به زراعی کشاورزی
دوره ۲۱ ■ شماره ۳ ■ پاییز ۱۳۹۸
صفحه‌های ۳۰۱-۲۸۹

تأثیر عوامل بیولوژیک قارچی و باکتریایی بر بیماری قارچی مرگ گیاهچه فلفل

مصطفی درویش نیا[1*]، مسلم موسویان[2]
۱. دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
۲. دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه لرستان، لرستان، ایران.
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۱۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۰۳/۰۱

چکیده

این مطالعه به‌منظور دستیابی به آنتاگونیست‌های مؤثر در کنترل بیماری مرگ گیاهچه فلفل با عامل *Rhizoctonia solani* انجام شد. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه لرستان در سال ۹۷-۱۳۹۶ صورت گرفت. ابتدا قارچ‌ها و عوامل بیولوژیک از خاک گیاهان سولاناسه جداسازی و شناسایی شد. سپس با استفاده از روش کشت متقابل توانایی آنتاگونیستی جدایه‌های قارچی *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma virens* و باکتری *Bacillus subtilis* علیه قارچ *R. solani* در آزمایشگاه بررسی شد. همچنین آزمون آنتاگونیستی این عوامل بیولوژیکی و قارچ‌کش بیولوژیک Trichomix HV در شرایط گلخانه روی این قارچ بیماری‌زا انجام شد. نتایج نشان دادند، دو گونه *T. harzianum* و *T. virens* با کلونیزه‌کردن و اسپورزایی در محیط PDA، به‌ترتیب به‌میزان ۹/۴۵ و ۱۵/۵۹ درصد باعث جلوگیری از رشد قارچ بیمارگر شدند و باکتری آنتاگونیست باعث بروز اثراتی چون خارج شدن محتویات هیف‌ها، تغییر رنگ در نوک هیف، ظریف شدن و کاهش رشد میسلیوم تا ۸/۴۷ درصد شد. نتایج آزمایش در شرایط گلخانه نیز نشان داد، تیمارهای *B. subtilis* و *T. harzianum* بیش‌ترین اثرات مثبت رشدی را روی صفات اندازه‌گیری‌شده از جمله طول و وزن تر و خشک ریشه و ساقه را داشتند و به‌ترتیب شدت بیماری‌زایی را تا ۶۰/۳۳ و ۷۰/۳۳ درصد کاهش دادند از این‌رو بهترین عوامل آنتاگونیستی برای کنترل *R. solani* روی فلفل در این تحقیق بودند.

کلیدواژه‌ها: باسیلوس، تریکودرما، تریکومیکس، ریزوکتونیا، کنترل بیولوژیک.

The Effect of Fungal and Bacterial Biological Agents on Seedling Damping-Off Disease of Pepper

Mostafa Darvishnia[1*], Moslem Moosavian[2]
1. Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Lorestan, Iran.
2. Ph.D. Candidate, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, Lorestan University, Lorestan, Iran.
Received: January 7, 2019 Accepted: May 22, 2019

Abstract

The present study seeks to achieve effective antagonists to the controlling of the disease called greenhouse pepper canola *Rhizoctonia* damping off, caused by *Rhizoctonia solani*. The experiments have been conducted based on completely randomized design in the faculty of agriculture and natural resources of Lorestan University during 2016 and 2017. At first, the fungi and biological agents have been isolated and identified from Solanaceae plants rhizosphere. Afterwards, the antagonistic abilities of fungal isolates such as *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma virens* fungi and *Bacillus subtilis* bacteria have been studied against *R. solani* by means of dual culture method. In addition, the study has experimented the antagonistic ability of these biological agents and Trichomix HV biologic fungicides on these fungi under greenhouse condition, with the results showing that both *T. harzianum* and *T. virens* species by colonization and sporulation in PDA prevent the fungi growth for 9.45% and 15.59%, respectively. Moreover, it has been proven that antagonistic bacteria cause some effects like outpour of the hyphae contents, color change at the tip of hyphae, thinning, and reduction of mycelium to 8.47%. Furthermore, experimental results under greenhouse condition show that *B. subtilis* and *T. harzianum* treatments have had the most positive effects on growth traits, including height and weight (wet and dry) of the root and stem, decreasing the disease severity to 60.33% and 70.33%, respectively. Therefore, this paper offers the best antagonistic agents to control *R. solani* on pepper.

Keywords: *Bacillus*, biological control, *Rhizoctonia*, *Trichoderma*, Trichomix.

* نویسنده مسئول
Email: darvishnia.m@lu.ac.ir

۱. مقدمه

قارچ *Rhizoctonia solani* Kuhn یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای خاکزی است که باعث مرگ گیاهچه و پوسیدگی ریشه در بسیاری از گیاهان مهم زراعی مانند برنج، چغندرقند، لوبیا، سیب‌زمینی، فلفل و گوجه‌فرنگی می‌شود (Keshavarz-Tohid *et al*., 2017). این قارچ در گیاه فلفل می‌تواند علائم مختلفی شامل مرگ گیاهچه، پوسیدگی هیپوکوتیل و پوسیدگی ریشه را به‌وجود بیاورد (Lopez *et al*., 2009) و گروه AG4 که باعث پوسیدگی ریشه در فلفل می‌شود مهم‌ترین گروه آناستوموزهای این قارچ می‌باشد (Kasem, 2010). علائم بیماری که توسط قارچ *R. solani* در گیاهان ایجاد می‌شود، اغلب به‌صورت زخم‌های فرورفته به رنگ‌های قهوه‌ای روشن یا تیره روی ریشه و طوقه گیاه می‌باشد که همراه با نازک‌شدن طوقه و مرگ گیاهچه است. در بیش‌تر موارد این زخم‌ها توأم با زردی و پژمردگی اندام‌های هوایی گیاه است و خسارت ناشی از این بیماری در گیاهان جوان از شدت بیش‌تری برخوردار است (Mannai *et al*., 2018).

معمول‌ترین روش کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی است که استفاده از برخی از این ترکیبات برای تیمار محصولات مذکور مناسب نبوده و بعضی نیز به‌دلیل عوارض سمی احتمالی حذف شده‌اند. علاوه بر این به‌دلیل عدم اقبال عمومی از آفت‌کش‌ها، احتمال بروز مقاومت برخی پاتوژن‌های قارچی و نیز هزینه بالای تولید مواد شیمیایی جدید نیاز به تحقیقات برای یافتن روش‌های جایگزین مناسب نظیر کنترل بیولوژیک بیش‌تر احساس می‌شود (Gohel *et al*., 2006). میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست از طریق تأثیر متقابل بر عوامل بیماری‌زای گیاهی خاک‌زاد مختلف، نقش عمده‌ای در کنترل بیماری به‌روش بیولوژیک بازی می‌کنند و به‌عنوان عوامل حفاظتی در برابر بیماری‌های گیاهی خاک‌زاد عمل می‌کنند (Sindhu *et al*., 2009). در بین این ریزجانداران، باکتری‌ها در کنترل بیولوژیک عوامل بیماری‌زا جایگاه ویژه‌ای را به خود اختصاص داده‌اند، استفاده از باکتری‌های *Bacillus* sp. و *Pseudomonas* sp. موجود در ریزوسفر، به‌عنوان عوامل بیوکنترل باکتریایی نامزدهایی ایده‌آل برای افزایش رشد گیاه و جلوگیری از بیمارگرهای گیاهی تحت شرایط مزرعه و گلخانه به‌شمار می‌روند (Sindhu *et al*., 2009). مشخص شده است جدایه‌هایی از باکتری *Basillus subtilis* با تولید پروتئین‌های ضد قارچی تأثیر بازدارندگی بر رشد بیمارگرهای گیاهی در محیط کشت دارند (Li *et al*., 2009). باکتری‌های بیولوژیک با افزایش تولید اتیلن و اکسین در گیاه (Liu *et al*., 2017)، تحریک مقاومت سیستمیک گیاه (Yousefi *et al*., 2010)، تولید متابولیت ثانویه و آنزیم (Huang *et al*., 2017) و تأثیر در جذب عناصر و مواد مغذی (Keshavarz-Tohid *et al*., 2017) باعث تأثیر مثبت در رشد گیاه در مواجهه با عوامل بیماری‌زا می‌شود. در گیاه فلفل سویه‌های *Bacillus* sp. توانستند بین ۳۱ تا ۷۷ درصد از رشد قارچ *R. solani* عامل بوته‌میری این گیاه جلوگیری کنند (Virgilio *et al*., 2008).

