مقاله تحقیقی

مهار زیستی بیماری پوسیدگی طوقه برنج با استفاده از برخی قارچ‌های آنتاگونیست

محمدرضا صفری مطلق[۱]، حکیمه روشنی[۲]

۱- گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، واحد رشت، دانشگاه آزاد اسلامی، رشت، ایران
۲- گروه گیاه‌پزشکی، موسسه آموزش عالی دیلمان، لاهیجان، ایران

مسئول مکاتبات: محمدرضا صفری مطلق، ایمیل: ssafarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۷/۱۰ ۸(۱) ۵۷-۷۲ تاریخ پذیرش: ۹۹/۱۰/۲۰

چکیده

بیماری پوسیدگی طوقه برنج با عامل *Fusarium fujikuroi* از بیماری‌های مهم برنج در دنیا و ایران می‌باشد که مدیریت تلفیقی آن با روش‌های مختلف اهمیت زیادی دارد. در این پژوهش به منظور دستیابی به جدایه‌های آنتاگونیست قارچی مناسب برای مهار زیستی این بیماری، اثر چهار جدایه از *Trichoderma* spp. و سه جدایه از *Aspergillus* spp.، روی قارچ بیمارگر *F. fujikuroi* با استفاده از روش‌های کشت متقابل، کشت روی اسلاید، متابولیت‌های فرّار و متابولیت‌های غیرفرّار در آزمایشگاه بررسی شد. نتایج تحقیق نشان داد که در کشت متقابل جدایه *T. harzianum* با ۸۱/۸۱ درصد موثرترین جدایه در مهار رشد میسلیومی بیمارگر بود. در روش متابولیت‌های فرار، جدایه‌های *T. harzianum* و *T. virens*، با ۷۳/۳۳ درصد مؤثرترین جدایه‌ها در مهار رشد میسلیومی *F. fujikuroi* بودند. در روش متابولیت‌های غیرفرّار، جدایه‌های *A. awamori*، *T. viride* و *T. koningi* بیشترین درصد مهار *F. fujikuroi* را از خود نشان دادند. در روش کشت روی اسلاید تمامی جدایه‌های متعلق به *Trichoderma* و *Aspergillus* در مهار بیمارگر موفق بودند. این جدایه‌های قارچی روی گیاه برنج در شرایط گلخانه مایه‌زنی شدند. تمامی قارچ‌های مایه‌زنی شده قادر به کاهش شدت بیماری در گیاهان تیمار شده بودند که جدایه‌های *T. harzianum* و *T. virens* به‌ترتیب با کاهش شدت بیماری به میزان ۸۳ و ۷۹ درصد مؤثرترین قارچ‌ها در بررسی‌های گلخانه‌ای بودند. همچنین به‌کارگیری همه جدایه-های مورد مطالعه در گلخانه موجب افزایش ارتفاع، وزن تر و وزن خشک اندام هوایی و ریشه در حضور قارچ عامل بیماری در مقایسه با شاهد بیمار گردید. نتایج تجزیه واریانس و مقایسه میانگین تیمارها تفاوت معنی‌دار قارچ‌های مورد استفاده در مطالعات گلخانه‌ای به جز در صفت وزن خشک را نشان داد. با توجه به نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های بیوکنترل در آزمایشگاه و گلخانه، جدایه‌های *T. harzianum*، *T. virens* و *T. viride* مؤثرترین آنتاگونیست‌ها در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج بودند.

واژه‌های کلیدی: برنج، پوسیدگی طوقه برنج، کنترل بیولوژیک، *Aspergillus* spp.، *Trichoderma* spp.

مقدمه

بیماری پوسیدگی طوقه برنج با عامل بیماری *Fusarium fujikuroi* Nirenberg یکی از مهم‌ترین بیماری‌های بذرزاد برنج می‌باشد (Sun & Snyder, 1981). اهمیت قارچ فوزاریوم در بخش کشاورزی باتوجه به ایجاد بیماری‌های گوناگون در اغلب گیاهان زراعی، باغی، جنگلی، زینتی و مراتع روز به روز بیشتر می‌شود (Jarvis & Shoemaker, 1987). عامل بیماری بیشتر به طوقه گیاه حمله می‌کند و علامت بارز آن قدکشیدگی غیرطبیعی گیاهان آلوده در خزانه یا مزرعه می‌باشد. گیاهچه‌های آلوده بلندتر از گیاهان سالم هستند و گیاهانی که به‌شدت آلوده شده‌اند ممکن است قبل و یا پس از نشاء بمیرند. پنجه‌زنی کاهش

یافته و برگ‌ها در مدت زمان کوتاهی از بین می‌روند. گیاهان بیمار دارای خوشه‌های پوک هستند (Singleton *et al.*, 1992). مطالعات نشان می‌دهند این بیماری در سطح وسیعی از نواحی برنج‌خیز دنیا نیز انتشار داشته و میزان خسارت آن در مناطق مختلف از ۷ تا ۲۰ درصد متغیر بوده است. قارچ قادر به آلوده کردن گیاهچه، از مرحله ابتدایی رشد می‌باشد و به‌طور سیستمیک در داخل گیاه رشد می‌کند، ولی معمولاً در قسمت‌های گل نفوذ نمی‌کند. چنانچه بذور جوانه‌زده کاشته شوند، تعداد زیادی از آن‌ها پوسیده و مقدار بیشتری از آن‌ها نیز آلوده می‌شوند و دلیل آن این است که جنین بذر در حال جوانه‌زدن حاوی مقدار بسیاری آمینواسیدها و مواد قندی بوده که مناسب برای رشد قارچ می‌باشد. هر چند بیماری عمدتاً بذرزاد بوده ولی خاکزی هم می‌تواند باشد (Vakili & Okkhovat, 1997).

برای مقابله با این بیماری روش‌های سنتی و شیمیایی کاربرد دارد. با توجه به این‌که روش‌های موجود برای مقابله با بیماری مثل روش‌های شیمیایی و روش‌های سنتی نارسایی‌هایی دارد به نظر می‌رسد باید به دنبال راه‌کار تازه‌ای برای مقابله با این بیماری بود که کنترل بیولوژیک با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست یکی از این روش‌ها محسوب می‌شود.

خاصیت آنتاگونیستی گونه‌های تریکودرما علیه گونه‌های مختلف فوزاریوم به کرات گزارش شده است (Khodaei *et al.*, 2012) جدایه‌های قارچی متعلق به جنس *Trichoderma* موجب کنترل بیماری‌های فوزاریومی شده و همچنین مکانیسم دفاعی گیاه را تقویت کرده و با ترشح آنزیم و هورمون باعث رشد و تقویت گیاه شده و در نهایت به حفظ تعادل اکولوژیکی کمک می‌کند (Akrami and Ibrahimev, 2010). گونه‌های مختلف تریکودرما از طریق مکانیسم‌های آنتاگونیستی مختلف مانند رقابت، مایکوپارازیتیسم و آنتی‌بیوز، توانایی در ایجاد تغییر در ریزوسفر، کارآیی تحریک رشد و القای مقاومت در گیاهان، رقابت بر سر مواد غذایی یا فضا، تحمل استرس محیطی، قارچ فوزاریوم را کنترل می‌کنند (Benitez *et al.*, 2004).

بر اساس مطالعات صورت گرفته، از میان ۶۵ جدایه قارچ تریکودرما جداسازی شده از ریزوسفر مزارع برنج، تعداد ۳۸ جدایه، بیش از ۴۵ درصد سبب بازدارندگی رشد قارچ *Fusarium fujikuroi* در آزمون کشت متقابل شدند. هم‌چنین ۱۲ جدایه تریکودرما علیه بیماری پوسیدگی طوقه برنج در شرایط گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند و شاخص‌های سرعت جوانه‌زنی، طول ساقه، طول ریشه و شدت بیماری اندازه‌گیری شدند. نتایج نشان داد که میزان بیماری در تیمارهای مایه‌زنی شده با جدایه‌های تریکودرما به‌میزان قابل‌توجهی کمتر از تیمارهای شاهد بود. از طرفی در شاخص ارتفاع گیاه، تفاوتی بین شاهد و تیمارها مشاهده نشد. علاوه بر این، میزان وزن خشک گیاه، در تیمار ها بیشتر از شاهد بود (Ng *et al.*, 2015).

