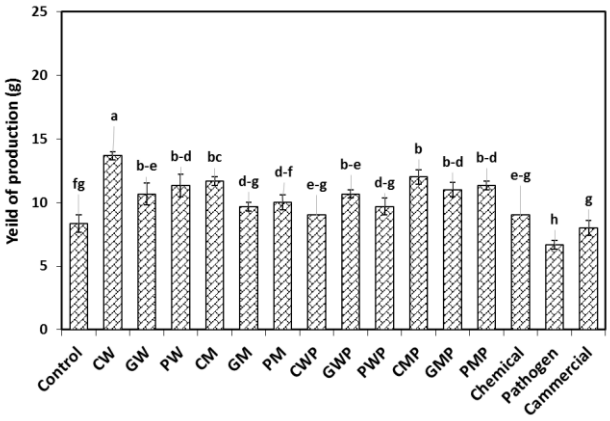
تأثیر بیوفرمولاسیون پوشش‌دهی بذر بر جوانه‌زنی بذر سویا

با توجه به نتایج مطلوب بیوفرمولاسیون پوشش‌دهی بذر، تأثیر این بیوفرمولاسیون بر شاخص‌های شکل‌شناسی (طول ریشه‌چه و ساقه‌چه، وزن تر و خشک ساقه‌چه، ریشه‌چه و گیاهچه) بررسی شد و همه داده‌ها در سطح آماری پنج درصد دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند. درصد جوانه‌زنی و شاخص ویگور بذر نیز بررسی شدند که در سطح آماری ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند (شکل‌های ۵ و ٦). این بیوفرمولاسیون، بر خصوصیات جوانه‌زنی، تأثیر مثبت داشته و استفاده از جدایه جهش‌یافته، نه تنها باعث هیچ کاهشی در جوانه‌زنی بذر سویا نمی‌شود بلکه، آن را بهبود هم می‌بخشد.



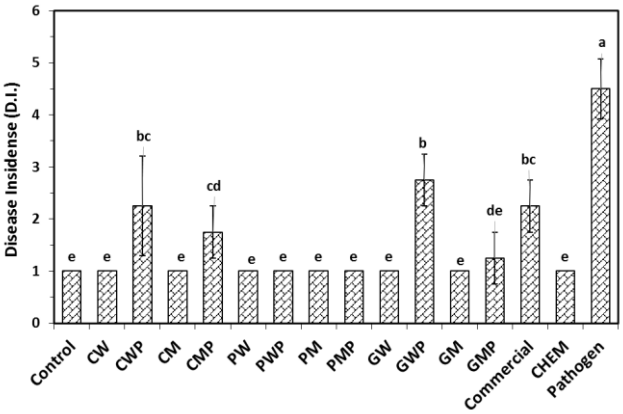
شکل ۲- مقایسه تأثیر بیوفرمولاسیون‌ها بر شاخص‌های رشد بوته سویا در ارزیابی گلخانه. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در سطح ۵ درصد می‌باشد

Fig. 2. Comparison of the effect of bio-formulations on soybean growth parameters in greenhouse evaluation. The different letters in each column are significantly difference at the 5% level.



شکل۳- مقایسه تأثیر بیوفرمولاسیون‌ها بر عملکرد بوته سویا. در ارزیابی گلخانه. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Fig. 3. Comparison of the effect of bio-formulations on soybean yield production in greenhouse evaluation. The different letters in each column are significantly difference at the 5% level

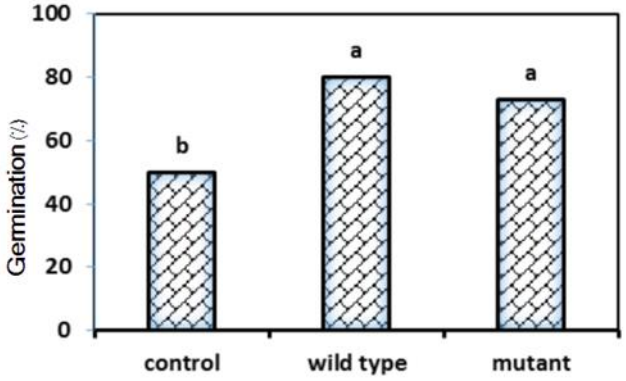


شکل ٤- مقایسه تأثیر بیوفرمولاسیون‌ها بر درصد وقوع بیماری در گیاهان سویا در ارزیابی گلخانه. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در سطح ۵ درصد می‌باشد

Fig. 4. Comparison of the effect of bio-formulations on percentage of disease incidence in soybean in greenhouse evaluation. The different letters in each column are significantly difference at the 5% level .