برخی از عوامل بیولوژیک قارچی شامل گونه‌های *Trichoderma* sp. با داشتن خاصیت آنتاگونیستی بالا علیه بسیاری از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، در زمره موفق‌ترین عوامل کنترل بیولوژیکی محسوب می‌شوند (Moraga-Suazo *et al*., 2011). قارچ *T. harzianum* با تأثیر روی فعالیت کیتیناز، شدت بیماری ریزوکتونیای فلفل را تا حدود زیادی کاهش داده است (Koijam and Sinha, 2018). قارچ‌های تریکودرما با ترشح آنزیم و هورمون (Akrami *et al*., 2009)، افزایش آنزیم پراکسیداز، بتا-۱ و ۳ گلوکاناز و میزان فنل (Azaddisfani *et al*., 2013)، ترشح پروتئین (Tseng *et al*., 2009) و تولید کیتینازهای خارجی و گلوکانازها (Larralde-

Corona *et al*., 2008) باعث کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزی می‌شوند.

هدف از انجام این آزمایش بررسی اثر و مکانیسم‌های کنترلی گونه باکتری بیولوژیک *Bacillus subtilis* و قارچ‌های بیولوژیک *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma virens* در کنترل پوسیدگی و مرگ گیاهچه فلفل ناشی از *R. solani* است که با استفاده از قدرت کنترل‌کنندگی این عوامل بیولوژیک، بتوان با تصمیم‌گیری و اتخاذ روش‌های تلفیقی در مدیریت این قارچ بیماری‌زا، راهی مناسب و اصولی توصیه کرد.

۲. مواد و روش‌ها

۲. ۱. تهیه جدایه قارچی

در این تحقیق از جدایه‌های قارچ بیماری‌زای گیاهی *Rhizoctonia solani* جدا شده از روی گیاهان خانواده بادنجان‌سانان و آنتاگونیست‌های باکتریایی *Basillus subtilis* B7 و قارچی *Trichoderma harzianum* T.BI و *T. virens* T65 موجود در کلکسیون قارچی و باکتریایی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه لرستان استفاده شد که پیش از این، از ناحیه ریزوسفر بوته‌های گوجه‌فرنگی مزارع استان لرستان جداسازی و شناسایی شده بودند.

۲. ۲. شناسایی عوامل آنتاگونیست قارچی و باکتریایی

به‌منظور اطمینان از صحت گونه قارچ‌ها و باکتری آنتاگونیست مورد استفاده، ابتدا این عوامل خالص‌سازی و مجدداً شناسایی شدند. به این منظور از آزمون‌های بیوشیمیایی و مورفولوژیکی از جمله آزمون گرم، لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی، واکنش Hr، تشکیل اندوسپور، OF، تولید رنگ فلورسنت، کاتالاز، هیدرولیز کازئین، هیدرولیز ژلاتین، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز تیروزین، مصرف سیترات، احیای نیترات، قابلیت استفاده از L–آرابینوز و سوکروز، قابلیت استفاده از گلوکز، قابلیت استفاده از D–زایلوز، قابلیت استفاده از D–مانیتول، تحمل نمک طعام، رشد در pH، ۷/۵، رشد در دمای ۴۰ درجه سلسیوس و تست وژپروسکوئر برای شناسایی باکتری استفاده شد (Padmapriya & Williams, 2012). برای شناسایی جدایه‌های آنتاگونیست قارچی در سطح گونه از کلید تشخیص جنس تریکودرما استفاده شد (Bisset, 1991).

۲. ۳. تهیه سوسپانسیون آنتاگونیست‌های باکتریایی

برای تهیه سوسپانسیون جدایه‌های باکتری از کشت یک‌روزه باکتری یک لوپ پر به فلاسک‌های حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط غذایی مایع غنی‌شده (نوترینت براث)[1] اضافه شد و فلاسک‌ها در انکوباتور در دمای ۲۷ درجه سلسیوس روی دستگاه تکان‌دهنده (شیکر) با سرعت ۸۰ دور در دقیقه به‌مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر، مقدار سلول‌های باکتریایی زنده این سوسپانسیون به‌روش رقیق‌کردن متوالی حدود $۱۰^{۹}$ واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر (۱×۱۰^{۹} CFU/ml) رسانده شد. جهت اطمینان از تعداد سلول باکتری، باکتری روی محیط کشت مواد غذایی[2]، به‌روش رقیق‌سازی متوالی سوسپانسیون کشت داده شد. سپس تعداد سلول باکتری در میلی‌لیتر آب شمارش گردید. این سوسپانسیون آنتاگونیست‌های باکتریایی، در دمای ۴ درجه سلسیوس در یخچال نگهداری شدند. همچنین به‌منظور نگهداری طولانی‌مدت با انتقال به گلیسیرین ۲۵ درصد در دمای ۸۰– درجه سلسیوس قرار داده شدند (Huang *et al*., 2017).

1. Nutrient borath (NB)
2. Nutrient Agar (NA)

۲. ۴. تهیه نشای فلفل

بذر فلفل رقم توانا با استفاده از هیپوکلریت یک درصد (کلر فعال ۵ درصد) به‌مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و سپس در گلدان‌های یک کیلوگرمی (قطر دهانه ۱۰ سانتی‌متر) حاوی خاک مزرعه، کمپوست، کود حیوانی و ماسه به نسبت ۱:۱:۱:۱ که پیش از این در دو نوبت به فاصله ۲۴ ساعت از هم در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس به‌مدت ۱۵ دقیقه و در فشار ۱/۵ اتمسفر با دستگاه اتوکلاو مدل IION ضدعفونی شده بودند (Cardona & Rodríguez, 2006)، کشت داده شد و از نشای دو هفته‌ای برای تأثیر عوامل بیولوژیک روی بیمارگر در آزمایش گلخانه‌ای استفاده شد.