قارچ *Aspergillus niger* توانایی بالایی در تولید متابولیت‌های ثانویه از قبیل اسیدهای آلی، پکتیناز، آلفا آمیلاز، گلوکزاکسیداز، گلوکوآمیلاز و پروتئین‌های نوترکیب دارد. این متابولیت‌های ثانویه ضدمیکروبی، می‌توانند آنتی‌بیوتیک‌های موثری در برابر بیماری‌های گیاهی باشند (Lopes, 2011). بر همین اساس در مطالعه‌ای در ارتباط با کنترل بیولوژیک بیماری بلاست برنج با استفاده از قارچ *A. niger* مشخص گردید که در آزمون کشت متقابل، پس از ۱۴ روز، قارچ مذکور به میزان ۸۱/۳۲ درصد مانع رشد قارچ عامل بیماری گردید. هم‌چنین نتایج نشان داد که فاکتورهای محیطی از قبیل pH و درجهٔ حرارت روی میزان تولید متابولیت‌های ثانویه اثر می‌گذارند، به‌طوری‌که ۵ =pH و درجهٔ حرارت بین ۲۱ تا ۲۹ درجهٔ سلسیوس، بهترین شرایط ممکن برای تولید متابولیت‌های ضدقارچی توسط *A. niger* است که می‌تواند حتی تا میزان ۱۰۰ درصد بیماری بلاست برنج را کنترل نماید (Idan *et al.*, 2017).

در مطالعهٔ دیگر اثر همزیستی قارچ *Piriformospora indica* بر واکنش گیاه برنج نسبت به بیماری پوسیدگی طوقه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که علائم بیماری پوسیدگی طوقه از قبیل ارتفاع غیرطبیعی گیاهان، زرد یا قهوه‌ای‌شدن و خشکیدگی برگ‌ها، وجود ریشک‌های نابه‌جا در گره‌های اول و دوم و پوکی در

گیاهانی که قبلا با قارچ *P. indica* پیش‌تیمار شده بودند، مشاهده نشد. هم‌چنین مقایسه میزان فعالیت برخی از آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان در پاسخ به بیماری پوسیدگی طوقه در بین گیاهانی که با قارچ *P. indica* پیش‌تیمار شده بودند و گیاهان شاهد نشان داد که سطوح فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و آسکوربات پراکسیداز در ریشه گیاهان پیش‌تیمار شده با این قارچ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت، اما تغییر در برگ‌ها معنی‌دار نبود. هم‌چنین فعالیت آنزیم کاتالاز افزایش معنی‌داری در برگ‌ها و ریشه‌های برنج دارای همزیست و آلوده به بیماری داشت (Hajipoor Bagheri *et al*., 2015).

ارزیابی برخی مخمرهای آنتاگونیست همچون *Metschnikowia pulcherrima*، *Pichia guilliermondii* و *Sporidiobolus pararoseus* در کنترل بیماری پوسیدگی طوقه برنج نشان داد که تیمار بذور برنج با *M. pulcherrima* و *P. guilliermondii* به‌طور معنی‌داری درجهٔ آلودگی ایجاد شده به‌وسیله بیمارگر در مقایسه با برخی قارچ‌کش‌ها را کاهش می‌دهد. هر سه مخمر توانستند شدت بیماری در گلخانه را نیز کاهش دهند (Matic *et al*., 2014). کنترل بیولوژیکی *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* در لوبیا با استفاده از جدایه‌هایی از *Trichoderma harzianum* نشان داد که این قارچ آنتاگونیست می‌تواند جوانه‌زنی بذور لوبیا را افزایش داده و نیز شدت بیماری را کاهش دهد (Carvalho *et al*., 2014). بررسی تأثیر سویه‌های تریکودرما جداشده از خاک‌های شور و سدیمی در کنترل بیماری فوزاریومی ریشه خیار نشان داد که سویه‌های تریکودرما باعث کاهش شدت بیماری و افزایش فاکتورهای رشدی شدند به‌طوری که سویه‌های *T. harzianum* T127–12 و *Trichoderma aureoviride* T189–4 بیشترین تاثیر را در کاهش شدت بیماری نسبت به گیاه شاهد داشتند (Asadi *et al*., 2019).

در بررسی مهار زیستی بیماری پوسیدگی طوقه برنج ناشی از *F. fujikuroi* با استفاده از برخی قارچ‌های اندوفیت کمترین میزان وقوع مرگ گیاهچه در نشاهای برنج تحت تیمار قارچ‌های اندوفیت *Chaetomium globosum*، *Penicillium* sp. و *Fusarium* sp. مشاهده شد و این جدایه‌ها شاخص رشدی گیاه در مقایسه با شاهد را نیز افزایش دادند (Ramesh *et al*., 2020).

در مطالعه‌ای مشخص شد که قارچ *Talaromyces* sp. علیه *Gibberella fujikuroi* دارای خاصیت آنتاگونیستی است (Kato *et al*., 2012). ریسه‌های قارچ *Talaromyces* sp. در اطراف ریسه قارچ بیمارگر رشد کرده و با نفوذ به داخل ریسه‌های آن مانع از رشد قارچ عامل بیماری شده است (Miyake *et al*., 2012). جدایه‌های *T. harzianum* و *T. virens* باعث کاهش بیماری پوسیدگی طوقه برنج در خاک سترون شدند و مشخص گردید که آغشتن بذر با آنتاگونیست‌ها قبل از آلوده‌سازی به یمارگر تاثیر معنی‌داری در کاهش آلودگی نسبت به به‌کارگیری آنتاگونیست‌ها بعد از آلوده‌سازی به بیمارگر داشته است (Padasht Dehkaee *et al*., 2004).

هدف از این تحقیق ارزیابی فعالیت قارچ‌هایی است که در فلور طبیعی گیاه برنج وجود دارند و در کنترل زیستی *F. fujikuroi* عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج در آزمایشگاه و گلخانه موثر هستند.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه، جداسازی، نگهداری و شناسایی جدایه‌های قارچی

نمونه‌برداری از خزانه‌ها و مزارع آلوده و از نشا، برگ، طوقه و خوشه برنج انجام گرفت. برای این منظور پس از جداسازی قطعات از حد فاصل بین بافت آلوده و سالم در اندام‌های گیاهی، ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۵٪ و شستشو با آب مقطر به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد و پس از آبگیری، قطعات به‌ترتیب روی محیط‌های کشت مختلفی شامل سیب‌زمینی، دکستروز، آگار (PDA) و آب–آگار (WA)، برای جداسازی و رشد پرگنه قارچ، خالص‌سازی و تک‌اسپور کردن و شناسایی مورفولوژیکی جدایه‌های قارچی قرار داده شدند. برای نگهداری جدایه‌های قارچی، از لوله‌های آزمایش مورب حاوی محیط کشت PDA استفاده شد. پس از جداسازی و خالص‌سازی قارچ‌ها،

شناسایی قارچ‌ها بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی انجام شد. برای این منظور خصوصیات ماکروسکوپی آنها همچون شکل و رنگ پرگنه و نحوه رشد روی محیط PDA مورد بررسی قرار گرفت. سپس خصوصیات میکروسکوپی آن‌ها هم‌چون نحوه رشد میسلیوم‌ها، منفرد یا گروهی بودن کنیدیوفورها، رنگ و ابعاد آنها، طول، عرض، تعداد دیواره‌های عرضی و رنگ کنیدیوم‌ها روی محیط کشت WA با تهیه اسلایدهای میکروسکوپی و با استفاده از کلیدهای مختلف شناسایی (Bissett, (1984، Gams & Bisset (1998) و de Hoog (2000) مورد بررسی قرار گرفت. سپس شناسایی مولکولی انجام شد. برای این کار، ابتدا استخراج DNA ژنومی براساس روش Zhong & Steffenson (2001) صورت گرفت. واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) با استفاده از جفت آغازگر ITS1/ITS4 برای تکثیر ناحیه ITS–rDNA توسط دستگاه ترموسایکلر انجام شد (White *et al.*, 1990). برنامه حرارتی PCR جهت تکثیر ناحیه ژنومی rDNA–ITS، بر اساس روش White *et al.* (1990) به‌کار رفت و الکتروفورز با استفاده از ژل آگارز ۱/۵ درصد انجام شد. محصولات تکثیر شده، برای خالص‌سازی و تعیین توالی نوکلئوتیدی به شرکت بایونیر در کره جنوبی فرستاده شدند. ارزیابی تشابه توالی‌های به‌دست آمده با توالی‌های موجود در بانک ژن (NCBI GenBank) با استفاده از ابزار جستجوی BLAST انجام شد و توالی‌ها با نرم‌افزار BankIt در بانک ژن ذخیره شدند.