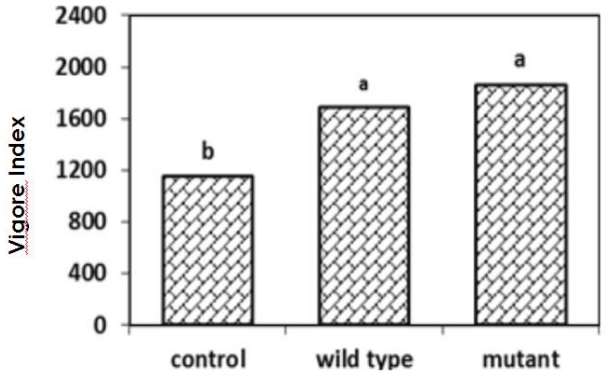
در همین زمینه، در پژوهش مشابه دیگری گزارش شد که تلقیح قارچ *T. viride* سبب افزایش معنی‌دار طول ریشه، وزن ساقه، وزن گیاهچه و تعداد گره در گیاه سویا می‌شود. همچنین تعداد ریشه‌های فرعی در تیمارهای قارچی نسبت به شاهد بسیار بیشتر بود (Yazdani *et al.*, 2008).

بهبود فعالیت میکروارگانیسم‌های خاک و خصوصیات رشدی گیاهانی ازجمله، زیره (Haggag and Abo-sedra,2005)، اسفناج (Mottaghian *et al.*, 2009)، نخود فرنگی (Kukuk *et al.*, 2007)، سویا (Yazdani *et al.*, 2008) و گندم (Shahsavari *et al.*, 2010) در تیمار با گونه‌های مختلف قارچ تریکودرما نیز گزارش شده است.



شکل ۵- مقایسه تأثیر بیوفرمولاسیون پوشش‌دهی بذر بر درصد جوانه زنی بذر سویا، حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در سطح ۵ درصد می‌باشد.

Fig. 5. Comparison of the effect of seed coating bio-formulations on percentage of soybean seed germination The different letters in each column are significantly difference at the 5% level



شکل ٦- مقایسه تأثیر بیوفرمولاسیون پوشش‌دهی بذر بر شاخص ویگور بذر سویا. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار آماری در سطح ۵ درصد می‌باشد

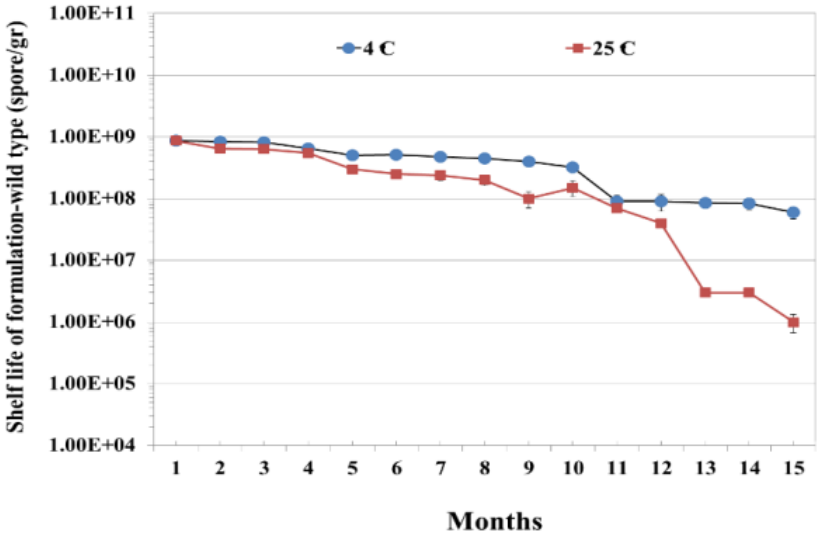
Fig. 6. Comparison of the effect of seed coating bio-formulation on percentage of soybean seed vigor index. The different letters in each column are significantly difference at the 5% level

ماندگاری بیوفرمولاسیون

علاوه بر کارایی بیوفرمولاسیون در کنترل بیماری، ماندگاری آن نیز از اهمیت زیادی برخوردار است. نتایج نشان داد که نگهداری بیوفرمولاسیون پودر جدایه‌های والد و جهش‌یافته، در دو دمای ٤ درجه سلسیوس و ۲۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ ماه از پایداری قابل توجهی برخوردار است به‌طوری‌که بیوفرمولاسیون پودر در مدت ۱۱ ماه در دمای اتاق، تنها یک لوگ کاهش جمعیت اسپور را نشان داد (شکل‌های ۷ و ۸). همچنین، نگهداری در دمای یخچال توانست از کاهش جمعیت فعال گونه‌های والد و هم جدایه‌های جهش‌یافته، بکاهد که این موضوع نشان می‌دهد نگهداری بیوفرمولاسیون پودر تریکودرما در دمای ٤ درجه سلسیوس، مناسب‌تر است (شکل ۸).

