نشریه دانش گیاه‌پزشکی ایران
دوره ۴۴، شماره ۲، زمستان ۱۳۹۲ (ص۲۵۲-۲۴۳)

کارایی سویه‌های بومی *Trichoderma harzianum* در بیوکنترل گموز پسته

سیدرضا فانی[۱]، محمد مرادی‌قهدریجانی[۲*]، مهدیه علیپورمقدم[۳]، عبدالحمید شرافتی[۴]، مهدی محمدی‌مقدم[۵]، ابراهیم صداقتی[۶] و پژمان خدایگان[۷]

۱، کارشناس، بخش گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی یزد
۲، ۳، استادیاران پژوهش، بخش گیاه‌پزشکی، مؤسسهٔ تحقیقات پستهٔ کشور، رفسنجان
۴، کارشناس ایستگاه تحقیقات پستهٔ فیض‌آباد، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی
۵، کارشناس ایستگاه تحقیقات پستهٔ دامغان، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان
۶ ، ۷، استادیاران بخش گیاه‌پزشکی، دانشگاه ولی‌عصر رفسنجان
(تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۲۸ - تاریخ تصویب: ۹۲/۸/۲۷)

چکیده

طی سال‌های ۱۳۸۷ تا ۱۳۹۰، ۱۰۰ نمونه خاک از ریزوسفر گیاه، چاله کودی و سطح باغ‌های پستهٔ استان‌های کرمان، یزد، خراسان رضوی و سمنان با هدف یافتن سویه‌های مناسب تریکودرما، به منظور کنترل بیماری گموز پسته، جمع‌آوری و بررسی شد. با استفاده از محیط‌های اختصاصی و عمومی، ۳۲ سویه *Trichoderma harzianum* غالباً از ناحیهٔ ریزوسفر به‌دست آمد. پس از تعیین میزان کارایی سویه‌های تریکودرما در آزمایشگاه به روش کشت متقابل با *Phytophthora melonis*، ۱۱ سویه انتخاب شدند و برهم‌کنش آنها با قارچ بیمارگر در آزمایشگاه با ارزیابی تداخل فیزیکی هیف، ترشحات فرار و غیرفرار و آزمایش‌های گلخانه‌ای با استفاده از سویه‌های منتخب با مایه‌زنی نهال‌های پسته در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام گرفت و صفاتی همچون ارتفاع نهال، طول و وزن خشک ریشه و اندام‌های هوایی و درصد مرگ‌ومیر بررسی شد. در برهم‌کنش با تریکودرما، رشد رویشی قارچ *P. melonis* در سطوح مختلف تحت تأثیر قرار گرفت و در سطح معناداری کاهش یافت. میزان بازدارندگی از رشد *P. melonis* در کشت متقابل هم‌زمان، از ۳۸/۱ تا ۶۳/۶ درصد، کشت متقابل غیرهم‌زمان از ۲۵/۴ تا ۵۸/۷ درصد، ترشحات خارج سلولی از ۵۰ تا ۸۹/۶ درصد و ترکیبات فرار از ۴۴/۷ تا ۷۱/۷ درصد متغیر بود. در آزمایشات گلخانه‌ای، مایه‌زنی با سویه‌های تریکودرما سبب افزایش ۱/۵ تا ۲/۷ برابر در طول ریشه و ۱/۴ تا ۲/۱ برابر در ارتفاع نهال‌ها در مقایسه با گیاهان مایه‌زنی شده با عامل بیماری‌زا به تنهایی و ۱ تا ۱/۹ برابر طول ریشه و ۱ تا ۱/۶ برابر در ارتفاع نهال‌ها در مقایسه با نهال‌های شاهد بدون مایه‌زنی گردید. درصد مرگ‌ومیر نهال‌ها در مایه‌زنی قبل سویه‌های تریکودرما، از صفر تا ۳۱ درصد، مایه‌زنی هم‌زمان از صفر تا ۵۶ درصد و مایه‌زنی پس از *P. melonis* از ۱۲/۵ تا ۷۵ درصد متغیر بود. این اولین گزارش دربارهٔ پراکندگی سویه‌های تریکودرما در باغ‌های پستهٔ کشور و برهم‌کنش آن با بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه است.

واژه‌های کلیدی: انگومک، پوسیدگی طوقه و ریشه، فیتوفتورا، کنترل بیولوژیک.

مقدمه

بیش از ۸۰ سال از کشف توانایی گونه‌های تریکودرما در حمله به قارچ‌های بیمارگر گیاهی و کنترل آنها می‌گذرد (Lorito *et al*., 2010). مطالعات روی مکانیسم‌های آنتاگونیستی تریکودرما بر ترشح بسیاری از آنزیم‌های هیدرولیتیکی، به همراه اثر تشدیدکنندگی آنتی‌بیوتیک‌های ضدقارچی و یک سیستم پیچیده برای به دام انداختن قارچ بیمارگر تأکید دارد. با وجود این،

* نویسنده مسئول: محمد مرادی قهدریجانی تلفن: ۰۹۱۳۸۳۸۵۲۰۲ E-mail: moradi@pri.ir

بیشتر یافته‌های اخیر پیشنهاد می‌کند که در بسیاری از موارد، مایکوپارازیتیسم و آنتی‌بیوز مکانسیم‌های اولیهٔ بیوکنترل نیستند (Lorito *et al*., 2010). بهبود رشد گیاه از طریق افزایش حاصلخیزی خاک‌های تیمار شده با برخی سویه‌های تریکودرما نیز مشاهده شده است (Lindsey *et al*., 1967). در فرایند هم‌زیستی سویه‌های تریکودرما با ریشهٔ گیاهان، سویه‌های تریکودرما باعث کلونیزه‌کردن ریشهٔ گیاهان طی یک فرایند ارتباطی شیمیایی می‌شود. توسعهٔ میسلیوم‌های تریکودرما به لایه‌های رویی ریشه محدود می‌شود. این هم‌زیستی در ریشه باعث القای مقاومت در گیاهان در برابر حملهٔ بیمارگرهای گیاهی در ریشه و اندام‌های هوایی می‌گردد (Yedida *et al*., 1999; Harman *et al*., 2004). موفقیت سویه‌های تریکودرما به عنوان عامل کنترل بیولوژیکی به علت توانایی تکثیر و اسپورزایی بالا، بقا تحت شرایط نامساعد، تحمل شوری و عناصر سنگین، تغییر محیط ریزوسفر، توان بالای کلونیزاسیون ریزوسفر ریشه و هم‌زیستی با آن، رقابت تغذیه‌ای قوی و قدرت تهاجمی بالا در تقابل با بیمارگرهای ریزوسفر است. علاوه بر آن، ترشح ترکیبات شیمیایی مختلف، قدرت تحمل یا خنثی‌سازی ترکیبات تولید شده توسط گیاهان و دیگر میکروارگانیسم‌ها، ایجاد و القاء مقاومت با تحریک گیاه به تولید زهرابه‌های سمی برای بیمارگر و فعال کردن مکانیسم‌های دفاعی و رشدی از دیگر عوامل مؤثر در موفقیت تریکودرما است (Altomare *et al*., 1999; Yedidia *et al*., 1999; Kredics *et al*., 2001; Howell, 2003; Benitez *et al*., 2004; Harman *et al*., 2004).