مطالعات کنترل بیولوژیک

روش کشت متقابل

در این روش یک قرص میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر که از قسمت‌های حاشیه‌ای کشت پنج تا هفت روزه *F. fujikuroi* گرفته شده بود در زیر هود سترون درون یک تشتک پتری هشت سانتی‌متری حاوی PDA به فاصله دو سانتی‌متری از دیواره تشتک پتری قرار داده شد. این تشتک پتری به مدت ۴۸ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شد تا قارچ مورد نظر رشدش را آغاز نماید، سپس یک دیسک میسلیومی به قطر پنج میلی‌متر که از کناره‌های کشت ۷–۵ روزه قارچ‌های دیگر گرفته شده بود، در فاصله سه سانتی‌متری از قارچ بیماری‌زا قرار گرفت. تشتک‌های پتری در دمای ۲۶ درجه سلسیوس قرار داده شدند و اندازه‌گیری رشد میسلیومی قارچ بعد از هفت تا ۱۰ روز انجام گرفت. در تشتک های شاهد، یک دیسک میسلیومی از کناره‌های کشت ۷–۵ روزۀ *F. fujikuroi* در شرایط سترون در مرکز یک تشتک پتری هشت سانتی‌متری قرار گرفت. تشتک‌های پتری شاهد نیز در انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس نگهداری شدند. در پایان دوره انکوباسیون، رشد قطری *F. fujikuroi* در شاهد و تیمار اندازه‌گیری گردید. کاهش رشد قطری در مقایسه با شاهد بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهار رشد میسلیومی} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

C میزان رشد قطری *F. fujikuroi* در تشتک‌های پتری شاهد و T رشد قطری بیمارگر در حضور قارچ‌های مورد مطالعه است (Sivakumar *et al.*, 2000).

آزمون اثر متابولیت‌های فرار (گازی)

در این آزمون یک قرص پنج میلی‌متری از بیمارگر و هر کدام از جدایه‌های آنتاگونیست به‌کار رفته در این آزمایش روی محیط کشت PDA در مرکزتشتک پتری نه سانتیمتری به طور جداگانه کشت داده شدند. درب پتری‌ها در شرایط سترون برداشته شد و قسمت ته تشتک پتری که حاوی محیط کشت و پرگنه قارچ‌های بیمارگر و آنتاگونیست بود، روبه‌روی هم قرار داده شد و با پارافیلم دور آن‌ها پوشانده شد. در نمونه شاهد نیز روبه‌روی تشتک پتری حاوی قارچ *F. fujikuroi*، یک تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA بدون قارچ قرار داده شد. پس از چهار روز نگه‌داری در انکوباتور با دمای ۳۰ درجه سلسیوس، میزان رشد قطری قارچ‌ها در تشتک‌های پتری اندازه‌گیری و ثبت گردید (Khodaei *et al.*, 2012). میزان بازداری از رشد قارچ فوزاریوم توسط جدایه‌های قارچی مختلف مورد مطالعه به کمک معادله $I = [(C - T)/C] \times 100$ محاسبه

گردید که در آن I درصد بازدارندگی از رشد قطری فوزاریوم، C میزان رشد قطری فوزاریوم در شاهد و T میزان رشد قطری فوزاریوم در برابر آنتاگونیست بود.

آزمون اثر ترکیبات غیرفرار (عصاره)

ابتدا جدایه‌های آنتاگونیست به صورت چهار قرص پنج میلی‌متری در داخل ارلن‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر محیط کشت Potato Dextrose Broth (PDB) فاقد آنتی‌بیوتیک کشت و با نگهداری روی شیکر ۷۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ روز و عبور از کاغذ صافی میکروبیولوژی با قطر ۰/۴۵ میکرومتر عصاره‌گیری شدند (Araghi & Rahnama, 2008). سپس محیط‌های کشت PDA حاوی رقت ۲۵ درصد از عصاره فیلتر شده تهیه و آن‌گاه اقدام به کشت قرص‌های ۵ میلی‌متری از قارچ بیمارگر گردید. پس از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت اقدام به اندازه‌گیری قطر رشد پرگنه قارچ بیمارگر شد و درصد بازدارندگی از رشد محاسبه گردید (Sivakumar *et al.*, 2000).

روش کشت قارچ روی لام (اسلاید)

ابتدا در داخل هر تشتک پتری نه سانتی‌متری سترون یک لام سترون در وسط تشتک پتری قرار داده شد. سپس ۱۵ میلی‌متر محیط کشت آگار به آن اضافه شد به طوری که لایه‌ای نازک از آگار روی لام را بپوشاند. بعد از بستن محیط کشت در یک طرف تشتک پتری یک قرص پنج میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه *F. fujikuroi* و در طرف دیگر یک قرص پنج میلی‌متری از از حاشیه فعال پرگنه قارچ‌های آنتاگونیست، کشت داده شد. برای هر جدایه، سه تکرار در نظر گرفته شد. تشتک‌های پتری به انکوباتور با دمای ۲۶ درجه سلسیوس منتقل شد و بعد از ۴۸ تا ۷۲ ساعت که هیف‌های قارچ رشد کرده و روی لام به هم رسیدند، نحوهٔ تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست روی قارچ‌های عامل بیماری‌زا زیر میکروسکوپ بررسی شد و ساختمان ریسه‌هایی که به لام چسبیده بودند مورد مطالعه قرار گرفت (Abdollahzadeh *et al.*, 2006).

مطالعات گلخانه‌ای

بذور رقم هاشمی به مدت یک ساعت در کلراکس ۳۰ درصد ضدعفونی گردید و سپس با آب مقطر سترون شست‌وشو داده شد. ۲۷ عدد گلدان پلاستیکی با دهانه ۱۱ سانتی‌متری، از خاک مزرعه برنج پر شد. تعداد ۱۰ عدد بذر داخل هرگلدان کاشته شد و گلدان‌ها آبیاری شدند و داخل گلخانه قرار داده شدند. درجهٔ حرارت گلخانه در زمان رشد و نمو گیاهچه‌ها بین ۳۴–۲۷ درجه سلسیوس در روز و ۲۰–۱۷ درجه سلسیوس در شب و رطوبت نسبی بین ۱۰۰–۸۰٪ درصد در نوسان بود (Safari Motlagh *et al.*, 2005). در این مدت آبیاری به صورت معمول انجام می‌گرفت، به طوری که گلدان‌ها، به‌طور دائم حالت غرقابی داشتند. پس از ۲۵ روز که برگ‌ها به مرحله چهار برگی رسیدند مایه‌زنی قارچ‌ها روی آنها انجام شد. بدین‌ترتیب که ابتدا روی همه نشاها به وسیله افشانه‌های دستی، آب مقطر سترون پاشیده شد، سپس سوسپانسیون اسپور لازم برای تلقیح فراهم گردید و روی نشاها پاشیده شد. برای تهیه سوسپانسیون از مجموع اسپور و میسلیوم به عنوان مایه تلقیح استفاده گردید. برای شمارش اسپور و میسلیوم‌ها از لام گلبول‌شمار استفاده شد. برای مایه‌زنی *F. fujikuroi*، از سوسپانسیونی شامل ۴×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر سترون و برای آنتاگونیست‌ها از سوسپانسیونی شامل $۲/۵\times۱۰^{۵}$ اسپور در میلی‌لیتر آب مقطر سترون استفاده شد، علاوه بر آن افزایش جذب سطحی با استفاده از توئین ۲۰ انجام شد که به نسبت ۱ درصد به کار رفت.

این آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی با هفت تیمار و سه تکرار انجام شد. به ازای هر قارچ آنتاگونیست یک مجموعه گلدان در نظر گرفته شدند. در هر مجموعه یک سری گیاهان شاهد وجود داشت که فقط با آب مقطر مایه‌زنی شدند و دارای سه تکرار بودند. سری دیگر شامل گیاهان شاهد مایه‌زنی شده با *F. fujikuroi*، با سه تکرار بود و یک سری گیاهان مایه‌زنی شده با *F. fujikuroi* و آنتاگونیست مورد نظر با سه تکرار نیز در نظر گرفته شد. لازم به ذکر است که پس از مایه‌زنی با آب مقطر

سترون، ابتدا مایه‌زنی با بیمارگر و سپس بلافاصله با قارچ‌های آنتاگونیست انجام شد.