در بیوفرمولاسیون گرانول نیز روند کاهش ماده مؤثره، تا ماه یازدهم مانند بیوفرمولاسیون پودر بود و پس از آن، کاهش ماده مؤثره روند صعودی یافت. همچنین، نگهداری در دمای یخچال توانست هم در گونه والد و هم در جدایه‌های جهش‌یافته، از کاهش جمعیت فعال بکاهد که نشان می‌دهد نگهداری بیوفرمولاسیون گرانول تریکودرما در دمای ٤ درجه سلسیوس مناسب‌تر است. البته در هیچ‌کدام از بیوفرمولاسیون‌های گرانول، تفاوت معنی‌داری بین گونه والد و جدایه جهش‌یافته مشاهده نشد (داده‌ها نشان داده نشده است).

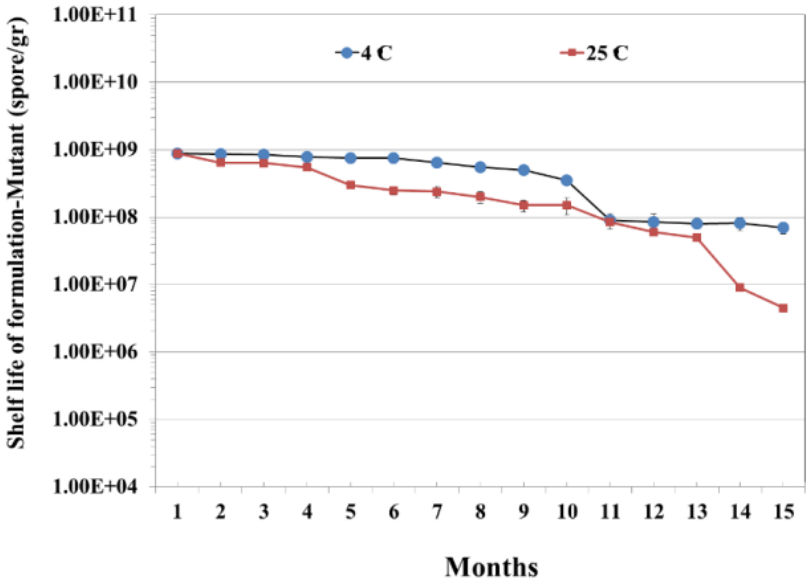
با این وجود، حفظ فعالیت ماده بیولوژیک در بیوفرمولاسیون تهیه شده در این پژوهش، با گذشت ۱۵ ماه از سطح قابل قبولی برخوردار بود به‌طوری‌که تنها یک لگاریتم از جمعیت آن کاسته شد و همچنان میزان جمعیت، بالاتر از $۱۰^{۵}$ بود تا جایی که پس از پایان این مدت، حتی در بیوفرمولاسیون والد نگهداری شده دردمای اتاق، که کمترین میزان حفظ جمعیت فعال را در بین همه داشت، این میزان در حدود $۱۰^{٦}$ اسپور در هر گرم از بیوفرمولاسیون بود. با توجه به‌میزان توصیه شده $۱۰^{۵}$ اسپور در هر گرم از جمعیت ماده بیولوژیک در بیشتر فرمول‌های بیولوژیک موجود در بازار، می‌توان ادعا نمود که ترکیب ساده این بیوفرمولاسیون، بسیار مؤثرتر از تریکودرمین- ب مورد بررسی بوده و امکان نگهداری طولانی مدت بیشتری را به‌کاربر می‌دهد.



شکل ۷- بررسی روند فعال ماندن ماده بیولوژیک در بیوفرمولاسیون پودر تهیه شده از قارچ والد تریکودرما در طول ۱۵ ماه.

نمودار -■-: نگهداری بیوفرمولاسیون در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و نمودار -●-: نگهداری بیوفرمولاسیون در دمای ٤ درجه سلسیوس.

Fig. 7. Evaluation of viability steps of biological agent in powder bio-formulation prepared from wild type of *Trichoderma* during 15 months. chart -■-: bio-formulation storage at 25 ˚C and chart -●-: bio-formulation storage at 4 ˚C.