بیماری پوسیدگی طوقه و ریشهٔ پسته از دیرباز یکی از معضلات باغ‌های پسته بوده است. به نحوی که در باغ‌های با شرایط مناسب برای بیمارگر، باعث غیراقتصادی شدن تولید می‌گردد. چندین گونهٔ مختلف قارچ *Phytophthora* از مناطق مختلف پسته‌کاری به عنوان عامل این بیماری گزارش شده‌اند (Mirabolfathy et al., 1990; Banihashemi, 1995; Moradi, 1998; Mirabolfathy *et al*., 2001). امروزه، برای مدیریت این بیماری در باغ کنترل تلفیقی شامل قرارگرفتن درختان در مرکز پشته‌ها با عرض یک متر و ۲۰ تا ۴۰ سانتی‌متر بالاتر از سطح ردیف‌های آبیاری، نبود غرقاب سنگین، اصلاح بافت خاک برای بهبود نفوذپذیری آب و استفاده از قارچ‌کش فوزتیل آلومینیوم به‌صورت محلول‌پاشی در زمان مناسب و نهایتاً استفاده از ارقام مقاوم (رقم بادامی زرندی به‌طور سنتی) جهت کاهش خسارت این بیماری توصیه شده است (Moradi, 1998; Moradi & Masoomi, 2012).

گونه‌های مختلف تریکودرما به عنوان یکی از پرکاربردترین عوامل بیوکنترل برای مهار بیمارگرهای مختلف در میزبان‌های گوناگونی استفاده شده و توسعه داده شده‌اند. برای مثال، می‌توان به اثر کنترل‌کنندگی قارچ‌های *Phytophthora erythroseptica* و *Colletotrichum coccodes* در سیب‌زمینی (Zafari, 1991)، پاخورهٔ گندم ناشی از *Guamanomyces graminis* (Harman *et al*., 2004)، *Botrytis cinerea* در لوبیا (Howell, 2003)، پوسیدگی ریشه ناشی از *Phytophthora cactorum* روی سیب (Smith *et al*., 1990) با مکانیسم‌های مختلف را نام برد.

با توجه به گسترش روزافزون بیماری گموز در باغ‌های پسته، به‌ویژه در استان کرمان و مشکلات مختلف اقتصادی و زیست‌محیطی مرتبط با کاربرد سموم شیمیایی و کاربردی نشدن تولید انبوه پایه‌های مقاوم به بیماری، استفاده از یک روش کنترل بیولوژیک مؤثر در تلفیق با روش‌های دیگر کنترل می‌تواند در مدیریت این بیماری مؤثر باشد. نظر به اینکه تحقیقی در زمینهٔ قابلیت گونه‌های بومی تریکودرما به منظور کنترل بیماری گموز در کشور صورت نگرفته بود، در این مطالعه تعداد زیادی نمونه‌های خاک از مناطق مختلف پسته‌کاری بررسی شد و توانایی سویه‌های انتخاب شده از غربال اولیه در آزمایشگاه بر قارچ عامل بیماری و نهال‌های پسته در گلخانه بررسی گردید.

مواد و روش‌ها

جداسازی تریکودرما

از ریزوسفر درختان، چاله‌کودی و خاک سطحی (تا عمق ۳۰ سانتی‌متری) در مناطق مختلف پسته‌کاری کشور شامل استان‌های کرمان، خراسان رضوی، سمنان و یزد طی سال‌های ۱۳۸۷ تا ۱۳۹۰ به‌صورت مجزا نمونه‌برداری صورت گرفت. در هر باغ، از جهت‌های مختلف جغرافیایی (شمال، جنوب، شرق و غرب) به

فواصل ۱۰ تا ۱۵ متر نمونه‌برداری شد و پس از مخلوط کردن، سه نمونهٔ مرکب از هر باغ به آزمایشگاه منتقل گردید. برای جداسازی، از محیط عمومی APDA و محیط اختصاصی داوه (Davet) به شرح ذیل استفاده شد. برای محیط APDA، ۳ نمونهٔ ۵ گرمی از خاک در داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل ریخته و به مدت ۲ ساعت با سرعت ۱۰۰ تا ۲۰۰ دور در دقیقه با استفاده از شیکر هم زده شد. سوسپانسیون حاصل پس از رقیق‌سازی (تا رقت ۱/۱۰۰) در ۳ تکرار و به میزان ۰/۲ میلی‌لیتر برای هر تکرار روی پتری‌دیش حاوی محیط APDA به‌طور یکنواخت پخش شد. این محیط شامل عصارهٔ ۲۵۰ گرم سیب‌زمینی + ۲۰ گرم دکستروز + ۱۶ گرم آگار و۴۰ - ۳۵ قطره اسیدلاکتیک ۵۰ درصد در لیتر بود و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهٔ سلسیوس و فشار ۱/۵ اتمسفر استریل شد. برای استفاده از محیط کشت اختصاصی داوه (Davet, 1979) یک نمونهٔ ۲۰ گرمی از خاک در یک ارلن حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محلول اسیدسیتریک در آب مقطر به نسبت ۲ در هزار و یک قطره مویان (Tween 20) ریخته شد. مخلوط فوق به‌مدت چند دقیقه با استفاده از شیکر به هم زده شد و ۲-۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصله به‌وسیلهٔ پیپت در تشتک‌های پتری استریل ریخته شد، سپس ۲۰ میلی‌لیتر محیط آب آگار WA دو درصد با دمای حدود ۴۵-۴۰ درجهٔ سلسیوس به آن اضافه گردید و به‌طور افقی در جهت‌های مختلف تکان داده تا سوسپانسیون یکنواختی به‌وجود آید. پس از بستن محیط، به‌وسیلهٔ چوب‌پنبه سوراخ‌کن چند حلقه به قطر ۲۰ میلی‌متر از این محیط کشت جدا و به پتری حاوی محیط داوه منتقل شد. بدین ترتیب، از هر نمونه خاک ۱۰ بلوک به ۲ پتری حاوی محیط داوه منتقل گردید. تشتک‌های پتری به مدت ۹۶-۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس و در تاریکی نگهداری شدند. سپس برای رنگ گرفتن کلونی‌ها، تشتک‌های پتری در شرایط نور معمولی و درجهٔ حرارت آزمایشگاه قرار گرفتند. برای خالص‌سازی سویه‌ها از روش تک‌اسپور و برای نگهداری آنها از محیط کشت PDA مورب استفاده گردید. شناسایی سویه‌ها در سطح گونه بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی اندام‌های تولید مثل رویشی، دما و سرعت‌های رشد روی محیط‌های کشت مختلف صورت گرفت (Bissett, 1991; Rifai, 1969; Samuels *et al.*, 2013).

تهیهٔ قارچ عامل بیماری

در این بررسی از قارچ *Phytophthora melonis* جدا شده از طوقه و ریشهٔ درختان پستهٔ آلوده در شهرستان رفسنجان (مرادی، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مؤسسهٔ تحقیقات پسته کشور) در سال ۱۳۸۸ استفاده گردید. این گونه بر اساس روش‌های مورفولوژیکی شناسایی گردید (Stamps *et al.*, 1990; Mirabolfathy *et al.*, 2001).