۲. ۵. ارزیابی اثرات آنتاگونیست باکتریایی در شرایط آزمایشگاه

برای انجام این کار باکتری آنتاگونیست به‌طور جداگانه در راستای قطر تشتک‌های پتری شیشه‌ای ۹ سانتی‌متری حاوی محیط کشت PDA به‌روش خطی کشت داده شدند، در ادامه و به‌طور همزمان دو عدد دیسک میسیلیومی ۵ میلی‌متری قارچ عامل بیماری در حاشیه هر تشتک و به فاصله ۴ میلی‌متری از حاشیه پتری قرار داده شدند. تشتک فاقد باکتری به‌عنوان شاهد آزمایش مورد استفاده قرار گرفت، که حاوی محیط کشت و دو دیسک ۵ میلی‌متری میسیلیومی از قارچ بیمارگر و نواری از آب‌مقطر در راستای قطر پتری بود. سپس تشتک‌ها به انکوباتور منتقل و در دمای ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری و روزانه میزان رشد پرگنه ثبت شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار صورت گرفت. آزمایش تا زمانی ادامه پیدا کرد که در پتری شاهد، رشد پرگنه قارچ در دوطرف به هم برسند (Saechow *et al.*, 2017).

۲. ۶. بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *T. harzianum* و *T. virens* در شرایط آزمایشگاه

ابتدا در هر تشتک، یک قطعه ۵ میلی‌متری از کشت جوان قارچ عامل بیماری در حاشیه پتری قرار گرفت و در نقطه مقابل در حاشیه دیگر پتری از کشت چند روزه و جوان هر یک از قارچ‌های آنتاگونیست نیز قطعه ۵ میلی‌متری دیگری گذاشته شد و در تشتک شاهد یک دیسک از محیط کشت PDA به‌جای عامل آنتاگونیست استفاده شد و تشتک‌ها در دمای ۲۵ الی ۲۷ درجه سلسیوس نگهداری و روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی و در چهار تکرار صورت گرفت. ارزیابی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما روی قارچ *R. solani* با ثبت مشخصات ماکروسکوپی پرگنه قارچ‌های آنتاگونیست و قارچ عامل بیماری شامل سرعت رشد پرگنه‌های قارچی، پیشروی جدایه‌های آنتاگونیست روی میسلیوم قارچ بیمارگر، اندازه‌گیری قطر پرگنه قارچ بیماری‌زا، اسپورزایی قارچ آنتاگونیست روی پرگنه قارچ عامل بیماری و بررسی مطالعات میکروسکوپی در محل برخورد پرگنه قارچ بیمارگر و بیولوژیک انجام شد. در نهایت درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ تحت تأثیر آنتاگونیست‌های قارچی و باکتریایی با استفاده از رابطه (۱) محاسبه شد (Huang *et al.*, 2017).

رابطه (۱)

$$\text{درصد بازدارندگی از رشد} = \frac{\text{قطر ناحیه رشدی در تیمار} - \text{قطر ناحیه رشدی در شاهد}}{\text{قطر ناحیه رشدی در شاهد}} \times ۱۰۰$$

۲. ۷. بررسی اثر آنتاگونیستی *T. harzianum*، *T. virens* و *B. sabtilis* در شرایط گلخانه

به این منظور ابتدا مایه تلقیح قارچ‌های آنتاگونیست و بیمارگر با کشت روی بستر گندم به‌مدت ۷ تا ۱۰ روز و سپس با خشک و آرد کردن بذور گندم آلوده تهیه شد. سپس ۴ گرم از مایه تلقیح قارچ *R. solani* و ۸ گرم مایه

تلقیح تریکودرما به گلدان‌های ۱/۵ کیلوگرمی به قطر ۲۰ سانتی‌متر حاوی خاک مزرعه، کمپوست، کود حیوانی و ماسه به نسبت ۱:۱:۱:۱ اضافه و در هر گلدان چهار نشای هم‌اندازه و هم‌شکل کشت شد. برای بررسی اثر باکتری‌های کنترل‌کننده ابتدا از کشت ۲۴ ساعته باکتری در آب مقطر استریل سوسپانسیونی 10^9 واحد تشکیل‌دهنده کلنی در میلی‌لیتر تهیه و به هر گلدان ۱/۵ کیلوگرمی ۵۰ میلی‌لیتر از این سوسپانسیون اضافه شد. همچنین قارچ‌کش بیولوژیک تریکومیکس HV[1] روی قارچ *R. solani* در قالب یک تیمار ارزیابی شد. برای اعمال این تیمار ابتدا مساحت ۱۰۰ سانتی‌متر مربع زمین و گلدان (به قطر ۲۰ سانتی‌متر) محاسبه شد و سپس به میزان ۵۰ گرم در متر مربع خاک قارچ‌کش تریکومیکس HV به هر گلدان (۱/۶ گرم) افزوده شد. تیمارهای به‌کار برده شده در این آزمایش شامل: تیمار شاهد منفی یا آلوده (گیاهچه فلفل+ قارچ بیماری‌زا)، شاهد مثبت یا سالم (گیاهچه فلفل بدون تلقیح عامل بیماری‌زا و آنتاگونیست‌ها)، تیمار قارچ‌کش تریکومیکس (قارچ‌کش تریکومیکس+ گیاه فلفل+ عامل بیماری‌زا)، تیمار آنتاگونیست قارچی (تریکودرما+ گیاه فلفل+ عامل بیماری‌زا)، تیمار باکتری باسیلوس (باکتری باسیلوس+ گیاه فلفل+ عامل بیماری‌زا) و تیمارهای شاهد عوامل آنتاگونیست (عوامل آنتاگونیست+ گیاه فلفل) و شاهد قارچ‌کش تریکومیکس (تریکومیکس+ گیاه فلفل) در چهار تکرار می‌باشد. این تیمارها در شرایط گلخانه‌ای با ۱۲ ساعت نور، رطوبت نسبی بین ۵۰ تا ۸۰ درصد، دمای ۲±۲۵ و در دور آبیاری روزی یکبار قرار گرفتند. برای ارزیابی اثر عوامل بیولوژیک برخی صفات رویشی فلفل شامل ارتفاع بوته، وزن تر و خشک ریشه و ساقه و شدت بیماری‌زایی عامل بیماری‌زا اندازه‌گیری شد. شدت بیماری‌زایی[2] بر اساس مقیاس آلودگی صفر تا پنج (رابطه ۲) محاسبه گردید (Samavat *et al*., 2012):

رابطه (۲)

$$\%DI = \frac{\sum_{i=1}^{n} (\text{مقیاس آلودگی} \times \text{گیاهچه‌های تیمار})}{\text{بزرگ‌ترین کد در سیستم کددهی} \times \text{تعداد کل گیاهچه‌ها}} \times 100$$

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۰ تیمار و چهار تکرار و تجزیه آماری توسط نرم‌افزار SAS 9.1 انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن استفاده شد. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Microsoft office excel 2013 رسم شدند. همچنین از روش رگرسیون Backward جهت بررسی بالاترین همبستگی بین صفات استفاده شد.

۳. نتایج

۳. ۱. شناسایی باکتری‌ها و قارچ‌های آنتاگونیست

نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی باکتری *Basillus subtilis* به‌طور خلاصه در جدول ۱ آورده شده است، این ویژگی‌ها با آن‌چه که برای شناسایی این باکتری در منابع مختلف آمده است، مطابقت دارد (Padmapriya & Williams, 2012).