قبل از شروع اسپورپاشی، گیاهچه‌های هر قسمت به وسیله پلاستیک شفاف از بقیه گلدان‌ها مجزا شدند. بعد از اسپورپاشی نیز روی گلدان‌ها به وسیله کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شد و با گونی‌های کنفی که به طور مداوم به وسیله شیلنگ متصل به شیر آب خیس می‌شدند، رطوبت نسبی بالاتر از ۹۵ درصد نگه داشته شد. شرایط محیطی پس از مایه‌زنی مانند شرایط قبل از آن بود. تغییرات ایجاد شده روی گیاهان به صورت روزانه به مدت ۱۰ روز مورد بررسی قرار گرفت. پس از گذشت مدت زمان معین و ظهور علائم، این علائم مورد بررسی قرار گرفت و بیمارگرهای جدا شده در این مرحله با بیمارگر اولیه مطابقت داده شد. پس از تایید از مقیاس Horsfall & Barratt (1945)، برای اندازه‌گیری شدت بیماری استفاده شد. اساس اندازه‌گیری مبتنی بر مشاهدات بصری از علائم ایجاد شده بود و توصیف علائم و درجه‌بندی بدین ترتیب انجام گرفت: درجهٔ ۱: برگ سالم بود و هیچ‌گونه علائمی نداشت، درجهٔ ۲: تعداد لکه‌ها ۱–۱۰ و برگ سالم، درجهٔ ۳: تعداد لکه‌ها ۱۰–۲۵، لکه‌ها بسیار ریز و توسعه نیافته و برگ بسیار مقاوم، درجهٔ ۴: تعداد لکه‌ها ۲۵–۴۰، لکه‌ها تا حدودی توسعه‌یافته و برگ مقاوم، درجهٔ ۵: تعداد لکه‌ها ۴۰–۶۰، لکه‌ها متوسط و توسعه‌یافته و برگ با مقاومت متوسط، درجهٔ ۶: تعداد لکه‌ها ۶۰– ۸۰، لکه‌ها متوسط و توسعه‌یافته، برگ با مقاومت کم و دارای سوختگی‌های جزئی، درجهٔ ۷: تعداد لکه‌ها ۸۰–۱۰۰، لکه‌ها متوسط تا بزرگ و توسعه‌یافته، برگ حساس و دارای سوختگی‌های جزئی و گاهی سوختگی‌های وسیع، درجهٔ ۸: تعداد لکه‌ها ۱۰۰–۱۵۰، لکه‌ها بزرگ و توسعه‌یافته و گاهی سوختگی‌های وسیع، درجهٔ ۹: تعداد لکه‌ها ۱۵۰–۲۰۰، برگ دارای ضایعه‌ها و سوختگی‌های وسیع فراوان و یا کاملاً سوخته و مرده. سپس میزان شدت (درجه) بیماری با استفاده از رابطه $\frac{[(N_1\times1)+(N_2\times2)+\cdots(N_t\times t)]}{N_1+N_2+\cdots N_t}$= درجهٔ بیماری (Disease rating) محاسبه شد که N تعداد برگ در هر یک از درجات بیماری بود (Bertrand & Gottwald, 1997). پس از محاسبه شدت بیماری، ارتفاع بوته‌های برنج توسط خط‌کش اندازه‌گیری شد و به منظور اندازه‌گیری وزن تر، بوته‌های برنج همراه با ریشه‌ها از خاک گلدان‌ها خارج شدند و به‌وسیله ترازوی آزمایشگاهی توزین شدند. سپس هرکدام از بوته‌ها به‌طور جداگانه و به‌مدت پنج ساعت در آون در دمای ۸۰–۹۰ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از خروج از آون، هر یک از بوته‌ها توزین شدند و این وزن به‌عنوان وزن خشک ثبت گردید.

تجزیه و تحلیل داده‌ها

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. تجزیه واریانس بر اساس طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده‌ها به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) انجام پذیرفت.

نتایج

ارزیابی وضعیت تاکسونومیکی جدایه‌های قارچی بر اساس صفات مورفولوژیکی و مولکولی

پس از شناسایی مقدماتی از مجموع ۵۷ جدایه قارچی به‌دست آمده در سطح جنس، تعداد ۱۵ جدایه قارچی که در آزمایش بیماری‌زایی در برنج بیماری ایجاد نکردند برای مطالعات بیماری‌زایی و مطالعات کنترل بیولوژیک در آزمایشگاه انتخاب و از میان این جدایه‌ها، هفت جدایه برای مطالعات گلخانه‌ای انتخاب شدند و مورد ارزیابی بیشتر و شناسایی در سطح گونه با استفاده از روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی قرار گرفتند. بر این اساس هفت گونه قارچی شناسایی شدند که عبارت بودند از: *Aspergillus fumigatus* Fres.، *Trichoderma koningii* Oudem، *Aspergillus japonicus* Satio، *Trichoderma harzianum* Rifai، *Trichoderma* Pres.، *Trichoderma virens* (J. Miller, Giddens & foster) و *Aspergillus awamori* Nakaz.

مطالعات بیماری‌زایی

همه جدایه‌های قارچی پس از شناسایی مقدماتی در حد جنس، برای مطالعات بیماریزایی مورد استفاده قرارگرفتند و بیماریزایی جدایه‌های *F. fujikuroi* در گیاه

برنج اثبات گردید. از میان جدایه‌های قارچی که مربوط به قارچ‌های دیگر بودند، هفت جدایه که بیماری‌زا نبودند یا شدت بیماری‌های ایجاد شده توسط آن‌ها روی برنج بسیار ناچیز بود برای مطالعات کنترل بیولوژیک انتخاب شدند. لازم به ذکر است که بیماری‌زایی قارچ‌های شناسایی شده طبق اصول کخ به اثبات رسید و بیمارگرهای جدا شده در این مرحله با بیمارگرهای اولیه مطابقت داده شد و یکسان بودن آنها به اثبات رسید.

مطالعات کنترل زیستی

آزمون کشت متقابل

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس بین تیمارهای مورد مطالعه، از نظر درصد مهار رشد میسلیومی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود نداشت. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیومی به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، جدایه‌های *T. viride* و *T. harzianum* بیشترین درصد مهار *F. fujikuroi* را از خود نشان دادند و با بقیه قارچ‌ها به جز *T. koningi* و *A. fumigatus* اختلاف معنی‌داری نداشتند. کمترین درصد مهار رشد نیز در جدایه *A. fumigatus* مشاهده گردید که با *T. viride* و *T. harzianum* اختلاف معنی‌داری داشت اما با بقیه تیمارهای اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۱).

آزمون اثر متابولیت‌های فرار

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس بین تیمارهای مورد مطالعه، از نظر درصد مهار رشد میسلیومی، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪ وجود نداشت. بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیومی به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD)، جدایه‌های *T. harzianum* و *T. virens* که بیشترین درصد مهار رشد میسلیومی *F. fujikuroi* را از خود نشان دادند با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند اما با سایر جدایه‌ها در سطح آماری ۱ درصد اختلاف معنی‌دار داشتند. کمترین درصد مهار به ترتیب متعلق به جدایه‌های *A. awamori*، *T. koningii* و *A. japonicas* بود که این سه جدایه با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند، اما با سایر جدایه‌ها در سطح آماری ۱ درصد اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول۲).

جدول ۱– مقایسه میانگین مهار رشد میسلیومی جدایه‌های *Fusarium fujikuroi* به‌وسیله قارچ‌های مورد مورد مطالعه در روش کشت متقابل

Table 1. The mean comparison of mycelium growth inhibition of *Fusarium fujikuroi* isolates by the studied fungi in dual culture method

Treatments	Growth inhibition (%)± SE
T. viride	82.14 ± 0.33 a
T. harzianum	81.81 ± 0.35 a
T. virens	72.72 ± 0.37 ab
A. japonicus	76.00 ± 0.42 ab
A. awamori	70.00 ± 0.45 ab
T. koningi	68.51 ± 0.39 b
A. fumigatus	65.38± 0.39 b

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) نیستند

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at $P\leq0.05$

آزمون متابولیت‌های غیر فرار گازی

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس از نظر درصد مهار

رشد میسلیومی بین تیمارهای مورد مطالعه، اختلاف معنی
داری در سطح احتمال ۱٪ وجود نداشت.

جدول ۲– مقایسه میانگین مهار رشد میسلیومی جدایه‌های *Fusarium fujikuroi* به‌وسیله قارچ‌های مورد مورد مطالعه در روش متابولیت‌های فرار

Table 2. The mean comparison of mycelium growth inhibition of *Fusarium fujikuroi* isolates by the studied fungi in volatile metabolites method

Treatments	Growth inhibition (%)± SE
T. viride	68.00 ± 0.35 b
T. harzianum	73.33 ± 0.35 a
T. virens	73.33 ± 0.37 a
A. japonicus	66.66 ± 0.41 c
A. awamori	58.33 ± 0.46 c
T. koningi	58.90 ± 0.39 c
A. fumigatus	72.60 ± 0.31 b

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) نیستند

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at $P\leq0.05$

جدول ۳– مقایسه میانگین مهار رشد میسلیومی جدایه‌های *Fusarium fujikuroi* به‌وسیله قارچ‌های مورد مورد مطالعه در روش متابولیت‌های غیرفرار

Table 3. The mean comparison of mycelium growth inhibition of *Fusarium fujikuroi* isolates by the studied fungi in non–volatile metabolites method

Treatments	Growth inhibition (%)± SE
T. viride	47.36 ± 0.33 ab
T. harzianum	29.83 ± 0.35 cd
T. virens	29.82 ± 0.31 d
A. japonicus	41.88 ± 0.31 bc
A. awamori	63.63 ± 0.45 a
T. koningi	46.42 ± 0.38 ab
A. fumigatus	37.50 ± 0.31 bc

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) نیستند

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at $P\leq0.05$

بر اساس نتایج حاصل از مقایسه میانگین درصد مهار رشد میسلیومی به روش حداقل اختلاف معنی دار(LSD)، جدایه *A. awamori* بیشترین درصد مهار *F. fujikuroi* را نشان داد و با جدایه‌های *T. viride* و *T. koningi* اختلاف معنی‌داری نداشت اما با سایر جدایه‌ها در سطح آماری ۱ درصد اختلاف معنی‌داری داشت.کمترین درصد مهار مربوط به جدایه *T. virens* بود که با جدایه *T. harziaum* اختلاف معنی‌داری نداشت، اما با سایر جدایه‌ها اختلاف معنی‌داری نشان داد (جدول ۳).