تأثیر سویه‌های تریکودرما بر *P. melonis*

آزمایشگاه

به منظور بررسی میزان تأثیرگذاری سویه‌های تریکودرما بر رشد میسلیومی *P. melonis* از تست‌های کشت متقابل به‌صورت هم‌زمان (کشت عامل بیماری همراه با تریکودرما) و غیرهم‌زمان (کشت عامل بیماری ۴۸ ساعت قبل از تریکودرما)، ترشحات مایع خارج‌سلولی و متابولیت‌های فرار سویه‌ها استفاده گردید (Dennis & Webster, 1971 a & b).

ارتباط بین هیف‌های سویه‌های تریکودرما از نظر پارازیته‌کردن، لیزکردن و چگونگی تماس با میسلیوم قارچ عامل بیماری نیز بررسی شد (Kim *et al.*, 2002; Harman *et al.*, 2004). درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم *P. melonis* بعد از ۹۶ ساعت با استفاده از رابطهٔ زیر محاسبه شد:

$$\frac{\text{۱۰۰ × (شعاع رشد قارچ بیمارگر در شرایط برهم‌کنش − شعاع رشد قارچ بیمارگر در تشتک پتری شاهد)}}{\text{شعاع رشد قارچ بیمارگر در تشتک پتری شاهد}}$$

همهٔ آزمون‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت و داده‌های به‌دست‌آمده تجزیه و تحلیل آماری شدند. برای مقایسهٔ میانگین‌های

به‌دست‌آمده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و سطح احتمال آماری ۵ درصد استفاده گردید.

گلخانه

بذور پستهٔ رقم سرخس از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی تهیه شد. کاشت بذرها مطابق روش ارائه‌شده توسط مرادی (Moradi, 1998) در خاک استریل صورت گرفت. برای مایه‌زنی نهال‌های ۶ ماهه، اینوکلوم قارچ *P. melonis* بر روی دانهٔ گندم سترون، به مدت یک ماه در دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس تهیه شد. در این بررسی از ۱۰ سویه تریکودرما که بیشترین تأثیر را بر قارچ عامل بیماری در شرایط آزمایشگاهی داشتند، استفاده گردید. به منظور پرورش اینوکولوم سویه‌های مختلف تریکودرما از سبوس گندم استفاده گردید (Cavalcante *et al*., 2008). فلاسک‌های حاوی سبوس گندم مایه‌زنی‌شده با سویه‌های تریکودرما در انکوباتور با دمای ۲۷ درجهٔ سلسیوس به مدت ۱۰ روز نگهداری شدند. برای هر دو قارچ عامل بیماری و سویه‌های مختلف تریکودرما، فلاسک‌ها به‌صورت یک روز در میان تکان داده شدند تا تمامی سطح پوشش داده شود. مایه‌زنی قارچ عامل بیماری و سویه‌های تریکودرما به صورت ترادف زمانی انجام گردید، که شامل مایه‌زنی سویه‌های تریکودرما یک ماه قبل از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری، به‌صورت هم‌زمان و یا یک ماه بعد از مایه‌زنی قارچ عامل بیماری بود. برای مایه‌زنی سویه‌های تریکودرما، خاک سطحی گلدان‌ها به نسبت حجمی ۹ به ۱ با اینوکلوم پرورش یافته، مخلوط و سپس آبیاری شدند. برای مایه‌زنی قارچ عامل بیماری، خاک سطحی گلدان‌ها برداشته و اینوکلوم *P. melonis* در ناحیهٔ اطراف ریشهٔ نهال‌های پسته (۵ گرم به ازای هر کیلوگرم خاک گلدان) قرار داده شدند و سپس خاک سطحی برداشته شده مجدداً به گلدان‌ها اضافه شد. برای گیاهان شاهد بدون مایه‌زنی از گندم و سبوس سترون استفاده گردید. گلدان‌ها در تناوب نوری ۸ ساعت تاریکی و ۱۶ ساعت روشنایی نگهداری شدند. دمای گلخانه بین ۳۰-۲۵ درجهٔ سلسیوس متغیر بود. فاکتورهای تحت اندازه‌گیری شامل وزن خشک ساقه و ریشه، ارتفاع ساقه، طول ریشه و درصد مرگ‌ومیر نهال‌ها بود. همهٔ آزمایش‌ها در قالب طرح بلوک‌های کاملاً تصادفی در چهار تکرار (هر تکرار یک گلدان) و هر تکرار حاوی چهار نهال پستهٔ رقم سرخس بود. داده‌های به‌دست‌آمده با استفاده از نرم‌افزار SAS تجزیه و تحلیل آماری شدند و میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵٪ مقایسه شدند.

نتایج

جداسازی

نتایج حاصل از جداسازی نشان داد که از ۳۲ درصد نمونه‌ها، قارچ تریکودرما جدا گردید. سویه‌های تریکودرما به‌ترتیب از ۷۵، ۱۵ و ۱۰ درصد از نمونه‌های ریزوسفر، خاک و چاله‌کودی قابل‌جداسازی بودند. بر اساس مشخصات میکرومرفولوژیکی شامل رنگ، شکل، اندازه و دیگر ویژگی‌های کنیدیوفورها، فیالیدها، کلامیدیوسپورها، کنیدی‌ها، ریسه‌های هوایی و ریسه‌های فرورفته در محیط کشت سویه‌های به‌دست‌آمده به گونهٔ *Trichoderma harzianum* تعلق داشتند. از میان ۵۰ سویهٔ تریکودرمای به‌دست‌آمده از باغ‌های پسته، تعداد ۳۲ سویهٔ *T. harzianum* به‌دست آمد. با توجه به فراوانی بیشتر این گونه در خاک مناطق پسته‌کاری کشور و همچنین قابلیت کنترل بیولوژیک آن، سویه‌های این گونه در آزمایش‌های غربال‌گری کنترل بیولوژیک بر اساس روش کشت متقابل بررسی شد. تعداد ۱۱ سویه که بیشترین توانایی را در بازدارندگی از رشد بیمارگر نشان دادند انتخاب، و در آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

تأثیر سویه‌های تریکودرما بر *P. melonis*

الف) آزمایشگاه

نتایج حاصل از بررسی تست‌های مختلف آزمایشگاهی، حاکی از توانایی سویه‌های مختلف تریکودرما در جلوگیری از رشد قارچ عامل بیماری با مکانیسم‌های مختلف است. در کشت متقابل خواه به‌صورت هم‌زمان و یا ناهم‌زمان، ترشحات خارج سلولی (غلظت‌های مختلف) و ترکیبات فرار، سویه‌های قارچ تریکودرما رشد میسلیومی *P. melonis* را در سطح معنادار ۹۵ درصد کاهش دادند (جدول ۱). در کشت متقابل ناهم‌زمان و