شکل ۸- بررسی روند فعال ماندن ماده بیولوژیک در بیوفرمولاسیون پودر تهیه شده از قارچ جهش‌یافته تریکودرما در طول ۱۵ ماه. نمودار -■- : نگهداری بیوفرمولاسیون در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و نمودار -●- : نگهداری بیوفرمولاسیون در دمای ٤ درجه سلسیوس.

Fig. 8. Evaluation of viability steps of biological agent in powder bio-formulation prepared from mutant of *Trichoderma* during 15 months. chart -■- : bio-formulation storage at 25 ˚C and chart -●- : bio-formulation storage at 4 ˚C.

بحث

فعالیت آنتاگونیستی گونه‌های تریکودرما علیه بسیاری از بیمارگرهای گیاهی گزارش شده است (Verma *et al.*, 2007; Gajera *et al.*, 2013 and Aleaghayee *et al.*, 2018).

در پژوهش حاضر توانایی بازدارندگی از رشد میسلیومی چندگونه تریکودرما با استفاده از کشت متقابل بررسی و تفاوت‌هایی در توانایی آنها در بازدارندگی از توسعه ریسه ماکروفومینا در شرایط درون شیشه‌ای مشاهده شد. در بین جدایه‌های مورد بررسی، گونه *T. koningii* NAS-K1، بالاترین توانایی بازدارندگی از رشد *M.phaseolina* را دارا بود (٦٤/٥٦ درصد) و به‌عنوان گونه منتخب برای القای جهش به‌منظور بهبود خصوصیات آنتاگونیستی علیه بیمارگر مذکور انتخاب شد. پرتوتابی روی این گونه، براساس معیار دُز جذبی مناسب برای القای جهش غیرکشنده در ارگانیسم-ها، که ظهور تقریباً ٥٠-٤٠ درصد جوانه‌زنی اسپور بعد از پرتوتابی می‌باشد، با دُز ۲۵۰ گری انجام شد (Moradi *et al.*, 2013).

سرعت رشد، میزان اسپورزایی، ابعاد کنیدیوم‌های نتاج پرتودیده و توانایی آنتاگونیستی آنها علیه *M. phaseolina* بررسی شد و نتایج نشان داد که القای جهش، قادر به افزایش معنی‌دار قدرت آنتاگونیستی در جهش‌یافته‌ها و در سطح پنج درصد بود.

به‌عنوان نمونه، در یک پژوهش، افزایش توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های جهش‌یافته *T. harzianum* علیه قارچ بیمارگر *M. phaseolina* گزارش شده است (Abbasi *et al.*, 2014). در یک پژوهش دیگر، از برخی جدایه‌های *Trichoderma* ازجمله، *T. harzianum* (T39)، *T. virens*، *T. viride*، *T. harzianum* (M) و محصول تجاری تریکودرمین- ب (Trichodermin B) برای کنترل بیولوژیک بیماری ساق سیاه خربزه ناشی از قارچ *M. phaseolina* استفاده شد. نتایج نشان داد که مواد مترشحه از گونه‌های *Trichoderma* به‌طور کامل

از رشد بیمارگر در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری می‌نماید به‌طوری‌که قارچ *T. viride* رشد بیمارگر را به‌میزان ۳٤,۹ تا ۷۱ درصد کاهش داده است (Etebarian, 2006).

در پژوهش‌های مشابه، ارزیابی کارایی جدایه‌های جهش‌یافته منتخب در گلخانه انجام شد و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح پنج درصد نشان داد که همه فاکتورهای شکل‌شناسی مورد بررسی در گیاهان تحت تیمار با جدایه‌های جهش‌یافته (بدون حضور بیمارگر)، کاهش نداشته و عدم وجود تأثیر نامناسب جدایه‌های جهش‌یافته بر رشد گیاه سویا را به اثبات رساند. افزودن جدایه‌های جهش‌یافته تریکودرما با پرتو گاما، روی گیاه پیاز (Haggag and Mohamed, 2002)، برنج (Cumagun, 2012) و خیار (Zhang *et al.*, 2013)، نه‌تنها تأثیرات نامطلوب نداشت بلکه بر مقاومت به تنش‌هایی از جمله، شوری و خشکی نیز افزود.