روش کشت قارچ روی لام (اسلاید)

در این روش ساختمان ریسه‌هایی که به لام چسپیده بودند در زیر میکروسکوپ مورد مطالعه قرار گرفت. در ارزیابی خواص آنتاگونیستی *T. harzianum* علیه *F. fujikuroi*، ریسه‌های *T. harzianum* به ریسه‌های بیمارگر رسیدند و گاهی قادر به نفوذ به ریسه شدند. در ارزیابی خواص آنتاگونیستی *T. viride* علیه *F. fujikuroi*، مشاهده گردید که ریسه‌های *T. viride* به میسلیوم بیمارگر رسیدند و

آن‌را قطع کردند. اما باعث بدشکلی نشدند و گاهی قادر به نفوذ ریسه‌های آن شدند. در بررسی خواص *T. virens* شاهد بودیم که ریسه‌های *T. virens* به ریسه‌های قارچ *F. fujikuroi* رسیدند و آن را قطع کردند اما باعث بدشکلی نشدند. در ارزیابی خواص آنتاگونیستی *T. koningii*، ریسه‌های *T. koningii* کاملا روی سطح ریسه‌های بیمارگر را پوشانده و باعث پارازیته شدن عامل بیماری شدند. در ارزیابی خواص آنتاگونیستی *A. japonicus*، ایجاد گره و پیچ‌خوردگی در دو نقطه بین ریسه‌های قارچ آنتاگونیست و قارچ عامل بیماری مشاهده گردید که در یک نقطه پیچیدگی شدید بود و باعث قطع شدن ریسه‌های عامل بیماری در بعضی نقاط گردید. در ارزیابی خواص آنتاگونیستی *A. awamori*، ریسه‌های قارچ آنتاگونیست به سمت ریسه‌های قارچ عامل بیماری پیشروی نمودند و به صورت مارپیچ بر روی ریسه‌های آن حرکت نموده و در برخی نقاط قلاب‌هایی تشکیل دادند که می‌تواند دلیل بر پارازیته شدن قارچ عامل بیماری باشد. در ارزیابی خواص آنتاگونیستی *A. fumigatus* علیه *F. fujikuroi*، ریسه‌های قارچ آنتاگونیست کاملاً روی سطح بیمارگر را پوشاندند به طوری که قادر به تولید اسپور نبودند.

مطالعات گلخانه‌ای

در گیاهان برنج شاهدی که با آب مقطر سترون مایه‌زنی شده بودند، هیچ‌گونه علائمی مبنی بر بروز بیماری مشاهده نشد. در روزهای اولیه مایه‌زنی قارچ عامل بیماری، علائم از روز چهارم ظاهر شد برگ‌ها کم‌کم حالت کشیده و نازک و رنگ پریده پیدا کردند و در روز ششم در قسمت طوقه علائم پوسیدگی‌نمایان شد. پس از گذشت ۱۰ روز علائم بیماری کاملاً آشکار شد، برگ‌ها زرد شدند و نکروز و در قسمت‌هایی کلروز مشاهده شد و همچنین در قسمت طوقه، پوسیدگی تقریباً شدید بود. میانگین شدت بیماری در این گیاهان ۷/۹ بود. در گیاهانی که با *T. harzianum* و *F. fujikuroi* به‌طور همزمان مایه‌زنی شده بودند اولین علائم شش روز پس از مایه‌زنی به‌صورت لکه‌های سیاه روی طوقه ظاهر شد و به‌تدریج روی برگ نقاط آبسوخته‌ای مشاهده گردید. میانگین شدت بیماری در این حالت ۱/۴۰ بود و بنابراین *T. harzianum*، ۸۳ درصد شدت بیماری را کاهش داد. در گیاهانی که با *T. viride* و *F. fujikuroi* به‌طور همزمان مایه‌زنی شده بودند اولین علائم شش روز پس از مایه‌زنی به‌صورت لکه‌های سیاه روی طوقه ظاهر شد و به‌تدریج لکه‌ها روی برگ به‌صورت نقاط آبسوخته و خشک مشاهده گردید. میانگین شدت بیماری در این حالت ۱/۹۰ بود و بنابراین *T. viride*، ۷۷ درصد شدت بیماری را کاهش داد. در گیاهانی که با *T. virens* و *F. fujikuroi* به‌طور همزمان مایه‌زنی شده بودند اولین علائم شش روز پس از مایه‌زنی به‌صورت لکه‌های سیاه روی طوقه ظاهر شد و به‌تدریج لکه‌ها روی برگ به‌صورت نقاط آبسوخته مشاهده گردید. میانگین شدت بیماری در این حالت ۱/۷۰ بود بنابراین *T. virens*، ۷۹ درصد شدت بیماری را کاهش داد. در گیاهانی که با *T. koningii* و *F. fujikuroi* به‌طور همزمان مایه‌زنی شده بودند اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی به‌صورت لکه‌های قهوه‌ای روی طوقه ظاهر شد و به‌تدریج لکه‌ها روی برگ به‌صورت لکه‌های زرد مشاهده شدند و در انتها با خشک شدن نوک برگ‌ها و در چند بوته خشک شدن طوقه همراه گردید. میانگین شدت بیماری دراین حالت ۱/۹۶ بود و بنابراین این جدایه قارچی ۷۴ درصد شدت بیماری را کاهش داد. در گیاهانی که با *A. awamori* و بیمارگر به‌طور همزمان مایه‌زنی شده بودند اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی به‌صورت لکه‌های قهوه‌ای روی طوقه ظاهر شد و به‌تدریج لکه‌ها روی برگ به‌صورت لکه‌های زرد و در انتها با خشک شدن نوک برگ‌ها و در چند بوته خشک شدن طوقه همراه گردید. میانگین شدت بیماری در این حالت ۳/۰۴ بود و بنابراین *A. awamori*، ۴۰ درصد شدت بیماری را کاهش داد. در گیاهان مایه‌زنی شده با *A. fumigatus* و *F. fujikuroi* اولین علائم چهار روز پس از مایه‌زنی به‌صورت لکه‌های قهوه‌ای روشن روی طوقه ظاهر و به‌تدریج لکه‌های زرد در حاشیه برگ‌ها مشاهده گردید و در نهایت نوک برگ‌ها زرد و نکروزه شدند و این حالت نکروزه به طوقه هم سرایت کرد. میانگین شدت بیماری در این حالت ۲/۲۶ بود و بنابراین *A.*

fumigatus، ۳۹/۷۱ درصد شدت بیماری را کاهش داد. در گیاهانی که با *A. japonicus* و *F. fujikuroi* به‌طور همزمان مایه‌زنی شده بودند اولین علائم سه روز پس از مایه‌زنی ابتدا به‌صورت نقاط قهوه‌ای تیره روی طوقه ظاهر شد و به‌تدریج لکه‌های قهوه‌ای مایل به زرد در وسط برگ مشاهده گردید. این لکه‌ها در مرحله بعد نکروزه شده و در نهایت بخش‌هایی از طوقه نکروزه شد. میانگین شدت بیماری در این حالت ۲/۶۶ بود و در نتیجه این جدایه قارچی، ۶۱ درصد شدت بیماری را کاهش داد.

بر اساس نتایج حاصل از تجزیه واریانس در شرایط گلخانه، بین تیمارهای مختلف از نظر صفات شدت بیماری، وزن تر بدون ریشه، وزن تر با ریشه و ارتفاع بوته، اختلاف معنی‌داری در سطح احتمال ۵ درصد مشاهده گردید، در حالی که از نظر صفات وزن خشک با ریشه و بدون ریشه، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت. کمترین شدت بیماری مربوط متعلق به تیمار *T. harzianum* بود و این قارچ با *T. virens* اختلاف معنی‌داری نداشت، اما با سایر قارچ‌های مورد استفاده در این آزمایش اختلاف معنی‌داری داشت. بیشترین شدت بیماری متعلق به تیمار *A. awamori* بود که با سایر تیمارهای مورد آزمایش در سطح آماری ۵ درصد اختلاف معنی‌داری داشت (جدول۴).

بیشترین ارتفاع بوته در بین تیمارهای مورد بررسی متعلق به تیمار با *T. viride* بود که به جز تیمار با *T. koningi* با سایر تیمارها در سطح آماری ۵ درصد اختلاف معنی‌داری داشت. کمترین ارتفاع بوته متعلق به تیمار *A. fumigatus* بود که به جز تیمار با *A. japonicus* با سایر تیمارهای مورد آزمایش در سطح آماری ۵ درصد اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۴).

بیشترین وزن تر با ریشه در بین تیمارهای مورد آزمایش متعلق به دو جدایه *T. harzianum* و *T. viride* بود که با هم اختلاف معنی‌داری نداشتند اما با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نشان دادند.