هم‌زمان، ترشحات خارج سلولی و ترکیبات فرار به‌ترتیب سویه‌های TP1419، TP129، TP129 و TP1419 بیشترین تأثیر را در بازدارندگی از رشد میسلیومی داشتند، هرچند تعدادی سویهٔ دیگر نیز در بازدارندگی از رشد از نظر آماری با سویه‌های فوق تفاوتی نداشتند. در کشت متقابل، سویه‌های تریکودرما رشد سریع‌تری نسبت به بیمارگر از خود نشان داده و قادر به فراگیری (کلونیزاسیون) میسیلیوم‌های *P. melonis* بودند. میزان بازدارندگی از رشد *P. melonis* در کشت متقابل هم‌زمان از ۳۸/۱ تا ۶۳/۶ درصد، در کشت متقابل ناهم‌زمان از ۲۵/۴ تا ۵۸/۷ درصد، در ترشحات خارج سلولی از ۵۰ تا ۸۹/۶ درصد و در ترکیبات فرار از ۴۴/۷ تا ۷۱/۷ درصد متغیر بود. در مشاهدات میکروسکوپی مشخص گردید که هیف‌های سویه‌های تریکودرما هنگام تماس با هیف‌های *P. melonis* به‌صورت طولی رشد و با گذشت زمان، پیچش و تماس هیفی افزایش یافته و سپس نفوذ هیف‌های تریکودرما به داخل هیف‌های *P. melonis* رخ می‌دهد. این موضوع وجود برهم‌کنش رقابتی با مکانیسم تماسی و هیپرپارازیتیسم بین سویه‌های تریکودرما و قارچ *P. melonis* را نشان می‌دهد.

جدول ۱. تأثیر سویه‌های *Trichoderma harzianum* روی بازدارندگی رشد میسلیومی (٪) *Phytophthora melonis* در کشت متقابل هم‌زمان و ناهم‌زمان، ترشحات خارج سلولی و ترشحات فرار تحت شرایط آزمایشگاهی

Trichoderma harzianum isolates	بازدارندگی از رشد میسلیومی (٪) Growth inhibition (%)							
	ترکیبات فرار بعد از ۹۶ ساعت *** Volatile metabolites		کشت متقابل (Dual culture)				ترشحات خارج سلولی**** Extra cellular metabolites	
			هم‌زمان		ناهم‌زمان			
TP1419	۷۱/۷۱*	a**	۵۴/۵۵	abc	۵۸/۷۳	a	۸۶/۵۰	Ab
TP595	۵۰/۰۰	Cd	۴۳/۶۴	cd	۵۳/۹۷	ab	۸۷/۷۵	A
TP191	۶۱/۱۸	Abc	۵۶/۲۶	ab	۵۰/۷۹	ab	۷۸/۱۹	Bc
TP129	۶۴/۴۷	ab	۶۳/۶۴	a	۴۶/۰۳	abc	۸۹/۵۸	A
T P626	۵۳/۲۹	bcd	۵۲/۷۳	abc	۴۴/۴۴	abc	۸۱/۲۵	Abc
TPB795	۴۶/۰۵	d	۵۳/۶۴	abc	۳۸/۱۰	bcd	۶۱/۵۰	D
TPA1268	۵۵/۲۶	bcd	۵۶/۳۶	ab	۳۶/۳۳	cd	۸۱/۲۵	Abc
TPT6	۴۹/۳۴	cd	۳۸/۱۸	d	۳۱/۷۵	cd	۷۷/۰۸	Bc
TPA365	۴۴/۷۴	d	۵۶/۳۶	ab	۳۱/۷۵	cd	۶۸/۷۵	C
T2947	۵۰/۰۰	cd	۴۵/۴۵	bcd	۳۰/۱۶	cd	۵۰/۰۰	D
TP171	۵۵/۹۲	bcd	۵۹/۰۹	a	۲۵/۴۰	cd	۸۹/۵۸	A

* هر عدد میانگین ۴ داده است.

** در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک‌اند از نظر آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ با یکدیگر اختلاف معناداری ندارند.

*** در ارتباط با ترکیبات فرار، بازدارندگی از رشد میسلیومی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت اندازه‌گیری گردید. ولی در جدول بالا تنها داده‌های ۹۶ ساعت نمایش داده شده است.

**** در ارتباط با ترشحات خارج سلولی غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد نیز آزمایش شدند و در جدول بالا تنها ۳۰٪ نشان داده شده است.

جدول ۲. تأثیر مایه‌زنی نهال‌های پسته با سویه‌های مختلف *Trichoderma harzianum* قبل، هم‌زمان و بعد از مایه‌زنی با *Phytophthora melonis* روی ارتفاع و طول ریشه نهال‌های پسته در شرایط گلخانه‌ای

Inoculation***	Stem length (cm) طول ساقه						Root length (cm) طول ریشه					
	Before (قبل)		Simultaneous (هم‌زمان)		After (بعد)		Before (قبل)		Simultaneous (هم‌زمان)		After (بعد)	
P. melonis + TP1419	۱۷/۰۶*	a**	۱۸/۶۹	a	۱۵/۲۵	a	۱۲/۹۷	a	۱۸/۸۹	a	۱۶/۶۲	a
P. melonis + TP595	۱۱/۶۷	c	۱۱/۸۱	bc	۱۱/۹۵	c	۱۳/۳۷	cd	۱۴/۰۴	bcd	۱۲/۳۴	bc
P. melonis + T P191	۱۴/۲۸	bc	۱۲/۹۱	b	۱۲/۹۴	abc	۱۷/۸۱	abc	۱۶/۹۲	abc	۱۳/۲۵	bc
P. melonis + T P129	۱۴/۸۴	ab	۱۲/۹۹	b	۱۳/۷۸	abc	۱۹/۲۹	ab	۱۸/۰۳	ab	۱۷/۲۵	a
P. melonis + T P626	۱۳/۷۵	bc	۱۲/۰۶	bc	۱۲/۴۴	abc	۱۶/۵۹	bc	۱۴/۲۵	bcd	۱۲/۶۳	bc
P. melonis + TPB795	۱۴/۰۰	bc	۱۲/۷۲	b	۱۲/۶۲	abc	۱۷/۰۷	bc	۱۵/۵۶	abc	۱۳/۱۹	bc
P. melonis + PA1268	۱۴/۱۶	bc	۱۶/۱۶	a	۱۴/۸۲	ab	۱۸/۶۶	ab	۱۶/۶۵	abc	۱۴/۹۲	ab
P. melonis + TPT6	۱۳/۶۲	bc	۱۱/۹۳	bc	۱۲/۰۳	bc	۱۶/۰۰	bc	۱۳/۵۰	cd	۱۲/۵۰	bc
P. melonis + TPA365	۱۳/۵۳	bc	۱۲/۳۱	b	۱۲/۴۷	abc	۱۶/۱۶	bc	۱۵/۰۹	abc	۱۲/۳۷	bc
P. melonis + TP171	۱۴/۱۹	bc	۱۳/۰۰	b	۱۲/۶۴	abc	۱۸/۸۵	ab	۱۷/۰۰	abc	۱۳/۹۴	b
P. melonis alone	۹/۱۹	d	۹/۱۹	c	۹/۱۹	d	۸/۰۶	e	۸/۰۷	e	۸/۰۶	d
No-inoculation control	۱۱/۸۱	c	۱۱/۸۱	bc	۱۱/۸۱	c	۱۰/۷۲	ce	۱۰/۷۲	de	۱۰/۷۲	C

* هر عدد میانگین ۴ تکرار (گلدان) و هر تکرار حاوی ۴ نهال پسته است.