در مطالعه حاضر، همه فاکتورهای مورفولوژیکی مورد ارزیابی در تیمارهای مختلف در سطح پنج درصد، دارای اختلاف معنی‌دار آماری بودند و داده‌ها، بیانگر تأثیر تیمار گیاه با تریکودرما بر شاخص‌های مورد ارزیابی بود. بالاترین طول ساقه گیاه در تیمار قارچ جدایه جهش یافته NAS-K1M25 مشاهده گردید گرچه این تیمار، اختلاف معنی‌داری از نظر اندازه طول ساقه با تیمار قارچ والد NAS-K1 نداشت ولی به‌میزان بیش از ۳۰ درصد نسبت به نمونه شاهد، افزایش طول ساقه در گیاه سویا مشاهده شد که نشان می‌دهد نقش تریکودرما در جذب و القای رشد در گیاه با اعمال جهش در ژنوم تریکودرما تغییری نداشته و جهش یافته‌های منتخب، برای تهیه قارچکش بیولوژیک نه تنها اثر نامطلوبی بر رشد گیاه در شرایط عادی ندارند بلکه می‌توانند رشد سیستم ریشه‌ای و رشد اندام هوایی را هم، افزایش دهند. این تأثیر مثبت تریکودرما، پیشتر نیز روی محصولات مختلف ازجمله، گوجه فرنگی (Salari *et al.*, 2014) و گندم (Mehrabi and Zafari, 2008) گزارش شده بود.

در مقالات متعددی، به توانایی قارچ‌های جنس *Trichoderma* در کنترل بیولوژیکی بسیاری از عوامل بیمارگر گیاهی اشاره شده است (Barari, 2016; Harman, 2006 and Pushvapavathi *et al.*, 2016). برای نمونه، در یک پژوهش گزارش شد که پوسیدگی ریشه ناشی از *Rhizoctonia solani* در اثر تیمار خاک با عامل بیوکنترل *Trichoderma* که روی سبوس گندم تکثیر شده، به‌طور مؤثری کاهش می‌یابد (Elad *et al.*, 1982). در یک پژوهش دیگر، در شرایط گلخانه، تأثیر مثبت گونه‌های *Trichoderma* در افزایش رشد گیاه و کاهش مرگ گیاهچه ناشی از *M. phaseolina* روی خربزه به اثبات رسید(Etebarian, 2006). در همین راستا، گزارشاتی مبنی بر افزایش طول ساقه، ریشه و ضریب ایستادگی در حضور آنتاگونیست *Trichoderma* ارائه شده است. به‌عنوان نمونه، در یک پژوهش، با کاربرد آنتاگونیست‌های *T. harzianum* و *T.viride* در آزمایشات گلخانه‌ای علیه بیمارگر *M. phaseolina* (عامل پوسیدگی ریشه بادام زمینی)، کنترل بهتر پوسیدگی ریشه، افزایش طول ساقه و ریشه بادام زمینی، نشان داده شد. این موضوع نشان داد که گونه‌های *Trichoderma* قادر به تولید فاکتورهای محرک رشد گیاهی هستند (Sreedevi *et al.*, 2011). مشخص شده است درتعامل مستقیم آنتاگونیست وگیاه میزبان، برخی گونه‌های *Trichoderma* با نفوذ به لایه‌های اپیدرم و کورتکس بیرونی، سطح ریشه را کلونیزه می‌کنند (Yedidia *et al.*, 1999) و درنتیجه، رشد گیاه را تحریک کرده (Benitez *et al.*, 2004; Harman *et al.*, 2004) و مواد غذایی محلول را برای گیاه فراهم می‌کنند (Harman and Kubicek, 1998; Yedidia *et al.*, 1999). این پدیده، مشابه با اثر ریزوباکتری‌های محرک رشد گیاه، سبب القاء مقاومت در گیاه شده و سیستم دفاعی آن را افزایش می‌دهد.

بازبینی دقیق‌تر تحقیقات آنتاگونیستی انجام شده، چه در شرایط آزمایشگاهی و چه در شرایط گلخانه، نشان می‌دهد که در هر آزمایش، سطح کنترل از یک جدایه به جدایه