کمترین وزن تر با ریشه متعلق به تیمار *A. japonicus* بود که با سایر تیمارهای مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری داشت (جدول۴).

بیشترین وزن تر بدون ریشه در تیمارهای *T. harzianum* و *T. viride* مشاهده شد که با سایر تیمارهای مورد آزمایش در اختلاف معنی‌دار داشتند و کمترین وزن تر بدون ریشه متعلق به تیمار با *A. japonicus* بود که با سایر تیمارهای مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری داشت (جدول ۴).

بیشترین وزن خشک با ریشه در تیمار با *T. harzianum* مشاهده شد که به جز با تیمار *T. viride* باسایر تیمارهای مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین وزن خشک با ریشه متعلق به تیمار *A. japonicus*، بود که با سایر تیمارهای مورد آزمایش به جز تیمار *T. harzianum* با سایر تیمارها اختلاف معنی‌داری نداشت (جدول ۴).

بیشترین وزن خشک بدون ریشه در تیمار با *T. harzianum* مشاهده شد که به جز با تیمار *T. viride* باسایر تیمارهای مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری داشت و کمترین وزن خشک بدون ریشه متعلق به تیمارهای *T. koningii*، *A. japonicus*، *T. virens* و *A. fumigatus* بود که با سایر تیمارهای مورد آزمایش اختلاف معنی‌داری داشتند اما با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند (جدول ۴)

بحث

پتانسیل گونه‌های تریکودرما به عنوان عامل بیوکنترل بیماری‌های گیاهی، نخستین بار قبل از ۱۹۳۰ کشف شد (Weindling, 1932). گونه‌های مختلف تریکودرما که قارچ‌های ساپروفیت متداول هستند و در اغلب خاک‌ها و میکروفلور ریزوسفر یافت می‌شوند، به خاطر توانایی‌شان در کاهش بروز بیماری‌های ایجاد شده به وسیله قارچ‌های بیماریزای گیاهی به‌عنوان عوامل بیوکنترل شناخته شده‌اند (Papavizas, 1985). اگرچه بعضی از آن‌ها ممکن است گاهی به عنوان پاتوژن‌های گیاهی ثبت شده باشند (Menzies, 1993).

در پژوهش حاضر قارچ‌های آنتاگونیست در سه روش کشت متقابل، متابولیت‌های فرار و متابولیت‌های غیرفرار باعث کاهش و جلوگیری از رشد قارچ بیماری‌زای *F.*

fujikuroi شدند. میزان بازدارندگی رشد میسلیوم قارچ‌ها در سه روش به‌کار رفته در این پژوهش یکسان نبود.

در روش کشت متقابل، *A. fumigatus* با ۶۵/۳۸ درصد و *T. viride* با ۸۲/۱۴ درصد به‌ترتیب حداقل و حداکثر بازدارندگی را داشتند.

جدول ۴– مقایسه میانگین شدت بیماری، ارتفاع بوته، وزن تر، وزن خشک (با ریشه و بدون ریشه) به روش حداقل اختلاف معنی‌دار (LSD) در شرایط گلخانه

Table 4. Comparison of mean of disease rating, plant height, fresh and dry weight (with root and without root) under greenhouse conditions

Treatments	Disease rating ± SE	Height (cm) ± SE	Fresh weight with root (g) ± SE	Dry weight with root (g) ± SE	Fresh weight without root (g) ± SE	Dry weight without root (g) ± SE
T. harzianum	1.40 ± 0.08 e	71.33 ± 0.55 b	17.66 ± 0.02 a	2.66 ± 0.01 a	17.60 ± 0.02 a	1.83 ± 0.01 a
T. viride	1.90 ± 0.06 d	74.66 ± 0.41 a	17.33 ± 0.01 a	2.30 ± 0.01 ab	17.29 ± 0.01 a	1.66 ± 0.01 ab
T. virens	1.70 ± 0.08 de	70.00 ± 0.30 bc	15.00 ± 0. 03 b	1.83 ± 0.02 b	14.20 ± 0. 03 b	1.16 ± 0.02 bc
T. koningi	1.96 ± 0.08 cd	72.66 ± 0.37a b	14.33 ± 0. 03 b	1.83 ± 0.03 b	14.30 ± 0. 03 b	1.16 ± 0.02 bc
A. awamori	3.04 ± 0.05 b	68.50 ± 0.37 cd	14.66 ± 0.03 b	1.84 ± 0.02 b	14.30 ± 0.03 b	1.16 ± 0.02 bc
A. japonicus	2.66 ± 0.04 c	65.66 ± 0. 35 de	11.66 ± 0.03 c	1.61 ± 0.02 b	11.40 ± 0.03 c	1.16 ± 0.02 bc
A. fumigatus	2.26 ± 0.03 c	65.00 ± 0.35 e	14.66 ± 0. 04 b	1.90 ± 0.03 b	14.50 ± 0. 04 b	1.17 ± 0.02 bc
Fusarium (control)	7.90 ± 0.03 a	60.66 ± 0.35 f	9.33. ± 0. 04 d	1.06 ± 0.03 bc	9.20. ± 0. 04 d	1.00 ± 0.03 c
Distilled water (control)	1.00 ± 0.00 f	75.00 ± 0.33 a	18.00 ± 0.04 a	2.00 ± 0.00 ab	16.00 ± 0.03 a	1.50 ± 0.00 ab

تیمارهای با حداقل یک حرف مشترک دارای اختلاف معنی‌دار ($P\leq0.05$) نیستند

Treatments having at least one similar letter do not show a significant difference at $P\leq0.05$

در روش متابولیت‌های فرار *A. awamori* با ۳۳/۵۸ درصد و *T. harzianum* و *T. virens* با ۳۳/۷۳ درصد، به ترتیب حداقل و حداکثر بازدارندگی را نشان دادند. در آزمون متابولیت‌های غیرفرار *T. virens* با ۲۹/۸۲ درصد و *A. awamori* با ۶۳/۶۳ درصد به ترتیب حداقل و حداکثر بازدارندگی را داشتند.

در بررسی میکروسکوپی ناحیه تقابل جدایه‌های آنتاگونیست با *F. fujikuroi* مشاهده گردید که ریسه‌های جدایه‌های آنتاگونیست به سمت ریسه قارچ بیمارگر دارای کشش و تروپیسم مثبت هستند که این کشش را می‌توان به وجود مواد شیمیایی در دیواره ریسه قارچ بیمارگر نسبت داد. مکانیسم پارازیتیسم تریکودرما پیچیده است که شامل تروپیسم شیمیایی، تشخیص لکتین موجود در دیواره سلولی بیمارگر و تشکیل آپرسوریوم، اندام‌های نفوذی و حلقه‌های به دام اندازنده بیمارگر است. همان طوری‌که چنین نتایجی در تحقیقات قبل ذکر شده است (Amirsadeghi *et al*., 1992; Radwan *et al*., 2006).

پیچش هیف تریکودرما به دور هیف گونه‌های فوزاریوم باعث لیز شدن، دفرمه شدن و توقف رشد هیف فوزاریوم می‌شود. قارچ تریکودرما مکانیزم دفاعی گیاه را تحریک کرده و با ترشح آنزیم و هورمون باعث رشد و تقویت گیاه شده و با محدود کردن بیماری به حفظ تعادل اکولوژیکی نیز کمک می‌کند و در نهایت موجب کنترل بیماری‌های فوزاریومی می‌شود (Akrami and Ibrahimev,

2010; Peyghami, 1991). نتایج این تحقیقات در مورد تاثیر گونه‌های تریکودرما با تحقیق حاضر هم‌سو بود.

Radwan *et al.* (2006) گزارش کردند که توانایی تریکودرما در کاهش بیماری به خاطر خاصیت آنتاگونیستی تریکودرما، تخریب میسلیوم قارچ‌های بیماری‌زا در خاک و یا رقابت برای منابع کربنی و آهن در ریزوسفراست. مکانیزم‌های دیگری هم مانند القای مقاومت درگیاهان تیمار شده با تریکودرما گزارش شده است (Howell, 2003).

همان‌طور که در پژوهش حاضر در روش کشت متقابل جدایه‌های *T. harzianum*، *T. viride* و *T. virens* ازموثرترین جدایه‌ها در مهار رشد میسلیومی *F. fujikuroi* بودند، تحقیقات دیگر (Akrami and Ibrahimev, 2010) نیز نشان داد که گونه‌ها و جدایه‌های مختلف تریکودرما دارای قدرت رقابتی ساپروفیتی مناسبی در برابر *F. moniliforme* بوده و از این طریق از رشد کلنی آن جلوگیری کرده و شروع به اسپورزایی روی هیف‌ها نموده و مانع از تشکیل اسکلروت‌های این قارچ می‌شوند.