** در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک‌اند از نظر آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ با یکدیگر اختلاف معناداری ندارند.

*** سویه‌های *T. harzianum* قبل، هم‌زمان و بعد از مایه‌زنی *P. melonis* به خاک گلدان‌ها اضافه شدند.

ب) بررسی‌های گلخانه‌ای

همانند نتایج به‌دست‌آمده در آزمایشگاه، سویه‌های تریکودرما در مایه‌زنی با *P. melonis* یا نهال‌های شاهد بدون مایه‌زنی قادر به تأثیرگذاری مثبت بر فاکتورهای رشدی نهال پسته از جمله طول ریشه، ارتفاع نهال‌ها، وزن خشک ریشه و اندام‌هایی هوایی و درصد مرگ و میر نهال‌ها بودند (جدول ۲، ۳ و نمودار ۱). در صفات ارتفاع نهال‌ها و طول ریشه، مایه‌زنی با سویه‌های تریکودرما با یا بدون حضور *P. melonis* باعث افزایش ارتفاع نهال‌ها و طول ریشه گردید. این افزایش در طول ریشه بیشتر از ارتفاع بود (جدول ۲).

برای مثال مایه‌زنی با سویه‌های تریکودرما سبب افزایش ۱/۵ تا ۲/۷ برابر در طول ریشه و ۱/۴ تا ۲/۱ برابر در ارتفاع نهال‌ها در مقایسه با گیاهان مایه‌زنی‌شده با عامل بیماری‌زا به‌تنهایی و ۱ تا ۱/۹ برابر طول ریشه و ۱ تا ۱/۶ برابر در ارتفاع نهال‌ها در مقایسه با نهال‌های شاهد بدون مایه‌زنی گردید. این موضوع در صفت وزن، قابل‌ملاحظه‌تر بوده و باعث افزایش ۱/۷ تا ۵/۷ و ۱/۳ تا ۳ برابر به‌ترتیب در ریشه و اندام‌های هوایی در مقایسه با نهال‌های مایه‌زنی‌شده با *P. melonis* به‌تنهایی و ۱/۳ تا ۳/۷ برابر در ریشه و ۱/۲ تا ۲/۸ برابر در اندام‌های هوایی نسبت به شاهد بدون مایه‌زنی گردید که این موضوع بیانگر تأثیر مثبت سویه‌های تریکودرما روی میزان یا فراوانی تولید ریشه‌های فرعی نیز نسبت به گیاهان شاهد است (جدول ۳). مشابه با نتایج به‌دست‌آمده در آزمایشگاه، توانایی سویه‌های مختلف تریکودرما در صفت‌های اندازه‌گیری‌شده در گلخانه متفاوت بوده و در مجموع سویه‌های TP1419 و TPA1268 در تمامی صفات اندازه‌گیری شده بیشترین تأثیر را داشتند. به هر حال، در تعدادی از صفات اندازه‌گیری‌شده، این دو سویه با چندین سویهٔ دیگر از نظر آماری تفاوت نداشتند. ولی نکتهٔ مهم دربارهٔ این دو سویه تأثیرگذاری خوب آنها در جلوگیری از مرگ‌ومیر نهال‌ها است (نمودار ۱)، که هیچ‌گونه مرگ‌ومیری در مایه‌زنی قبل و یا هم‌زمان نسبت به مایه‌زنی با *P. melonis* مشاهده نگردید. تأثیرگذاری سویه‌های مختلف تریکودرما بر درصد مرگ‌ومیر نهال‌ها بسته به نوع سویه و زمان مایه‌زنی متفاوت بود، به نحوی که درصد مرگ‌ومیر نهال‌ها در مایه‌زنی قبل سویه‌های تریکودرما از صفر تا ۳۱ درصد، در مایه‌زنی هم‌زمان از صفر تا ۵۶ درصد و در مایه‌زنی پس از *P. melonis* از ۱۲/۵ تا ۷۵ درصد متغیر بود. این موضوع می‌تواند نشان‌دهندهٔ استقرار خوب سویه‌های تریکودرما در خاک، خصوصاً در مایه‌زنی قبل از عامل بیماری و مایه‌زنی هم‌زمان باشد. در گیاهان بدون مایه‌زنی با *P. melonis* هیچ‌گونه مرگ‌ومیری مشاهده نشد.

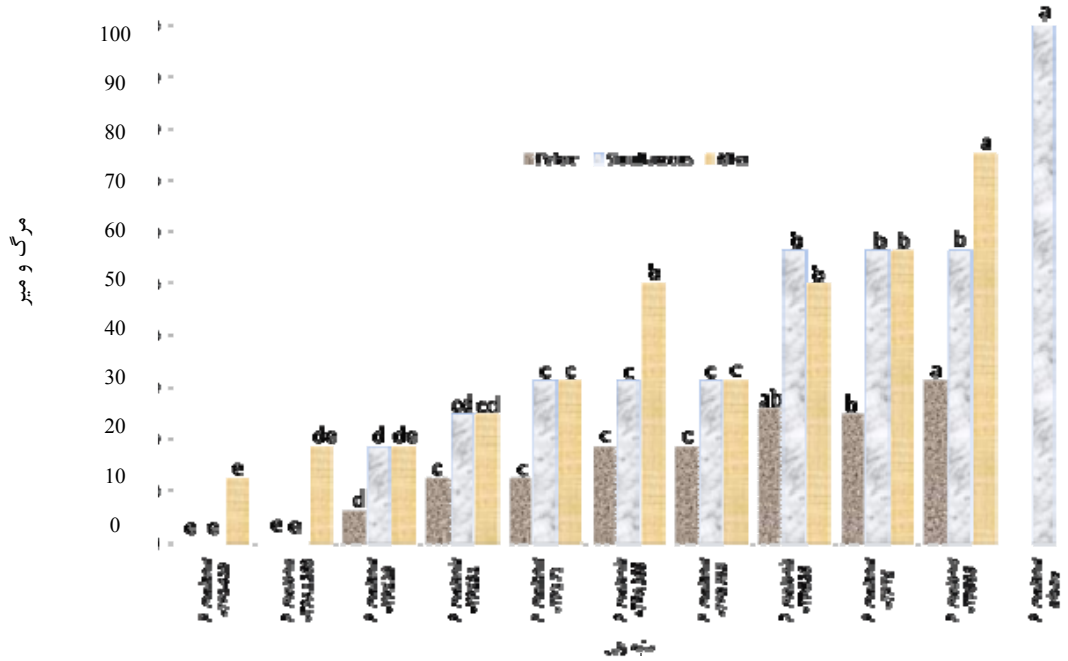
جدول ۳. تأثیر مایه‌زنی نهال‌های پسته با سویه‌های مختلف *Trichoderma harzianum* قبل، هم‌زمان و بعد از مایه‌زنی با *Phytophthora melonis* روی وزن خشک ریشه و اندام‌هایی در شرایط گلخانه‌ای