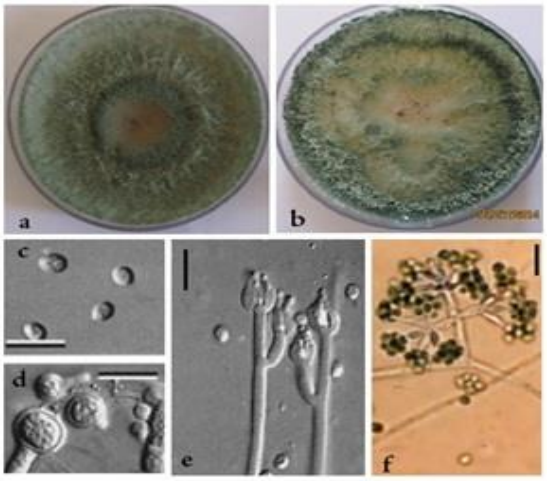
شناسایی گونه‌های تریکودرما بر اساس شکل، اندازه و سایر مشخصات مربوط به کنیدیوفور، فیالید، کنیدیوم و کلامیدوسپور و نیز مشخصات مربوط به ظاهر پرگنه‌ها و میزان رشد آن‌ها ثبت شدند. این خصوصیات، با مشخصات بیان‌شده در کلید تشخیص تریکودرما (Bisset, 1991)، مطابقت داشت (شکل ۱).

1. Trichomix HV

2. Disease index (DI)

جدول ۱. نتایج آزمون بیوشیمیایی باکتری *Basillus subtilis*

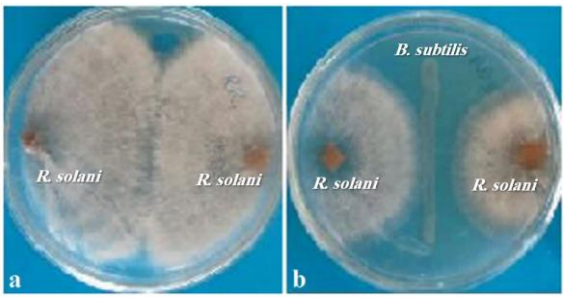
تست بیولوژیکی	واکنش	تست بیولوژیکی	واکنش	تست بیولوژیکی	واکنش	تست بیولوژیکی	واکنش
استفاده از گلوکز	+	رشد در دمای ۴۰°C	+	مصرف سیترات	+	Hr	-
استفاده از ژیلوز	+	تست وژپروسکوئر	+	کاهش نیترات	+	اندوسپور	+
استفاده از مانیتول	+	هیدرولیز کازئین	+	استفاده از آرابینوز	+	رشد غیرهوازی	-
رشد در pH=7	+	هیدرولیز ژلاتین	+	گرم	+	رنگدانه فلوروسنت	-
تحمل نمک ۷٪	+	هیدرولیز نشاسته	+	لهیدگی سیب‌زمینی	-	کاتالاز	+



شکل ۱. پرگنه‌های قارچ *Trichoderma* روی محیط کشت PDA و مشخصات آن‌ها: a) *T. virens*، b) *T. harzianum*، c) کنیدیوم، d) کلامیدوسپور، e) کنیدیوفور *T. virens* و f) کنیدیوفور *T. harzianum* مقیاس معادل ۱۰ میکرومتر

۳. ۲. نتایج اثرات آنتاگونیست‌های باکتریایی و قارچی در شرایط آزمایشگاه

مقایسه میانگین داده‌های به‌دست‌آمده نشان داد، آنتاگونیست باکتریایی *B. subtilis* باعث کاهش رشد میسلیوم قارچ *R. solani* شد. این عامل آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاه با ۸/۴۷ درصد بازدارندگی از رشد قارچ *R. solani* اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد با تیمار شاهد داشت (جدول۲). در بررسی میکروسکوپی تأثیر *B. subtilis* بر اندام‌های رویشی قارچ *R. solani* در کشت پنج‌روزه مشاهده شد؛ در ناحیه بازدارندگی مقدار زیادی محتویات سیتوپلاسمی از هیف به خارج تراوش کرده و در اطراف هیف جمع شده بود، تغییر رنگ اندکی در نوک هیف به‌همراه هیف‌های غیرطبیعی شامل چند شاخه‌شدن هیف، ظریف‌شدن قطر هیف و در مجموع کاهش رشد میسلیوم بیمارگر مشاهده شد که در نهایت این تغییرات باعث کوچک‌شدن رشد پرگنه قارچ بیمارگر روی محیط کشت مواد غذایی شد (شکل ۲).



شکل ۲. فاصله بازدارندگی از رشد بین *B. subtilis* و *R. solani* در محیط کشت PDA. a) شاهد، b) *B. subtilis*

مقایسه میانگین تأثیر آنتاگونیست‌های قارچی (*T. harzianum* و *T. virens*) در شرایط آزمایشگاه روی قارچ *R. solani* حاکی از آن است که این عوامل آنتاگونیست قارچی باعث کاهش رشد میسلیوم قارچ *R. solani* شدند و از این نظر اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد با تیمار شاهد ایجاد کردند. قارچ *T. virens* به‌ترتیب بعد از گذشت چهار روز با ۱۳/۸۲ و

بعد از گذشت پنج روز با ۱۵/۵۹ درصد بازدارندگی از رشد، تأثیر بهتری نسبت به قارچ *T. harzianum* در بازدارندگی از رشد قارچ *R. solani* داشت (جدول ۲). روند کاهش رشد پرگنه قارچ بیمارگر بعد از روز پنجم به‌دلیل کلونیزه‌شدن محیط توسط گونه‌های تریکودرما ثابت ماند و تغییرات محسوسی در قطر پرگنه ایجاد نشد.

دو قارچ *T. virens* و *T. harzianum* در استقرار روی پرگنه قارچ‌های بیمارگر موفق عمل کرده و بعد از گذشت یک هفته محیط پتری را کلونیزه نمودند و در سطح محیط اسپورزایی کردند. گرچه قارچ *R. solani* توانست بخشی از محیط پتری را اشغال کند ولی کلونیزه شدن پرگنه این قارچ بیماری‌زا و اشغال فضای رشدی توسط جدایه‌های تریکودرما باعث شد که از پیشروی و رشد *R. solani* جلوگیری به‌عمل آید (شکل ۳).

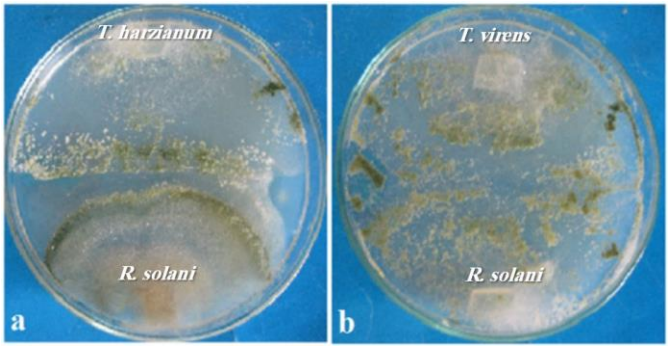
۳. ۳. نتایج اثرات آنتاگونیست‌های باکتریایی و قارچی در شرایط گلخانه

مقایسه میانگین تغییرات ارتفاع بوته فلفل آلوده به قارچ *R. solani* نشان داد که تیمار *B. subtilis* با میانگین طول ۲۶ سانتی‌متر و با ۷۰/۵۰ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد آلوده بیش‌ترین اثر را روی رشد ساقه دارد، از این نظر تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد خود و شاهد سالم نشان نداد ولی با دیگر تیمارها به‌جز تیمارهای آلوده تریکودرما تفاوت معنی‌داری در سطح یک درصد ایجاد کرد.