جدایه *A. awamori* در شرایط آزمایشگاهی و در روش متابولیت‌های غیرفرار به میزان قابل‌توجهی رشد میسلیومی بیمارگر را مهارکرد (۶۳/۶۳٪) ولی در بررسی‌های گلخانه‌ای به میزان ۴۰ درصد شدت بیماری ایجاد شده به‌وسیله *F. fujikuroi* را مهار نمود علت عدم موفقیت مورد انتظار این جدایه در کنترل بیماری در شرایط گلخانه‌ای دلایل مختلفی می‌تواند داشته باشد از جمله این‌که در گلخانه امکان تنظیم و کنترل شرایط محیطی به میزانی که در آزمایشگاه در دسترس است مقدور نیست. همچنین ممکن است میزان اسپورهای موجود در سوسپانسیون اسپور مورد استفاده برای اسپورپاشی گیاه برنج در شرایط گلخانه‌ای به میزان کافی نبوده باشد. ممکن است با استفاده از سوسپانسیون اسپوری با غلظت بیشتر، نتایج بهتری حاصل گردد. ثابت شده است که پارامترهای محیطی غیرزنده مانند نوع خاک، دمای خاک، پتانسیل آب و نیز پارامترهای محیطی زنده مانند گونه‌های گیاهی، تنوع و فعالیت میکروبی خاک علاوه بر فاکتورهای دیگر مانند روش و زمان استفاده از عوامل آنتاگونیست ممکن است روی کارآیی آنها موثر باشد.

در پژوهش حاضر *T. harzianum* با بالاترین میزان مهار رشد میسلیومی یعنی ۷۳/۷۳ درصد موثرترین جدایه در روش متابولیت‌های فرار بود و در بررسی‌های میکروسکوپی ریسه‌های این جدایه باعث قطع ریسه‌های بیمارگر شدند. همچنین این جدایه در شرایط گلخانه باعث کاهش شدت بیماری به میزان ۸۲/۲۷ درصد شد. این امر با یافته‌های محققان دیگر که بیان نمود جدایه‌های *T. harzianum* به‌طور قابل‌توجهی رشد میسلیومی بیمارگر بلاست را در شرایط آزمایشگاه در کشت متقابل، فرار و گلخانه مهار کرد، مطابقت داشت (Padasht Dehkaee, 2001).

جدایه‌های *T. virens* در دو آزمون کشت متقابل و متابولیت‌های فرار توانستند رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری را به‌طور موثری مهار کنند و همچنین در شرایط گلخانه‌ای نیز به میزان قابل‌توجهی شدت بیماری پوسیدگی طوقه برنج را کاهش دادند که این امر با یافته‌های Akrami & Ibrahimov (2010) که تاثیر جدایه‌های *T. virens* روی *Fusarium* sp. را بررسی نمودند، هم‌خوانی داشت. این محققان نشان دادند که در روش‌های کشت متقابل و متابولیت‌های فرار، محیط کشت به سرعت توسط جدایه‌های تریکودرما کلونیزه شده و تولید مواد فرار توسط این جدایه‌ها نیز نتایج امیدوارکننده‌ای در مهار رشد میسلیومی عامل بیماری‌زا نشان داد.

جدایه‌های *T. koningii* در کشت متقابل به میزان قابل‌توجهی رشد میسلیومی قارچ بیماری‌زا را مهار کرد و در شرایط گلخانه نیز باعث کاهش شدت بیماری پوسیدگی طوقه برنج شد. در پژوهشی دیگر در مورد کنترل بیولوژیکی بیماری شیت بلایت برنج، مطالعات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نشانگر تاثیر *T. koningii*، در کنترل رشد بیمارگر و کاهش شدت بیماری بود (de Melo & Faull, 2000). نتایج این تحقیق با نتایج تحقیق حاضر در مورد موثر بودن این گونه تریکودرما به عنوان یک عامل بیوکنترل بالقوه مطابقت داشت.

جدایه‌های *A. fumigatus* در روش‌های کشت متقابل و متابولیت‌های فرار به خوبی توانستند رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری‌زا را مهار کنند و همچنین در شرایط گلخانه نیز به میزان قابل توجهی شدت بیماری پوسیدگی طوقه در گیاه برنج را کاهش دادند. این امر با مطالعه Manimegalai *et al*. (2011) روی کنترل بیولوژیک *B. oryzae* عامل بیماری لکه قهوه‌ای برنج مطابقت داشت. این محققان دریافتند که قارچ آنتاگونیست *A. fumigatus*، در روش‌های کشت متقابل، متابولیت‌های فرار و شرایط گلخانه به طور موثری رشد بیمارگر را کاهش می‌دهد.

جدایه‌های *T. viride* که در کشت متقابل به میزان قابل توجهی رشد میسلیومی قارچ عامل بیماری‌زا را مهار کرده بود، در شرایط گلخانه نیز عملکرد خوبی داشت و باعث کاهش شدت بیماری در گیاه برنج شد. این امر با یافته‌های (Niknejad Kazempour *et al*., 2002) که بیان نمودند جدایه‌های *T. viride* و *T. virens*، در کشت متقابل و شرایط گلخانه، باعث کاهش شدت بیماری سوختگی غلاف برنج شد، مطابقت داشت. تمامی جدایه‌های قارچی به‌کار رفته در مطالعه حاضر منجر به بهبود صفات رویشی مورد مطالعه یعنی ارتفاع، وزن تر و وزن خشک گیاه در مقایسه با شاهد بیمار شدند. هم‌چنان‌که پوسیدگی طوقه و خشک شدن برگ‌ها منجر به کاهش عملکرد گیاه خواهد شد بهبود صفات رویشی می‌تواند در افزایش کمیت و کیفیت محصول هم موثر باشد که این موضوع با مطالعه (Hajipoor Bagheri *et al*., 2015) مطابقت داشت. این محققان دریافتند که تیمار با قارچ آنتاگونیست با بهبود صفات رویشی منجر به افزایش عملکرد می‌شود به طوری‌که در این تیمارها پوک شدن دانه‌های خوشه مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری کلی

در شرایط آزمایشگاهی و در کشت متقابل، جدایه‌های *T. harzianum* و *T. viride*، در روش متابولیت‌های فرار، جدایه‌های *T. harzianum* و *T. virens* و در متابولیت‌های غیرفرار *A. awamori*، موثرترین قارچ‌ها در مهار رشد میسلیومی عامل بیماری پوسیدگی طوقه برنج بودند. در شرایط گلخانه موثرترین قارچ در کاهش شدت بیماری پوسیدگی طوقه برنج، *T. harzianum* بود. با توجه به نتایج به‌دست آمده در این تحقیق، تمامی جدایه‌های مورد استفاده تاثیر آنتاگونیستی خوبی علیه *F. fujikuroi* نشان دادند که این امر می‌تواند نویدبخش جایگزینی قارچ‌های آنتاگونیست به‌عنوان یک راه‌کار مناسب برای کنترل این بیماری مهم قارچی برنج باشد.

سپاسگزاری

بدینوسیله از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد رشت در فراهم نمودن شرایط لازم برای انجام این تحقیق سپاسگزاری می‌کنیم.

References

Abdollahzadeh, J., Mohammadi Golpteh, A. & Rouhani, H. 2006. Investigation of biocontrol of crown and root rot of sunflower (*Sclerotinia sclerotiorum*) by *Trichoderma* species in laboratory condition. Journal of Agricultural Science, 12(1): 43–55. (In Persian with English summary).

Akrami, M. & Ibrahimev, M. 2010. Evaluation of different combination of *Trichoderma* species for controlling *Fusarium* rot of chickpea. Journal of Crop Ecophysiology, 4(2): 75–84. (In Persian with English summary).

Amirsadeghi, S., Sharifi Tehrani, A. & Hedjaroud, G.A. 1992. Effects of several fungicides and antagonist fungi (*Trichoderma* spp.) on eggplant sclerotinia (*S. sclerotiorum*). M. Sc. thesis, University of Tehran, Iran. (In Persian with English summary)

Araghi, M.M., & Rahnama, K. 2008. Evaluation of biological control of *Fusarium graminearum* by two antagonist fungi *Trichoderma virens* and *Trichoderma harzianum in vitro*. Pajouhesh–Va–Sazandegi, 81: 197–199. (In Persian with English summary)

Asadi, F., Alaei, H., Saberi Riseh, R. & Zeynadini Riseh, A. 2019. The effect of beneficial Trichoderma species isolated from sodic and saline soils to control Fusarium root rot of cucumber (*Fusarium solani*). Biocontrol in Plant Protection. 6(2): 43–55. (In Persian with English summary)

Benitez, T., Rincon, A.M., Limon, M.C. & Codon, A.C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, 7: 249–260.

Bertrand, P.F. & Gottwald, T.R. 1997. Evaluation of fungicides for pecan disease control. pp. 179–181. In: Hickey, K.D., (ed). Methods for Evaluating Pesticides for Control of Plant Pathogens. Oxford and IHB Publisher, Calcatte, India.

Bissett, J. 1984. A revision of the genus *Trichoderma*. I. Section Longibrachiatum sec. nov. Canadian Journal of Botany, 62(5): 924–931.