Inoculation***	Foliar weight (g) وزن خشک اندام‌های هوایی						Root weight (g)* وزن خشک ریشه					
	Before (قبل)		Simultaneous (هم‌زمان)		After (بعد)		Before (قبل)		Simultaneous (هم‌زمان)		After (بعد)	
P. melonis + TP1419	۵/۴۷*	a**	۵/۷۳	a	۴/۳۶	a	۶/۷۹	a	۵/۰۰	a	۴/۱۱	a
P. melonis + TP595	۲/۴۸	d	۲/۸۹	cd	۲/۵۶	bcd	۲/۹۴	bc	۲/۳۶	cde	۲/۱۳	b
P. melonis + T P191	۴/۳۱	b	۳/۵۰	bc	۳/۴۵	b	۵/۸۳	a	۴/۱۳	abc	۲/۶۸	b
P. melonis + T P129	۴/۴۳	ab	۳/۶۰	bc	۳/۱۲	b	۵/۹۸	a	۴/۸۰	ab	۴/۲۳	a
P. melonis + T P626	۲/۸۰	d	۳/۰۹	c	۲/۶۶	bcd	۵/۴۲	ab	۲/۸۴	a-e	۲/۵۳	b
P. melonis + TPB795	۴/۰۰	bc	۳/۲۲	bc	۳/۰۸	b	۵/۸۱	a	۳/۹۲	a-d	۲/۳۵	b
P. melonis + TPA1268	۴/۰۰	bc	۴/۱۹	b	۵/۰۳	a	۵/۷۰	ab	۴/۸۹	a	۵/۱۷	a
P. melonis + TPT6	۳/۰۰	cd	۳/۰۶	c	۲/۵۶	bcd	۲/۹۲	bc	۲/۶۷	b-e	۲/۲۵	b
P. melonis + TPA365	۲/۶۲	d	۳/۲۹	bc	۲/۶۴	bcd	۳/۰۰	bc	۲/۸۰	a-e	۲/۲۹	b
P. melonis + TP171	۳/۹۲	bc	۳/۲۸	bc	۲/۹۹	bc	۶/۳۸	a	۴/۰۷	abc	۲/۵۷	b
P. melonis alone	۱/۸۵	d	۱/۸۵	e	۱/۸۵	d	۱/۱۶	c	۱/۱۹	e	۱/۱۹	b
No-inoculation control	۲/۰۰	d	۲/۰۰	de	۲/۰۰	cd	۱/۸۰	c	۱/۸۰	de	۱/۸۰	b

* هر عدد میانگین ۴ تکرار (گلدان) و هر تکرار حاوی ۴ نهال پسته است.

** در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک‌اند از نظر آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ با یکدیگر اختلاف معناداری ندارند.

*** جدایه‌های *T. harzianum* قبل، هم‌زمان و بعد از مایه‌زنی *P. melonis* به خاک گلدان‌ها اضافه شدند.



نمودار ۱. تأثیر مایه‌زنی نهال‌های پسته با جدایه‌های مختلف *Trichoderma harzianum* قبل، هم‌زمان و بعد از مایه‌زنی با *P. melonis* بر درصد مرگ‌ومیر در شرایط گلخانه‌ای

هر عدد میانگین ۴ تکرار (گلدان) و هر تکرار حاوی ۴ نهال پسته است. در مایه‌زنی قبل، هم‌زمان و بعد، میانگین‌هایی که دارای حروف مشترک‌اند از نظر آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۰/۰۵ با یکدیگر اختلاف معناداری ندارند.

بحث

بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه (گموز یا انگومک) و مدیریت آن از دیرباز یکی از چالش‌های مهم باغ‌های پستهٔ کشور بوده است. نتایج نشان داد که *T. harzianum* در بیشتر مناطق مختلف پسته‌کاری کشور وجود دارد، هرچند در بعضی از مناطق جداسازی آن به‌سختی صورت می‌گرفت. این موضوع می‌تواند انعکاس‌دهندهٔ فاکتورهای اکولوژیکی مؤثر در پراکندگی تریکودرما، بقا و دینامیک جمعیت آن در خاک‌ها باشد، که توسط محققان مختلف بررسی شده است (Danielson & Davey, 1973; Hubbard *et al*., 1983). وقتی شرایط خشک در خاک برای زمان طولانی ادامه یابد، جمعیت‌های *Trichoderma* و *Glioclodium* کاهش می‌یابد (Davet, 1979 & 1981). جدایه‌های خاصی از گونه‌های *T. hamatum* و *T. pseudokoningi* با شرایط رطوبتی بالای خاک سازگار شده‌اند و گونه‌های *T. viride* و *T. polysporum.* محدود به نواحی با درجهٔ حرارت پایین‌اند، درحالی‌که، گونهٔ *T. harzianum* عموماً در نواحی با آب‌وهوای گرم وجود دارد و گونه‌های *T. hamatum* و *T. koningii* به‌صورت گسترده در نواحی با شرایط آب‌وهوایی متنوع یافت می‌شود. میزان آهن خاک ممکن است به عنوان یک فاکتور مهم برای وجود تریکودرما در خاک مطرح باشد (Danielson & Davey, 1973). تحقیقات نشان می‌دهد سودوموناد‌های فلورسنت خاک، توانایی و استقرار گونه‌های تریکودرما را محدود می‌کنند (Hubbard *et al*., 1983).

در بررسی نمونه‌های به‌دست‌آمده از سه محیط خاک، ریزوسفر و چاله کودی، فراوانی سویه‌های تریکودرما در ناحیهٔ ریزوسفر از دیگر قسمت‌ها بیشتر بوده است. این موضوع می‌تواند حاکی از نحوهٔ سازگاری آن با شرایط باغ‌های پسته و نیازمندی‌های اکولوژیکی و بیولوژیکی همچون رطوبت و اسیدیته خاک، درجهٔ حرارت، خصوصیات شیمیایی و مواد آلی تولید شده توسط سایر میکرارگانیسم‌ها جهت استقرار و همزیستی باشد، که محققان مختلف به آن اشاره کرده‌اند (Ahmad & Baker 1987; Papavizas *et al*., 1985). به هر حال

دینامیک جمعیت سویه‌های تریکودرما در ریزوسفر و خاک درختان پسته در حضور یا عدم حضور قارچ بیمارگر به تحقیق بیشتر نیاز دارد که در نظر گرفتن آن در آزمایش‌های باغی ضروری به نظر می‌رسد.