دیگر متغیر است. به طوری‌که در برخی از آزمون‌های انجام شده مشخص گردید که نه‌تنها برخی جدایه‌ها، مانع رشد عامل بیمارگر نمی‌شوند بلکه سبب افزایش رشد بیمارگر نسبت به تیمار شاهد شده‌اند. به‌عنوان نمونه، نتایج یک پژوهش نشان داد که کاربرد *T. harzianum* هیچ گونه تأثیری روی وقوع بیماری پوسیدگی ذغالی کنجد ندارد (Cardona and Rodriguez, 2006). در یک بررسی مشابه، ثابت شد که *T. polysporum* تأثیر تحریک کنندگی روی رشد شعاعی قارچ *M. phaseolina* در محیط کشت PDA دارد (Khan and Gupta, 1998). بنابراین؛ وجود چنین تفاوت‌هایی در فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های *Trichoderma* در شرایط طبیعی، دور از انتظار نیست. جدایه‌های مورد بررسی در پژوهش حاضر، تحت پرتوتابی گاما واقع شدند و با توجه به تصادفی بودن وقوع جهش در اثر کاربرد پرتو گاما، مشاهده بروز جهش-های نامطلوب دور از انتظار نبود. می‌توان گفت همچنان که پرتوتابی، سبب افزایش فعالیت آنتاگونیستی برخی جدایه‌ها می‌شود، در مقابل نیز، جدایه‌هایی ایجاد می‌شوند که فعالیت آنتاگونیستی پایینی دارند. به عبارت دیگر، پرتوتابی اشعه گاما می‌تواند سبب تغییر در فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌ها شود و این تغییرات از یک جدایه به جدایه دیگر در کنترل بیمارگرهای مختلف، متفاوت است.

مطالعه حاضر، امکان افزایش و بهبود توانایی تریکودرما را در کنترل بیولوژیک بیماری ذغالی سویا از طریق ایجاد جهش با پرتوتابی گاما، در شرایط گلخانه، نشان داد و با توجه به تأثیر جدایه‌های جهش‌یافته تریکودرما بر بیمارگر *M. phaseolina*، هم در آزمون‌های درون شیشه‌ای و هم تحت شرایط گلخانه، این جدایه‌ها می‌توانند به‌عنوان یک عامل کنترل بیولوژیک موفق در کنترل بیماری پوسیدگی ذغالی ریشه به‌کار گرفته شوند. همچنین، با توجه به این که بسیاری از عوامل زراعی ازجمله، تناوب، افزایش مواد اصلاح کننده خاک، تغییرات اسیدیته و بافت خاک و... ، می‌توانند در استقرار آنتاگونیست‌ها، موثر بوده و اثر افزایشی یا کاهشی داشته باشند بنابراین، بررسی اثر آنتاگونیست‌های مورد نظر در شرایط مزرعه‌ای و خاک غیر استریل به‌منظور شناسایی شرایط ایده‌آل در جهت بالا بردن کارایی عوامل بیوکنترل و روش‌های به کار گرفته شده، ضروری به نظر می‌رسد.

References

ABBASI, S., N. SAFAIE and M. SHAMSBAKHSH, 2014. Evaluation of gamma-induced mutants of *Trichoderma harzianum* for biological control of charcoal rot of melon (*Macrophomina phaseolina*) in laboratory and greenhouse conditions." Journal of Crop Protection, 3(4): 509-521.

ABDEL-LATEIF, K.S. 2017. *Trichoderma* as biological control weapon against soil born plant pathogens. African Journal of Biotechnology, 16, No. 50: 2299-2306.

AHMADI, K., H. GHOLIZADEH, H.R. EBADZADEH, F. HATAMI, R. HOSSEINPOUR, H. ABDESHAH, M.M. REZAEE and M. FAZLI-ESTABRAGH, 2017. Agricultural Statistics of Iran, Information and Communication Technology Center, Planing and Economic Affair, Ministry of Agriculture-Jahad, 3: 239.

ALEAGHAEE, SH., S. REZAEE, M. EBADI and H.R. ZAMANIZADEH, 2018. The efficacy of some native *Trichoderma* isolates in induction of resistance in tomato against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, the causal agent of *Fusarium* wilt disease. Journal of Entomology and Phytopatology, 85(2): 219-233.

ANONYMOUS, 2019. “The most important achievements of major projects in the field of agriculture were announced”. Information and Public Relations Center, Ministry of Agriculture-Jahad, (https://ab_qazvin.maj.ir/Index.aspx?page_=dorsaetoolsenews&lang=1&sub=0&PageID=118732&PageIDF=0&tempname=main).

BABU, B.K., A.K. SAXENA, A.K. SRIVASTAVA and D.K. ARORA, 2007. Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligo-nucleotide primers and probe. Mycologia, 99: 797–803.

BAHARVAND, A., S. SHAHBAZI, H. AFSHARMANESH, M.A. EBRAHIMI and H. ASKARI, 2014. Investigation of gamma irradiation on morphological characteristics and antagonist potential of *Trichoderma viride* against *M. phaseolina*. International Journal of Farming and Allied Sciences 3, No.11: 1157-1164.