جدول ۲. مقایسه میانگین داده‌های حاصل از آزمون اندازه‌گیری سرعت رشد جدایه‌های آنتاگونیست باکتریایی و قارچی در محیط کشت PDA بر اساس میانگین قطر پرگنه *R. solani* (برحسب میلی‌متر) در سطح ۱٪ با شاهد

تیمار	پنج روز پس از کشت		چهار روز پس از کشت	
	درصد بازدارندگی از رشد	قطر پرگنه	درصد بازدارندگی از رشد	قطر پرگنه
B. subtilis	۸/۴۷ a	۳۹/۵۰	۷/۸۳a	۳۳/۶۶
شاهد	۰/۰۰ b	۴۴/۳۳	۰/۰۰b	۳۶/۵۰
T. harzianum	۹/۴۵ b	۵۶/۱۶	۷/۱۵ b	۵۰/۳۳
T. virens	۱۵/۵۹ a	۵۱/۵	۱۳/۸۲ a	۴۶
شاهد	۰/۰۰ c	۶۳/۸۳	۰/۰۰ c	۵۵

** گروه‌بندی معرف متفاوت بودن تأثیر بازدارندگی تیمارها از رشد بیمارگر در سطح احتمال ۱٪ است. CV= ۱۰/۳۸

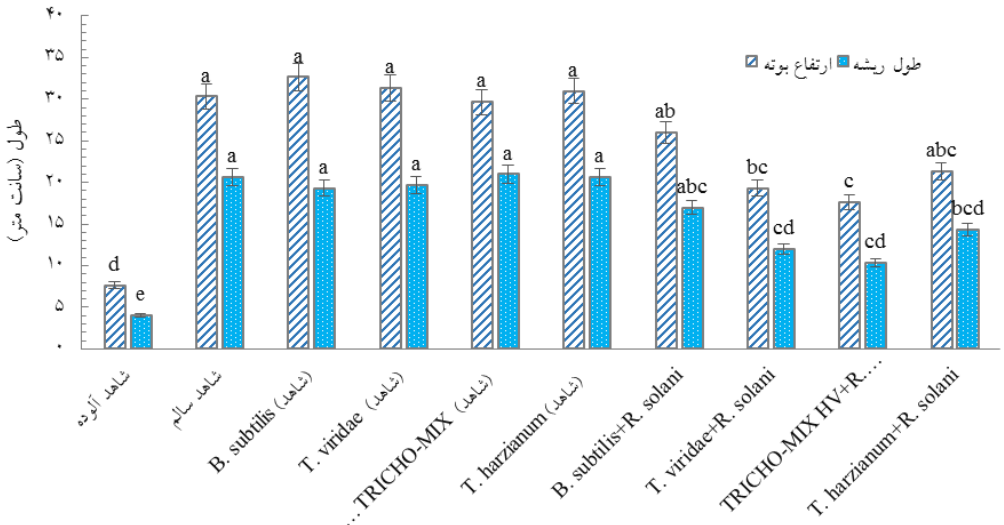


شکل ۳. کشت متقابل و استقرار نامنظم آنتاگونیست‌های قارچی و *R. solani* پس از گذشت هفت روز در محیط کشت PDA.

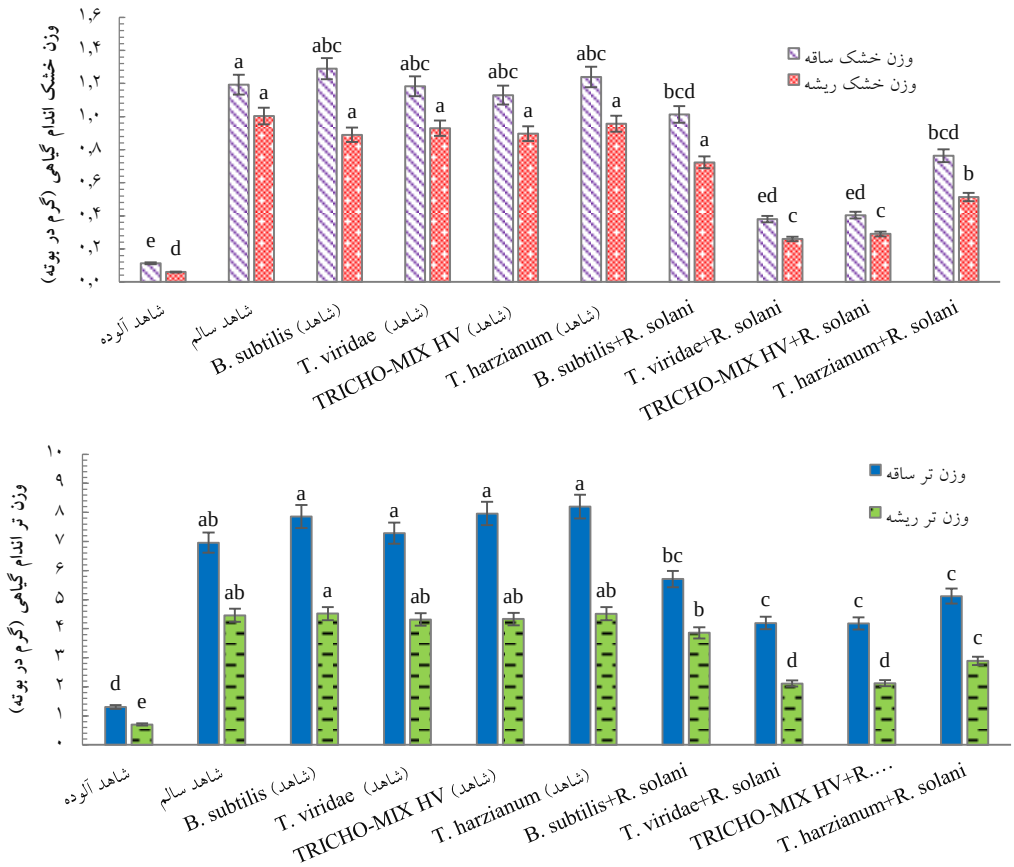
(a *T. harzianum*، b *T. virens*)

گرچه بین تیمارهای قارچ‌کش تریکومیکس و دو گونه تریکودرما تفاوت معنی‌داری ایجاد نشد، ولی بین این سه تیمار، تیمار آنتاگونیستی *T. harzianum* با میانگین رشد ۲۱/۳۳ سانتی‌متر طول و با ۶۴/۰۵ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد آلوده دارای اثر بهتری بود. نتایج حاصل از اثر عوامل بیولوژیک روی طول ریشه نشان داد؛ تیمار *B. subtilis* با میانگین ۱۷/۰۰ سانتی‌متر و ۷۶/۴۸ درصد افزایش طول ریشه، بیش‌ترین تأثیر را در افزایش این شاخص گیاهی دارد. این تیمار با تیمار *T. harzianum* که میانگین طول ریشه در آن ۱۴/۳۳ سانتی‌متر بود، در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری نشان نداد. این دو تیمار بهترین تیمار به‌کار گرفته شده بودند. کم‌اثرترین تیمار در افزایش طول ریشه قارچ‌کش تریکومیکس با ۱۰/۳۳ سانتی‌متر بود، ولی با شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری ایجاد کرد (شکل ۴).