Carvalho, D.D.C., Junior, M.L., Martins, I, Inglis, P.W. & Mello, S.C.M. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. Tropical Plant Pathology, 39(5): 384–391.

de Hoog, G.S., Guarro, J., Gene, J. & Figueras, M.J. 2000. Atlas of clinical fungi. 2nd edition. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht.

de Melo, I.S. & Faull, J.L. 2000. Parasitism of *Rhizoctonia solani* by strains of *Trichoderma* spp. Scientia Agricola, 57 (1): doi.org/10.1590/S0103–90162000000100010.

Gams, W. & Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. pp. 3–34. In: Kubicek, C.P., Harman, G.E., (eds), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Taxonomy and Genetics, Taylor and Francis Ltd., London. Basic Biology, 1.

Hajipoor Bagheri, A., Sohani, M.M., Hassani, S.H., Babaiezad, V. & Alavi, S.M. 2015. Symbiotic effect of endophytic fungus *Piriformospora indica* with rice (*Oryza sativa*) on resistance against Bakanae disease. Cereal Research, 5(3): 219–230. (In Persian with English summary).

Horsfall, J.G. & Barratt, R.W. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. Phytopathology, 35: 655.

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: 4–10.

Idan, A.A., Sijam, K., Kadir, J., Rashid, T.S., Alwa, H. K. & Alsultan, W. 2017. Biological control of *Pyriculariaoryzae* using antifungal compounds produced by *Aspergillus niger*. American Journal of Plant Sciences, 8: 2445–2460.

Javris, W.R. & Shoemaker, R.A. 1978. Taxonomic status of *Fusarium oxysporum* causing foot and root of tomato. Phytopathology, 68: 1679–1680.

Kato, A., Taiji, M., Kana, N., Hideaki, T. & Tuhru, T. 2012. Visualize interactions between the Bakanae disease pathogen *Gibberella fujikuroi* and the agent *Talaromyces* sp. KNB–422. Journal of General Plant Pathology, 78(1): 54–61.

Khodaei, A., Arzanlou, M. & Babai Ahari, A. 2012. Inhibitory effects of three *Trichoderma* species against three species of *Fusarium* in laboratory conditions. Journal of Agricultural Science and Sustainable production, 22(4.1): 105–115. (In Persian with English summary).

Lopes, F.C. 2011. Production of Proteolytic Enzymes by a Keratin–Degrading *Aspergillus niger*. Enzyme Research, 2011, 1–9.

Manimegalai, V., Ambikapathy, V. & Panneerselvam, A. 2011. Biological control of paddy brown spot caused by *Bipolaris oryzae*. European Journal of Experimental Biology, 1(4): 24 –28.

Matićb, S., Spadaro, D., Garibaldia, A. & Gullino, M.L. 2014. Antagonistic yeasts and thermotherapy as seed treatments to control *Fusarium fujikuroi* on rice. Biological Control, 73: 59–67.

Menzies, J.G. 1993.Astrainof *Trichoderma viride* pathogenic to germinating seedlings of cucumber, pepper and tomato. Plant Pathology, 42:784–791.

Miyake. T., Kato, A., Tateishi, H. & Arie, T. 2012. Mode of action of *Talaromyces* sp. KNB422, A biocontrol agent against rice seedling diseases. Journal of Pesticide Science, 37(1): 56–61.

Ng, L.C., Ngadin, A., Azhari, M. & Zahari, N.A. 2015. Potential of *Trichoderma* spp. as biological control agents against bakanae pathogen (*Fusarium fujikuoi*) in rice. Asian journal of Plant Pathology, 9(2): 46–58.

Niknejad Kazempour, M., Pedramfar, H. & Ellahinia, A. 2002. Evaluation of the effect of several fungicides and antagonist fungi against *Rhizoctonia solani* Kuhn, the causal agent of rice sheath blight disease. Water and Soil Science (Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources), 6(4): 151–158. (In Persian with English summary).

Padasht Dehkaee, F. 2001. Final report on the identification of biological factors controlling rice blast disease. Iran Rice Research Institute.

Padasht Dehkaee, F., Mansouri Jahaee, Sh. & Rouhani, H. 2004. The effect of antagonistic microorganisms of Guilan paddy soils on rice crown rot disease. Journal of Agricultural Science and Technology and Natural Resources, 8(1): 213–221. (In Persian with English summary).

Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium* biology, ecology and the potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology, 23: 23–77.

Peyghami, E. 1991. Investigation of the possibility of biological control of Fusarium wilt in cucumber by *Trichoderma harzianum*. Journal of Agricultural Science, 27(2): 37–45. (In Persian with English summary).

Radwan, M.B., Fadel, A.M. & Mohammad, I.A.M. 2006. Biological control of *Sclerotium rolfsii* by using indigenous *Trichoderma* spp. isolates from Palestine. Hebron University Research Journal, 2(2): 27–47.

Ramesh, N.K. Naeimi, S., Rezaee, S. & Fotouhifar, K.B. 2020. Biological control of rice Bakanae disease caused by *Fusarium fujikuroi* using some endophytic fungi. Entomology and Phytopathology, 87(2): 281–296. (In Persian with English summary).

Safari Motlagh, M.R., Padasht Dehkaee, F. & Hedjaroud, G.A. 2005. Rice brown spot disease and evaluation of the response of some rice cultivars to it. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 9(2): 171–182. (In Persian with English summary).

Singleton, L., Mmihail, J.D. & Rush, C.M. 1992. Methods for research on soil borne phytopathogenic. Fungi APS Press, USA. 265 pp.

Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R.S., Wijesundera, R.L.C., Marikar, F.M.T. & Abeyesekere, M. 2000. Antagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of rambutan (*Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica, 28(3): 240–247.

Sun, S.K. & Snyder, W.C. 1981.The Bakanae disease of the rice plant. pp. 104–113. In: Nelson, P.E., Toussoun, T.A. & Cook, R.J. (eds). *Fusarium* disease, biology and taxonomy, The Pennsylvania State University press, University Park, London.

Vakili, D. & Okkhovat, M. 1997. Rice, planting, holding and harvesting, Farabi Publications, Tehran. (In Persian with English summary).

Weindling, R. 1932. *Trichoderma lignorum*as a parasite of other fungi. Phytopathology, 22: 837–845.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J.V. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. pp. 315–322. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. & White, T.J. (eds.), PCR Protocols: A guide to methods and applications, Academic Press, New York.

Zhong, S. & Steffenson, B.J. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology, 91(5): 469–476.

Biological control of rice foot rot disease using some antagonistic fungi

Mohammad Reza Safari Motlagh[1], Hakimeh Roshani[2]

1. Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Rasht Branch, Islamic Azad University, Rasht, Iran
2. Department of Plant Protection, Deylaman Institute for High Education, Lahijan, Iran

Corresponding author: Mohammad Reza Safari Motlagh, email: ssafarimotlagh@yahoo.com; safarimotlagh@iaurasht.ac.ir

Received: Oct., 01, 2020 8(1) 57-72 Accepted: Jan., 09, 2021

Abstract

Rice foot rot disease caused by *Fusarium fujikuroi*, is one of the most important rice diseases in the world and in Iran. Integrated management with different methods is very important for the disease. In this research, to find appropriate fungal antagonistic isolates for the biological control of foot rot, the effect of four isolates of *Trichoderma* spp. and three isolates of *Aspergillus* spp. were studied on *F. fujikuroi in vitro* using dual culture, slide culture, volatile metabolites and non–volatile metabolites. The results of research showed that *T. harzianum* isolate with 81.81% was the most effective isolate in suppressing the mycelium growth of *F. fujikuroi*. In the volatile metabolites method, *T. harzianum* and *T. virens* isolates were the most effective with 73.33% in suppressing the mycelium growth of the pathogen. In the non–volatile metabolites method, *A. awamori*, *T. viride* and *T. koningi* isolates showed the highest percentage of *F. fujikuroi* inhibition. In the slide culture method, all isolates of *Trichoderma* spp. and *Aspergillus* spp. proved to be effective in inhibition of the mycelia of *F. fujikuroi*. These fungal isolates were inoculated on the rice plant under greenhouse conditions. All inoculated fungi were able to reduce the severity of the disease in the treated plants. The isolates of *T. harzianum* and *T. virens* were the most effective fungi in reducing the disease by reducing the severity by 83% and 79%, respectively. Also, application of all the studied fungi in the greenhouse increased the height, fresh weight and dry weight of shoots and roots in the presence of pathogen compared to the control plants (without pathogen). Analysis of variance and comparison of the mean of the treatments showed a significant difference between the fungi except in the dry weight trait. According to the results obtained from biocontrol studies in laboratory and greenhouse, *T. harzianum*, *T. virens* and *T. viride* isolates were the most effective antagonists in controlling rice foot rot disease.

Keywords: *Aspergillus* spp., bakanae, biological control, rice, *Trichoderma* spp.