BARARI, H. 2016. Biocontrol of tomato to *Fusarium* Wilt by *Trichoderma* species under in vitro and in vivo condition. Cercetari Agronomice in Maldova, 165: 91- 98.

BENITEZ, T., A.M. Rincon, M.C. Limon and A.C. Codon, 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, 7: 249-260.

CARDONA, R and H. RODRIGUEZ, 2006. Effects of *Trichoderma harzianum* fungus on the incidence of the charcoal rot disease on sesame. Review of the Faculdade de Agronomia. (LUZ), 23: 42-47.

CUMAGUN, C.J.R. 2012. Managing Plant Diseases and Promoting Sustainability and Productivity with Trichoderma: The Philippine Experience. Journal of Agricultural Science and Technology, 14: 699-714.

GAJERA, H., R. DOMADIYA, S. PATEL, M. KAPOPARA and B. GOLAKIYA, 2013. Molecular mechanism of *Trichoderma* as bio-control agents against phytopathogen system–a review. Curr Res Microbiol Biotechnol, 1(4): 133-142.

ELAD, Y., I. CHET and Y. HENIS, 1982. Degradation of plant pathogenic fungi by *Trichoderma harzianum*. Canadian Journal of Microbiology. 28:719-725.

ETEBARIAN, H.R. 2006. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of charcoal stem rot in melon caused by *Macrophomina phaseolina*. Journal of Agricultural Science and Technology, 8: 243-250.

HAGGAG, W.M. and H.A.A. MOHAMED, 2002. Enhanecment of antifungal metabolite production from gamma-ray induced mutants of some *Trichoderma* species for control onion white disease. Plant Pathology Bulletin, 11: 45-56.

HAGGAG, W.M. and S.A. ABO-SEDERA, 2005. Characteristics of three *Trichoderma* species in peanut haulms compost involved in biocontrol of cumin wilt disease. International Journal Agriculture Biology, 7(2): 222-229.

HARMAN, G.E and P.K. KUBICEK, 1998. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 2. Enzymes, Biological Control and Commercial Applications. Taylor and Francis, Londan, pp. 1-393.

HARMAN, G.E., C.R. HOWELL, A. VITERBO, I. CHET and M. LORITO, 2004. *Trichoderma* species-opportunictic, avirulant plant symbionts. Nature Review Microbiology, 2: 43-56.

HARMAN, G.E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* sp. Phytopathology. 96: 190-194.

HARTMAN, G.L., J.B. SINCLAIR and J.C. RUPE, 1999. Compendium of Soybean Diseases, (4th Ed.), American Phytopathological Society Press, St Paul, MN, USA.

JAYARAJ, J. and N.V. RADHAKRISHNAN, 2003. "Development of UV-induced carbendazim-resistant mutants of *Trichoderma harzianum* for integrated control of damping-off disease of cotton caused by *Rhizoctonia solani*." Journal of Plant Diseases and Protection 110, No. 5: 449-460.

KHAN, M.R and J. GUPTA, 1998. Antagonistic efficacy of *Trichoderma* species against *Macrophomina phaseolina* on eggplant. Journal of Plant Diseases and Protection, 105(4): 387-393

KUKUK, C., M. KIVANC, E. KINAKI and G. KINACI, 2007. Efficacy of *Trichoderma harzianum* (Riffaii) on inhabitation of *ascochyta* blight disease of chickpea. Annals of Microbiology, 57:665-668.

KUMAR, S. 2013. *Trichoderma*: a biological weapon for managing plant diseases and promoting

sustainability. International Journal of Agriculture Science and Medical veterinary 1, No. 3: 106-121.

LATIFI, N. 1993. Soybean Cultivation (Farming, Physiology, Consumption). Academic jahad publications, Mashhad University, 163 p.

MEHRABI, M. and D. ZAFARI, 2008. The efficacy of *Trichoderma* isolates on stimulation of wheat growth. Iran's agricultural science publishing. Page 93 (In Persian). 39(1): 9-16.

MISHRA, V.K. 2010. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against *Pythium aphanidermatum*. Journal of Phytology.

MOHAMADI, A.S., S. SHAHBAZI and H. ASKARI, 2014. Investigation of γ-radiation on morphological characteristics and antagonist potential of *Trichoderma viride* against *Rhizoctonia solani*. International Research Journal of Applied and Basic Sciences 8, No. 3: 329-336.

MONTE, E. 2001. Understanding *Trichoderma*: between biotechnology and microbial ecology. Int. Microbiology, 4: 1-4.