تجزیه آماری متغیر وزن تر ساقه نشان داد همه تیمارهای بیولوژیک به‌کار گرفته شده در این آزمایش باعث افزایش وزن تر ساقه گیاه فلفل می‌شوند و همه این تیمارها با تیمار شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری ایجاد کردند. تیمارهای *B. subtilis* و *T. harzianum* به‌ترتیب با میانگین ۵/۷۰ و ۵/۱۲ گرم وزن تر ساقه (با ۷۷/۲۲ و ۷۴/۶۱ درصد افزایش نسبت به تیمار شاهد آلوده) بیش‌ترین اثر را بر افزایش این شاخص گیاهی داشتند تأثیر عوامل آنتاگونیستی روی وزن خشک ساقه نشان داد که تیمار *B. subtilis* با میانگین ۱/۰۱ گرم وزن خشک ساقه بیش‌ترین تأثیر را روی این شاخص گیاهی در گیاه فلفل آلوده به قارچ *R. solani* دارد. این تیمار با تیمار *T. harzianum* با ۰/۷۶ گرم وزن خشک ساقه تفاوت معنی‌داری ایجاد نکرد. این دو تیمار بیولوژیک نسبت به شاهد خود (گیاه فلفل+ عوامل آنتاگونیست) نیز تفاوت معنی‌داری نداشتند ولی در سطح یک درصد نسبت به تیمار شاهد منفی تفاوت معنی‌داری نشان داد که بیانگر تأثیر مثبت این دو عامل آنتاگونیستی روی این شاخص گیاهی است. نتایج تجزیه آماری مربوط به وزن تر و خشک ریشه نشان داد در بین تیمارها، تیمار *B. subtilis* با میانگین وزن تر ۳/۸۶ گرم و وزن خشک ۰/۷۲ گرم بهترین تیمار در افزایش این شاخص‌های گیاهی است (شکل ۵).

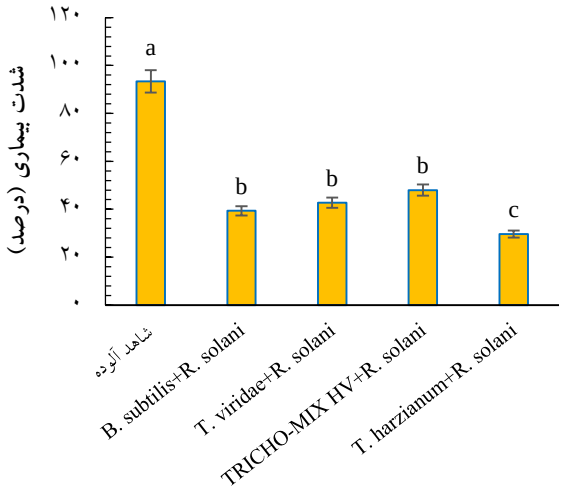


شکل ۴. تأثیر قارچ *R. solani* روی طول ریشه و ساقه فلفل تحت تیمارهای کنترل بیولوژیک



شکل ۵. تأثیر قارچ *R. solani* بر وزن تر و خشک ریشه و ساقه فلفل تحت تیمارهای کنترل بیولوژیک

شدت بیماری‌زایی قارچ *R. solani* روی گیاه فلفل تحت تأثیر عوامل بیولوژیک نشان داد تیمار *T. harzianum* با نشان دادن ۲۹/۶۷ درصد علائم نسبت به شاهد آلوده به میزان ۶۶/۶۷ درصد علائم بیماری روی گیاه فلفل را کاهش داد و بیش‌ترین تأثیر را در کاهش علائم این بیمارگر نشان داد و از این نظر تفاوت معنی‌داری با دیگر تیمارها در سطح یک درصد ایجاد کرد. تیمارهای *B. subtilis*، *T. virens* و قارچ‌کش تریکومیکس به‌ترتیب در سطوح بعدی قرار دارند و همه این تیمارها در کاهش علائم بیماری *R. solani* روی فلفل در سطح یک درصد تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد آلوده نشان دادند (شکل ۶).



شکل ۶. شدت بیماری‌زایی *R. solani* روی گیاه فلفل تحت تأثیر تیمارهای کنترل بیولوژیک مختلف

از روش Backward جهت انتخاب مهم‌ترین متغیرها در مدل رگرسیون استفاده شد، طی این مدل مشخص شد دو متغیر وزن تر ساقه و وزن تر ریشه بیش‌ترین ارتباط را با شدت بیماری‌زایی قارچ *R. solani* روی گیاه فلفل تحت تأثیر عوامل بیولوژیک به‌ترتیب با R^2=۰/۹۱۳ و R^2=۰/۹۱۱ دارند. این همبستگی در جهت معکوس می‌باشد و با افزایش هر کدام از شاخص‌های گیاهی شدت بیماری‌زایی به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و بالعکس (جدول ۳).

در کل نتایج کاربرد تیمارهای بیولوژیکی اعمال‌شده علیه قارچ *R. solani* عامل بوته‌میری گیاه فلفل نشان دادند این تیمارها روی کل شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده می‌توانند مؤثر باشند. این عوامل بیولوژیک حتی در عدم حضور قارچ بیمارگر گیاهی باعث تقویت گیاه شد، به‌نحوی‌که تأثیر این عوامل آنتاگونیست در اکثر موارد باعث افزایش در شاخص‌های گیاهی همانند وزن تر و خشک ریشه و ساقه گیاه سالم (بدون تلقیح قارچ بیمارگر) شدند (شکل ۷).

جدول ۳. نتایج جدول همبستگی شاخص‌های گیاه لوبیای آلوده‌شده به قارچ *R. solani*

	شدت بیماری‌زایی	وزن خشک ریشه	وزن تر ریشه	وزن خشک ساقه	وزن تر ساقه	طول ریشه	طول ساقه
طول ساقه	-۰/۸۹۷**	۰/۹۲۳**	۰/۹۶۸**	۰/۹۳۶**	۰/۹۵۱**	۰/۹۵۵**	۱
طول ریشه	-۰/۹۰۱**	۰/۹۲۶**	۰/۹۶۶**	۰/۹۲۹**	۰/۹۴۰**	۱	
وزن تر ساقه	-۰/۹۱۳**	۰/۸۹۵**	۰/۹۴۸**	۰/۹۲۳**	۱		
وزن خشک ساقه	-۰/۹۰۲**	۰/۹۵۷**	۰/۹۸۰**	۱			
وزن تر ریشه	-۰/۹۱۱**	۰/۹۶۲**	۱				
وزن خشک ریشه	-۰/۸۷۷**	۱					
شدت بیماری‌زایی	۱						

شکل ۷. رشد گیاه فلفل آلوده به قارچ *R. solani* در حضور و عدم حضور عوامل بیولوژیک. a) شاهد آلوده، b) شاهد غیر آلوده، c) *T. harzianum*، d) *B. subtilis*، e) *T. viridae*، f) قارچ‌کش Trichomix HV

۴. بحث

در مطالعات میکروسکوپی مشخص شد که باکتری *B. subtilis* مورد استفاده در این پژوهش باعث چند شاخه‌شدن هیف و ظریف‌شدن قطر هیف قارچ *R. solani* می‌شود. و این باکتری در مجموع رشد میسیلیوم قارچ *R. solani* را ۸/۴۷ درصد کاهش داد. نتایج این بخش از پژوهش با نتایج Li *et al.* (2009) مطابقت دارد. همچنین در پژوهش حاضر مشخص شد این باکتری آنتاگونیست باعث می‌شود گیاه فلفل آلوده به قارچ ریزوکتونیا از نظر افزایش شاخص‌های رشدی تغییر قابل‌ملاحظه‌ای نشان دهد و تا حدود زیادی با جلوگیری از رشد این قارچ بیماری‌زا روی گیاه فلفل و تقویت این گیاه، شدت بیماری را بیش از ۶۰ درصد کاهش دهد. در پژوهشی مشابه Yousefi *et al.* (2010) نشان دادند گونه‌های *Bacillus* sp. علاوه بر تأثیر مثبت بر رشد گیاه، سبب تحریک مقاومت سیستمیک گیاه در مقابل بیماری‌ها می‌شوند. همچنین مشخص شده است، باکتری *B. subtilis* با افزایش تحریک تولید اتیلن و اکسین، سیستم ریشه‌ای گیاه را توسعه می‌دهد که این عمل مکانیسم کنترل *B. subtilis* علیه *R. solani* از طریق افزایش رشد ریشه می‌باشد (Liu *et al.*, 2017).