توانایی محیط‌های کشت مورد استفاده نشان‌دهندهٔ نبود تفاوت در کارایی آنها در جداسازی تریکودرما از خاک در مناطق تحت بررسی است. با توجه به مواد مورد استفادهٔ رایج، قیمت کمتر و آسانی روش در محیط کشت APDA و سختی و زمان‌بر بودن روش کار برای جداسازی با محیط کشت داوه، در جداسازی‌های بعدی از محیط کشت APDA استفاده گردید. در کشت متقابل، سویه‌های تریکودرما با سرعت رشد بالاتر و اشغال سریع‌تر سوبسترا در رقابت تغذیه‌ای موفق‌تر بودند. سویه‌های تریکودرما همچنین قادر به رشد بر روی کلونی‌های قارچ *P. melonis* بود و این امر باعث کلونیزاسیون میسلیوم‌های عامل بیماری (مایکوپارازیتیسم) با مکانیسم‌هایی همچون تماس و پیچش (coiling) در طول ریسهٔ قارچ و نفوذ به داخل سلول‌های قارچ شده و در نهایت سبب اضمحلال میسلیوم می‌شد. در این خصوص، محققان مختلف نیز نتایج مشابهی را در کشت متقابل سویه‌ها، و یا گونه‌های مختلف تریکودرما با گونه‌های متفاوت فیتوفتورا به‌دست آورده‌اند (Etebarian et al., 2000; Hydari-Faroughi *et al.*, 2005). چگونگی تقابل فیزیکی سویه‌های تریکودرما با *P. melonis*، حاکی از وجود کشش مثبت سویه‌های تریکودرما به سمت هیف‌های بیمارگر است که به موازات میسلیوم بیمارگر رشد کرده و به دور آن پیچیده و با گذشت زمان تماس هیفی افزایش یافته و نفوذ به داخل هیف‌های بیمارگر و مرگ آنها را سبب می‌شود. این امر حاکی از برهم‌کنش مستقیم بین این دو عامل یا پدیدهٔ مایکوپارازیتیسم است. پدیدهٔ مایکوپارازیتیسم شامل حملهٔ مستقیم یک قارچ به قارچ دیگر با فرایندهای متوالی تشخیص، حمله، نفوذ و مرگ میزبان است (Benítez *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008). نتایج حاصل از ترشحات خارج سلولی و متابولیت‌های فرار حاکی از تأثیر متفاوت بازدارندگی سویه‌های مختلف تریکودرما بر رشد میسلیومی *P. melonis* بود. در ترشحات خارج سلولی با افزایش غلظت و در متابولیت های فرار با افزایش زمان نگهداری درصد بازدارندگی افزایش می‌یافت و به‌ترتیب به حداکثر ۸۹/۶ و ۷۱/۷ می‌رسید. این موضوع نشان می‌دهد ترشحات خارج سلولی و متابولیت‌های فرار با ماهیت‌ها و مکانیسم‌های مختلف دارای خاصیت آنتاگونیستی‌اند، که توسط محققان مختلف بررسی شده است (Lorito *et al.*, 1994; Papavizas 1985; Ghisalberti & Sivasithamparam 1991; Dennis & Webster; 1971 A & B; Dickinson *et al.*, 1995). بررسی توانایی سویه‌های مختلف تریکودرما در شرایط گلخانه‌ای روی نهال‌های پسته حاکی از تأثیر معنادار سویه‌ها روی فاکتورهای رشدی نهال‌ها و بیماری‌زایی *P. melonis* در ترادف‌های مایه‌زنی بود. به‌طور کلی تأثیر زمان‌های مختلف مایه‌زنی قبل، هم‌زمان و بعد از مایه‌زنی *P. melonis* در صفات ریشه‌ای همانند طول و وزن ریشه و درصد مرگ‌ومیر قابل‌ملاحظه‌تر از اندام‌های هوایی بود. این موضوع در صفت مرگ و میر نهال‌ها در مایه‌زنی با سویه‌های TP1419 و TPA1268 قبل و هم‌زمان نسبت به *P. melonis* به‌خوبی قابل مشاهده است (جدول ۴). به هر حال ترادف زمانی مایه‌زنی در تعدادی از سویه‌ها و صفات مختلف اندازه‌گیری شده تفاوت چندانی را نشان نداد. این موضوع می‌تواند به علت تفاوت در استقرار و بقای سویه‌های تریکودرما در خاک تحت آزمایش، کارایی استفاده از مواد غذایی، تغییر محیط ریزوسفر، فعال نمودن مکانیسم‌های دفاعی و رشدی در نهال‌ها، تحمل‌پذیری آنها بر اثر بازدارندگی ناشی از ترکیبات تولید شده توسط گیاهان یا سایر میکروارگانیسم‌ها در خاک و تنوع ژنتیکی در نهال‌های پسته حاصل از گرده‌افشانی آزاد در صفات رشدی باشد (Benítez *et al.*, 2004; Papavizas, 1985). فاکتورهای رشدی در تمامی نهال‌هایی که تحت تأثیر مایه‌زنی با سویه‌های تریکودرما و قارچ *P. melonis* قرار گرفته بودند، به‌طور معناداری بیشتر از گیاهان شاهد بدون مایه‌زنی با عوامل فوق و یا *P. melonis* به تنهایی بود. تحقیقات پژوهشگران مختلف نشان داده است که کاربرد سویه‌های تریکودرما علاوه بر کنترل بیمارگرهای گیاهی، سبب افزایش قابل‌ملاحظهٔ حاصلخیزی خاک با مکانیسم‌هایی مختلف، افزایش رشد ریشه و اندام‌های هوایی، میزان محصول در واحد سطح، رشد سریع‌تر، افزایش سبزینهٔ گیاه، افزایش قابلیت

دسترسی و جذب عناصر غذایی در گیاه و فیتوهورمون‌های رشدی دارای منشأ قارچی و گیاهی می‌گردد. این امر ممکن است منجر به افزایش کارایی فتوسنتز در گیاهان شود. توانایی سویه‌های تریکودرما همچنین در تأثیرگذاری روی فاکتورهای رشدی و بازدارندگی بیمارگر متفاوت است (Chang *et al*., 1986 ; Yedidia *et al*., 2001 & 2006; Harman, 2000 ; Lindsey & Baker, 1967Harman *et al*., 2004; Lorito *et al*., 2010).

نتیجه‌گیری کلی

از نظر کلی نتایج بررسی کشت متقابل، ترشحات فرار و غیرفرار، تداخل فیزیکی ریسه‌ای و آزمایش‌های گلخانه‌ای حاکی از وجود برهم‌کنش بین عامل بیماری‌زا و سویه‌های تریکودرما با مکانیسم‌های متفاوتی همچون رقابت تغذیه‌ای، مایکوپارازیتیسم، سرعت رشد و اسپوردهی و تولید متابولیت‌های فرار و غیرفرار بازدارنده است. در این برهم‌کنش رشد رویشی P. melonis در سطوح مختلف تحت تأثیر قرار گرفت و در سطح معناداری کاهش یافت، که بسته به سویه متفاوت بود. تأثیر سویه‌های تریکودرما روی نهال‌های پستهٔ تولیدشده در نهالستان‌ها و استقرار آنها در شرایط طبیعی باغ‌ها با در نظر گرفتن شرایط فیزیکوشیمیایی و رطوبت خاک مفید به نظر می‌رسد.