MORADI, R., S. SHAHBAZI, H. AHARI MOSTAFAVI, M.A. EBRAHIMI, H. ASKARI and M. MIRMAJLESI, 2013. Investigation of Gamma Radiation Effects on Morphological and Antagonistic Characteristics of *Trichoderma harzianum.* Crop Biotechnology, 4: 109-117.

MOTTAGHIAN, A., H. PIRDASHTI, M.A. BAHMANYAR, A. SHAHSAVARI and R. HASANPOUR, 2009. Effect of three *Trichoderma* species and different amounts of enriched municipal waste compost on growth parameters in spinach (*spinacia oleracea*). In: Proceeding of 5th International Scientific Conference of Iran and Russia on Agricultural Development Problems. Saint Petersburg, Russia, 8-9 October: 267-270.

MUKHERJEE, M., B.A. HORWITZ, P.D. SHERKHANE, R. HADAR and P.K. MUKHERJEE, 2006. A secondary metabolite biosynthesis cluster in *Trichoderma virens*: evidence from analysis of genes underexpressed in a mutant defective in morphogenesis and antibiotic production. Current genetics 50, No. 3: 193-202.

PAPAVIZAS, G.C., J.A. LEWIS and T.H.A.E. MOITY, 1982. Evaluation of new biotypes of *Trichoderma harzianum* for tolerance to benomyl and enhanced biocontrol capabilities." Phytopathology 72, No. 1: 126-132.

PUSHVAPAVATHI, Y., S.N. DASH, N. MADHAVI and D. DEEPIKA, 2016. Biological control of *Fusarium* wilts disease of banana with emphasis on *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas* spp. Plant Archives, 16: 51- 59.

SALARI, E., E. MAHDIKHANI MOGHADAM, H. ROUHANI, R. SABERI RISEH and M. MEHRABI KOOSHKI, 2014. Efficacy of *Trichoderma* in seed coating and soil application methods on tomato growth indices. Journal of Plant Protection, 28(4): 7-12.

SHAHBAZI, S., H. ASKARI, N. PIRVALI BEIRANVAND and H. AHARI MOSTAFAVI, 2018. Completion Report of Biological Material Production and Technical Knowledge Project to Reduce damage of Soil Disease in Greenhouse Products Based on *Trichoderma.* Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), 314 p. (In Persian with English summary).

SHAHSAVARI, A., H. PIRDASHTI, A. MOTTAGHIAN and M.A. TAJIK GHANBARI, 2010. Response of wheat (*Triticum aestivum* L.) growth parameters and yield to co-inoculation of farmyard manure, *Tricoderma* spp. And *pseudomonas* app. Journal of Agro Ecology, 2 (3): 448-458.

SREEDEVI, B., M. CHARITHA DEVI and D.V.R. SAIGOPAL, 2011. Isolation and screening of effective *Trichoderma* spp. against the root rot pathogen *Macrophomina phaseolina*. Journal of Agricultural Technology, 7(3): 623-635.

TERZIC, D., V. POPOVIC, M. TATIC and V. VASILEVA, 2018. Soybean area, yield and production in world. 22th Eco-Conference,

Ecological Movement of Novisad, October, Serbia: 135-145.

TIMMERS, A.C.J. 2008. The role of the plant cytoskeleton in the interaction between legumes and rhizobia. Journal of Microscopy, 231: 247–256.

VASEBI, Y., A. ALIZADEH and N. SAFAIE, 2011. Biological Control of Soybean Charcoal Rot Caused by *Macrophomina Phaseolina* Using *Trichoderma harzianum*. Agriculture knowledge and sustainable production, 22(1): 41-54 (In Persian with English summary).

VERMA, M., S.K. BRAR, R.D. TYAGI, R.Y. SURAMPALLI and J.R. VALERO, 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal, 37(1): 1-20.

WRATHER, J.A., S.R. KEDIG and D.D. TYLER, 1998. Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yields. Plant Disease, 82: 247-250.

YAZDANI, M., H. PIRDASHTI and M.A. TAJIK GHANBARI, 2008. Effect of *Tricoderma* spp. and different organic manures on growth and development in soybean [*Glysine max* (L.) Merril.]. Electron journal of Crop production, 1(3): 65-82.

YEDIDIA, I., N. BENHAMOU and I. CHET, 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied Environmenal Microbiology, 653:1061-1070.

ZHANG, F., J. YUAN, X. YANG, Y. CUI, L. CHEN, W. RAN and Q. SHEN, 2013. Putative *Trichoderma harzianum* mutant promotes cucumber growth by enhanced production of indole acetic acid and plant colonization. Plant and Soil, 368(1-2): 433-444.