از دیگر عوامل آنتاگونیست به‌کارگرفته‌شده در این پژوهش قارچ‌های *T. virens* و *T. harzianum* بودند که با اسپورزایی و استقرار روی پرگنه قارچ، در طی هفت روز محیط مورد رقابت بین بیمارگر و آنتاگونیست را کلونیزه کرده و از رشد قارچ *R. solani* حتی با وجود سرعت رشد بالای آن جلوگیری کردند در پژوهش مشابهی قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های *T. harzianum* به‌صورت کشت دو طرفه روی PDA در کشت همزمان، کشت ۴۸ ساعته و ۹۶ ساعته *R. solani* بررسی شد و مشخص شد کلیه جدایه‌های *T. harzianum* می‌توانند پس از متوقف‌کردن رشد میسیلیومی *R. solani* کلونی آن را به‌طور کامل کلونیزه و روی آن اسپورزایی کنند و در نهایت ریسه قارچ بیمارگر نازک و متلاشی می‌گردد. سایر بررسی‌های میکروسکوپی از نحوه تأثیر جدایه‌های *T. harzianum* روی *R. solani* نشان داد این جدایه‌ها با پیچش هیفی، نفوذ و متلاشی‌کردن هیف رشد قارچ بیمارگر را متوقف کرده و در نهایت باعث از بین‌رفتن آن می‌شوند (Shiri-Tabarestani *et al.*, 2005). Mohammadi & Zaffari (2014) در طی پژوهش‌های خود بیان داشتند قارچ *T. harziznum* قادر به کلونیزاسیون و اسپورزایی روی پرگنه‌های قارچ *Rhizoctonia solani* می‌باشد، نتایج این پژوهش نیز با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.

قارچ‌های بیولوژیک *T. virens* و *T. harzianum* باعث افزایش شاخص‌های رشدی گیاه فلفل آلوده به قارچ *R. solani* شدند و علائم و خسارات ناشی از این بیمارگر را تا حدود زیادی کاهش دادند. افزودن تیمار *T. harzianum* در گلدان در هنگام کشت گیاه فلفل آلوده به قارچ *R. solani* بیش از ۷۰ درصد از شدت بیماری ناشی از این بیمارگر را کاهش داد. موفقیت قارچ *T. harzianum* در بررسی‌های آزمایشگاهی به‌عنوان یکی از گونه‌های برتر و در گلخانه نیز با کاهش شدت بیماری باعث افزایش فاکتورهای رویشی گیاه شد و می‌توان آن را به‌عنوان بهترین عامل آنتاگونیست جهت کنترل این بیماری معرفی نمود. سایر تیمارهای تریکودرما شامل *T. virens*، قارچ‌کش تریکومیکس HV نیز در کاهش شدت بیماری تأثیر نسبتاً خوبی داشتند. در پژوهش‌های مشابه در مورد علت خاصیت ضدقارچی تریکودرما مشخص شده است قارچ‌های تریکودرما با ترشح آنزیم و هورمون (Akrami *et al.*, 2009)، افزایش آنزیم پراکسیداز، بتا-۱ و ۳ گلوکاناز و میزان فنل (Azaddisfani *et al.*, 2013)، ترشح پروتئین (Tseng *et al.*, 2009) و تولید کیتینازهای خارجی و گلوکانازها (Larralde-

Corona *et al*., 2008) باعث کنترل عوامل بیماری‌زای خاکزی از جمله قارچ *R. solani* شده است.

قارچ‌کش بیولوژیک تریکومیکس HV از دیگر عوامل بیولوژیک مورد استفاده در این پژوهش بود گرچه این محصول بیولوژیک نسبت به تیمارهای *T. viride*، *T. harzianum* و *B. subtilis* اثر کم‌تری در کنترل بیماری *R. solani* دارد ولی در کل در افزایش شاخص‌های اندازه‌گیری‌شده گیاهی تأثیر مثبتی داشت و شدت علائم این بیماری را تا ۴۶ درصد کاهش داد. که این مقدار کاهش علائم با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت دارد (Manafi *et al*., 2011; Zamanizadeh *et al*., 2011). همچنین در بررسی کنترل عامل بیماری شانکر ساقه سیب‌زمینی (*R. solani*) با محصولات بیوکنترل تجاری گونه (*T. harzanium*) مشخص شد قارچ آنتاگونیست به‌کارگرفته‌شده در این محصولات بیوکنترلی در محیط کشت اثر کنترل‌کننده بالایی روی قارچ *R. solani* دارند در حالی در شرایط مزرعه این قارچ‌کش نتوانست این بیماری را کنترل کند که علت به شرایط محیطی خاک نسبت داده شد (Larkin, 2016)؛ بنابراین می‌توان گفت فرمولاسیون و بسته‌بندی در تهیه قارچ‌کش تریکومیکس و حتی گونه مورد استفاده در تهیه این سم از جمله عوامل این تفاوت در کنترل بیماری بوته‌میری و مرگ گیاهچه فلفل نسبت به دیگر عوامل بیولوژیک قارچی می‌باشد.

۵. نتیجه‌گیری

در مجموع، آنتاگونیست قارچی و باکتریایی در پژوهش حاضر اثر کنترل‌کنندگی مناسبی روی قارچ *R. solani* دارند و باعث افزایش محسوسی در صفات کمی گیاه آلوده به این قارچ شدند. قارچ *T. harzianum* با عملکرد کنترل‌کنندگی خود به‌عنوان یک قارچ آنتاگونیست باعث کاهش بیش از ۷۰ درصدی بیماری ناشی از قارچ *R. solani* روی گیاه فلفل شد و بیش‌ترین تأثیر در کاهش رشد جدایه‌های بیمارگر قارچ ریزوکتونیا را داشت این عوامل بیولوژیک به‌تنهایی نیز باعث تقویت رشد گیاه می‌شوند. این ویژگی بیانگر این است که عوامل بیولوژیک با برقراری ارتباط با گیاه، به‌طور غیرمستقیم می‌تواند روی فعالیت عوامل بیماری‌زای گیاهی با تقویت میزبان‌های گیاهی نقش داشته باشند. با توجه به تأثیر بالای این عوامل بیولوژیک روی بیمارگر *R. solani* بنابراین می‌توان با به‌کارگیری این عامل بیولوژیکی، استفاده از سموم و کودهای شیمیایی را کاهش داد.

۶. منابع

Akrami, M., Ibrahimov, A., Zafari, D. M. & Valizadeh, E. (2009). Control *Fusarium* rot of bean by combination of by *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma asperellum* in Greenhouse condition. *Agriculture Journal*, *4*(3), 121-123.