REFERENCES

1. Ahmad, J. S. & Baker, R. (1987). Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 77,182–89.
2. Altomare, C., Norvell, W. A., Björkman, T. & Harman, G. E. (1999). Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Applied and Environmental Microbiology,* 65, (7), 2926-2933.
3. Banihashemi, Z. (1995). Identification of *Phytophthora* species associated with pistachio gummosis in Iran. *Acta Horticultural*, 419, 349–352.
4. Benítez, T., Rincón, A. M. Limón, M. C. & Codón, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7, 249-260.
5. Bissett, J. (1991). A revision of the genus *Trichoderma*. III. Section *Pachybasium*. *Canadian Journal of Botany*, 62, 2373-2417.
6. Cavalcante, R. S., Lima, H. L. S., Pinto, G. A. S., Gava, C. A. T. & Rodrigues, S. (2008). Effect of moisture on *Trichoderma* conidia production on corn and wheat bran by solid state fermentation. *Food Bioprocess Technology*, 1, 100–104.
7. Chang, Y-C., Chang, Y-C., Baker, R., Kleifeld, O. & Chet, I. (1986). Increased growth of plants in the presence of the biological control agent *Trichoderma harzianum*. *Plant Disease* 70, 145–148
8. Danielson, R. M. & Davey, C. B. (1973). Non nutritional factors affecting the growth of *Trichoderma* in culture. *Soil Biology Biochemistry,* 5, 495-504.
9. Davet, P. (1979). Techniques pour I'analy se des population de *Trichoderma* et de *Gliocladium virens* dans le sol. Annual *Review of* Phytopathology, 11, 529-33.
10. Dennis, C., & Webester, J. (1971a). Antagonistic properties of species-group of *Trichoderma*, I-Production of nonvolatile antibiotic. *Transaction British Mycology Society*, 57(27), 25-39.
11. Dennis, C., & Webester, J. (1971b). Antagonistic properties of species-group of *Trichoderma*, II-Production of volatile antibiotic. *Transaction British Mycology Society*, 57, 41-48.
12. Dickinson, J. M., Hanson, J. R. & Truneh, A. (1995). Metabolites of some biological control agents. *Pesticide Science*, 44, 389-393.
13. Etebarian, H. R., Scott, E. S. & Wicks, T. J. (2000). *Trichoderma harzianum* T39 & *T.virens* DAR 74290 as potential biological control agents for *Phytophthora erythroseptica*. *European Journal of Plant Pathology*, 106, 329-337.
14. Ghisalberti, E. L. & Sivasithamparam, K. (1991). Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology Biochemistry,* 23, 1011-1020.
15. Harman, G. E. (2000). Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease*, 84, 377–393
16. Harman, G.E.,Howell, C. R., Viterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species: opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Review of Microbiology*, 2, 43–56.
17. Harman, G. E. (2006). Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology,* 96, 190–194.
18. Howell, C. R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease,* 87(1), 4-10.

19. Hubbard, J. P., Harman, G. E. & Hadar, Y. (1983). Effect of soilbome *Pseudomonas* spp. on the biologicaI control agent, *Trichoderma hamatum*, on pea seeds. *Phytopathology,* 73, 655-59.
20. Hydari-Faroughi, S., Etebarian, H. & Zamanizadeh, H. (2005). Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of *Phytophthora* melonis in glasshouse. *Applied Entomology Phytopathology*, 72(2), 113-134.
21. Kim, D. J., Baek, J. M., Uribe, P., Kenerley, C. M. & Cook, D. R.(2002).Cloning and characterization of multiple glycosyl hydrolase genes from Trichoderma virens. *Current Genetics*, 40,374-384
22. Kelley, W. D. (1976). Evaluation of *Trichoderma harzianum*-impregnated clay granules as a biocontrol for *Phytophthora cinnamomi* causing damping-off of pine seedlings [Biological control, *Pinus echinata*]. *Phytopathology,* 66, 1023-1027.
23. Kredics, L., Dóczi, I., Antal, Z. & Manczinger L. (2001). Effect of heavy metals on growth and extracellular enzyme activities of mycoparasitic *Trichoderma* strains. *Bulletin of Environmental Contaminant*, 66(2), 249-54.
24. Lewis, J. A. & Papavizas, G. C. (1984). A new approach to stimulate population proliferation of *Trichoderma* species and other potential biocontrol fungi introduced into natural soils. *Phytopathology,* 74, 1240-44.
25. Lindsey, D. L. & Baker, R. (1967). Effect of certain fungi on dwarf tomatoes grown under gnotobiotic conditions. *Phytopathology,* 57(1), 262-1.
26. Lorito, M., Woo, S. L., Harman, G. E. & Monte, E. (2010). Translational research on *Trichoderma*: from omics to the field. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 395–417.
27. Lorito, M., Hayes, C. K., Di Pietro, A., Woo, S. L. & Haman, G. E. (1994). Purification, Characterization and synergistic activity of a Glucan 1,3- β -glucosidase and an Nacetyl-β -glucosaminidase from *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, 84, 398-405.
28. Mirabolfathy, M., Ershad, J. & Hejaroud, G. A. (1990). Study of pistachio gummosis in Rafsanjan area. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 26, 1-13.
29. Mirabolfathy, M., Cooke, D. E. L., Duncan, J. M., Williams, N. A., Ershad, J. & Alizadeh, A. (2001). *Phytophthora pistaciae* sp. nov. and *P. melonis* the principal causes of pistachio gummosis in Iran. *Mycological Research*, 105, 1166–1175.
30. Moradi, M. (1998). *Isolation and identification of Phytophthora species from root and crown of pistachio in Kerman and Fars provinces and resistance determination of root and crown among current pistachio cultivars*. M. Sc. dissertation, Faculty of Agriculture, Shiraz University, Iran. (In Farsi).
31. Moradi, M. & Masoomi, H. (2012). Crown and root rot of pistachio trees. *Iran Pistachio Association*, 70, 28-30.
32. Papavizas G. C. (1985). *Trichoderma* and *Gliocladium* biology and the potential for bio-control. *Annual Review of Phytophathology,*23, 23-77.
33. Parkinson, D., Taylor, G. S. & Pearson, R. (1963). Studies on fungi in the root region. The development of fungi on young roots. *Plant and Soil,* 19, 322-49.
34. Rifai, M. A. (1969). A revision of the genus *Trichoderma*. *Mycological Papers*, 116, 1-55.
35. Rouhani, H. (1995). Effects of soil conditions on population frequency and viability of antagonist fungus *Trichoderma*. *Journal of Iranian Agricultural Sciences,* 6(36), 1305-1316. (In Farsi).
36. Smith, V. L., Wilcox, W. F. & Harma G. E. (1991). Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology*, 80, 880-885.
37. Stamps, D. J., Waterhouse, G. M., Newhook, F. J. & Hall, G. S. (1990). Revised tabular key to the species of *Phytophthora* commonw. Common wealth Agricultural Bureau International Mycological Institute *Mycological Papers*, 162-28 pp.
38. Samuels, G. J., Chaverri, P., Farr, D. F., & McCray, E. B. (2013). Trichoderma *Online, systematic mycology and microbiology laboratory*, ARS, USDA. Retrieved Septamber 20, 2004, from *http*://nt.ars-grin.gov/*taxadescriptions*/*keys*/*TrichodermaIndex.cfm*.
39. Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L. & Lorito, M. (2008). *Trichoderma*–plant–pathogen interactions in soil agro-ecosystems. *Soil Biology Biochemistry,* 40,1–10.
40. Yedidia I., Benhamou, N. & Chet, I. (1999). Induction of defense responses in cucumber plants (Cucumis sativus L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Applied Environmental Microbiology,* 65, 1061–1070.
41. Yedidia, I., Srivastva, A. K, Kapulnik, y. & Chet, I. (2001). Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil*, 235-242.
42. Zafari, D. (1991). *Study of antagonistic effects of Trichoderma harzianum on Phytophthora erythroseptica and Colletotrichum coccodes isolated from potato*. M. Sc. dissertation. Faculty of Agriculture, Tehran University, Iran. (In Farsi).