Azaddisfani, F., Rohani, H., Falahati, M. & Mahdikhani, E. (2013). Defense Responses of Cotton to *Trichoderma* spp. and Its Influence in Control of Seedling Damping-off by *Rhizoctonia solani*. *Journal of Plant Protection*, *27*(1), 1-10.

Bisset, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma* II infragenic classification. *Canadian Journal of Botany*, *69*(11), 2357-2372.

Cardona, R. & Rodríguez, H. (2006). Effects of *Trichoderma harzianum* fungus on the incidence of the charcoal rot disease on sesame. *Revista de la facultad de agronomia*, *23*, 42-47.

Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P. & Chhatpar, H. S. (2006). Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology*, *5*(2), 54-72.

Huang, Y., Wu, Z., He, Y., Ye, B. C. & Li, C. (2017). Rhizospheric Bacillus subtilis Exhibits Biocontrol Effect against *Rhizoctonia solani* in Pepper (*Capsicum annuum*). *BioMed research international*, *2017*, 1-9. Doi:10.1155/2017/9397619.

Kasem, K. K. (2010). Current *Rhizoctonia solani* anastomosis groups in Egypt and their pathogenic relation to cotton seedlings. *African Journal of Microbiology Research*, *4*(5), 386-395.

Keshavarz-Tohid, V., Taheri, P., Muller, D., Prigent-Combaret, C., Vacheron, J., Taghavi, S. M. & Moënne-Loccoz, Y. (2017). Phylogenetic diversity and antagonistic traits of root and rhizosphere *Pseudomonads* of bean from Iran for controlling *Rhizoctonia solani*. *Research in microbiology, 168*(8), 760-772. Doi: 10.1016/j.resmic.2017.08.002.

Koijam, K. & Sinha, B. (2018). Antagonistic potential and molecular characterization of *Trichoderma* spp. against *Rhizoctonia solani* infecting ghost pepper in Manipur, *India International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *7*(2), 2085-2093. Doi: 10.20546/ijcmas.2018.702.248

Larkin, R. P. (2016). Impacts of biocontrol products on *Rhizoctonia* disease of potato and soil microbial communities, and their persistence in soil. *Crop Protection*, *90*, 96-105. Doi: 10.1016/j.cropro.2016.08.012

Larralde-Corona, C. P., Santigao-Mena, M. R., Sifuentes-Rincon, A. M., Rodriguez-Luna, I. C., Rodriguez-Perez, M. A., Shirai, K. & Narvaez-Zapata, J. A. (2008). Biocontrol potential and polyphasic characterization of novel native *Trichoderma* strains against *Macrophomina phaseolina* isolated from sorghum and common bean. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *80*, 167-177. Doi: 10.1007/s00253-008-1532-0.

Li, M., Yang, Q. & Song, J. (2009). Three tubulin genes of *Trichoderma harzianum*: Alpha, Beta, and Gamma. Braz. *Archive Biological Technology*, *53*(1), 811-816.

Liu, Y., Li, J., Du, G., Chen, J. & Liu, L. (2017). Metabolic engineering of *Bacillus subtilis* fueled by systems biology: Recent advances and future directions. *Biotechnology advances, 35*(1), 20-30. Doi:10.1016/j.biotechadv.2016.11.003.

Lopez, A.V., Bolanos, B. T., Morales, M. J. Y., Pacheco, R. P. & Escalante, M. Q. (2009). Etiology of pepper wilt disease of 'Chile de Agua' (*Capsicum annuum* L.) in Oaxaca, Mexico. *Revista Fitotecnia Mexicana, 32*(2), 127-134.

Manafi, R., Babaei, A., Arzanlo, M. & Valizadeh, A. (2012). Assessment of Greenhouse cultivation tomato cultivars resistant to *Fusarium* wilt disease and the possibility of biological control of the disease in East Azerbaijan province. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, *22*(2), 145-158. (In Persian).

Mannai, S., Jabnoun-Khiareddine, H., Nasraoui, B. & Daami-Remadi, M. (2018). *Rhizoctonia* Root Rot of Pepper (*Capsicum annuum*): Comparative Pathogenicity of Causal Agent and Biocontrol Attempt using Fungal and Bacterial Agents. *Journal of Plant Pathology & Microbiology*, *9*(2), 1-9. DOI: 10.4172/2157-7471.1000431.

Mohammadi, R. & Zafari, D. (2014). Identification of *Rhizoctonia* anastomosis groups in Kurdistan, Hamedan and the possibility of biological control by *Trichoderma* spp. *Iranian of Plant Protection Science, 45* (1), 139-150. (In Persian).

Moraga-Suazo, P., Opazo, A., Zaldúa, S., González, G. & Sanfuentes, E. (2011). Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in Pinus radiata seedlings. *Chilean Journal of Agricultural Research, 71*, 412–417. Doi: 10.4067/S07185839201100030001l.

Padmapriya, M. & Williams, B. C. (2012). Purification and characterization of neutral protease enzyme from *Bacillus subtilis. Journal of Microbiology and Biotechnology Research, 2*(4), 612-618.

Saechow, S., Thammasittirong, A. & Thammasittirong, S. N. R. (2017). The potential of *Bacillus subtilis* BAS114 for in vitro biocontrol of Fusarium oxysporum. *Advances in Environmental Biology, 11*(1), 46-52.

Samavat, S., Ahmadzadeh, M. & Behboudi, K. (2012). *Rhizobium* spp. Isolates as Biocontrol Agents of Bean Damping-off, Caused by *Rhizoctonia solani*. *Iranian Journal of Plant Protection Science, 43*(2), 295-301. (In Persian).

Shiri-Tabarestani, M., Rastegar, M., Jafarpoor, B. & Rohani, H. (2005). Investigation on biological control of sugar beet damping-off disease by some isolates of *Trichoderma harzianum* Rafai. *Sugar beet, 21*(1), 57-75.

Sindhu, S. S., Rakshiya, Y. S. & Sahu, G. (2009). Rhizosphere bacteria and their role in biological control of plant diseases. *Pest Technology, 3*, 10-21.

Tseng, S. C., Liu, S. Y., Yang, H. H., Lo, C. T. & Peng, K. C. (2008). Proteomic study of biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* T323 in response to *Rhizoctonia solani*. *Agricultural and Food Chemistry, 56*(16), 6914-6922. Doi: 10.1021/jf703626j.

Virgilio, M. M., Hugo, A., Luna, O., Carlos, F., Sandoval, C., Benito, P. A., Lilia, H., Omar, G. & Gomez, A. (2008). Antagonistic activity of selected strains of *Bacillus thuringiensis* against *Rhizoctonia solani* of chili pepper. *African Journal of Biotechnology*, *7*(9), 1271-1276.

Yousefi, H., Sahebani, N. & Mirabolfathi, M. (2010). The effect of salicylic acid and *Bacillus subtilis* on cucumber root and stem rot, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis cucumerinum*. *Iranian Journal of Plant Pathology, 46*(4), 292-308. (In Persian).

Zamanizadeh, H. R., Hatami, N., Aminaee, M. M. & Rakhshandehroo, F. (2011). Application of biofungicides in control of damping disease off in greenhouse crops as a possible substitute to synthetic fungicides. *Internation Journal of Environmental Science and Technology*, *8*(1), 129-136.