کنترل بیولوژیکی قارچ *Sclerotium cepivorum* عامل بیماری پوسیدگی سفید سیر با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست *Trichoderma* و *Talaromyces* در شرایط آزمایشگاه و گلخانه

رازک مهدی‌زاده نراقی[۱]، اصغر حیدری[۲]، حمیدرضا زمانی زاده[۱]، سعید رضایی[۱] و جعفر نیکان[۳]

۱- گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

۲- بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، موسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور

۳- بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی همدان

مسئول مکاتبات: رازک مهدی‌زاده، پست الکترونیک: mahdizadehnaraghi2007@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۰۷/۲۸ ۲ (۲) ۱۳-۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۹/۵

چکیده

یکی از گسترده‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های قارچی سیر بیماری پوسیدگی سفید با عامل *Sclerotium cepivorum* است که هر ساله خسارات فراوانی به کشت و تولید این محصول مهم در کشور و از جمله استان همدان وارد می‌سازد. در حال حاضر رایج‌ترین روش کنترل بیماری استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی می‌باشد که آلوده کننده‌ی محیط زیست بوده، هزینه‌ی زیادی در بر داشته و به‌دلیل استفاده‌ی مکرر و خاکزاد بودن عامل بیماری تأثیر چندانی در کنترل بیماری ندارد. بنابراین پژوهش حاضر با هدف کنترل عامل بیماری پوسیدگی سفید سیر با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست *Trichoderma* و *Talaromyces* به‌روش زیستی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه انجام یافت. برای این منظور ده جدایه از قارچ‌های آنتاگونیست فوق انتخاب شده و تأثیر آن‌ها ابتدا در شرایط آزمایشگاه با استفاده از روش‌های کشت متقابل، ترکیبات فرار، و ترکیبات غیر فرار بر قارچ عامل بیماری بررسی گردید. بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که شش جدایه که شامل دو جدایه از هر گونه‌ی قارچ آنتاگونیست بودند به‌طور معنی‌داری رشد قارچ عامل بیماری را کاهش دادند. در مرحله‌ی بعد فرمولاسیون‌هایی با استفاده از شش جدایه‌ی فوق در بستر سبوس برنج تهیه گردیده و تأثیر آن‌ها در شرایط گلخانه روی کنترل بیماری پوسیدگی سفید سیر ارزیابی شد. طرح آزمایشی کاملاً تصادفی و آزمایش دارای نه تیمار (شش فرمولاسیون زیستی، قارچ‌کش کاربندازیم، شاهد آلوده، شاهد سالم) و چهار تکرار بود. نتایج آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد که بین تیمارها و شاهد آلوده از لحاظ درصد وقوع بیماری و شدت بروز آلودگی اختلاف معنی‌دار وجود داشت. بیشینه میانگین آلودگی در تیمار شاهد آلوده به‌میزان ۵۳/۸۲٪ و کمینه میانگین آلودگی به‌ترتیب در تیمار شاهد سالم به‌میزان (۹/۲۴ ٪)، قارچ‌کش (۱۱/۲۳ ٪)، تیمار RBTh1 (۱۱/۳۳٪)، تیمار RBTa2 (۱۱/۳۷٪)، تیمار RBTh2 (۱۱/۴۲٪) مشاهده‌شد. نتایج کلی این پژوهش نشان می‌دهد که امکان کنترل بیماری مهم پوسیدگی سفید سیر با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست وجود دارد.

واژه‌های کلیدی: بیماری پوسیدگی سفید سیر، سبوس برنج، سیر، فرمولاسیون، کنترل زیستی

مقدمه

سیر با نام علمی *Allium sativum* L. متعلق به تیره‌ی *Alliaceae* می‌باشد که قرابت نزدیکی با *A. longicuspis* L. دارد. تحقیقات نشان داده است روغن این گیاه در از بین بردن حشرات مضری همچون شته‌ها سودمند بوده و دارای خواص مهم غذایی، داروئی و حاوی ترکیبات آروماتیک می‌باشد (Keller, 2005).

متوسط عملکرد کشت سیر در جهان ۱۲/۳۵ تن در هکتار است. بیشترین سطح زیر کشت و تولید به‌ترتیب به کشورهای چین، هند، کره‌ی‌جنوبی، آمریکا، فدراسیون روسیه، اسپانیا، اوکراین و آرژانتین تعلق دارد. ایران با تولید سالانه بیش از صد هزار تن سیر، رتبه‌ی سیزدهم تولید این محصول در جهان را به خود اختصاص داده است. آمار سطح زیر کشت سیر در ایران ۱۲۰۰۰-۸۰۰۰ هکتار با

میانگین ۹-۶ تن در هکتار برآورد می‌شود. استان همدان در تولید سیر رتبه‌ی اول کشور را دارد (Mahdizadehnaraghi *et al*., 2007). سطح زیرکشت سیر در این استان در سال ۱۳۹۱ به بیش از ۳۲۰۰ هکتار افزایش یافته و بیش از ۴۰ هزار تن سیر از مزارع برداشت شد ه است (Anon, 2011).

یکی از گسترده‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های قارچی گیاه سیر در ایران بیماری پوسیدگی سفید سیر (Allium white rot) می‌باشد که هر ساله باعث وارد شدن خسارات کمی و کیفی فراوان به کشت و تولید این محصول مهم می‌گردد (Mahdizadehnaraghi *et al*., 2007). این بیماری علاوه بر گیاه سیر در تعداد زیادی از گیاهان جنس *Allium* مانند *A. cepa* L.; *A. porrum* L.; *A. ascalonicum* L. (پیاز، تره فرنگی و موسیر) گزارش شده است (McLean, 2001).

عامل بیماری قارچ *Sclerotium cepivorum* (Berk) نام دارد. سختینه‌ها ساختار جنسی قارچ به‌شمار می‌آیند. سختینه‌ها سیاه رنگ، کروی و به‌صورت ریسه‌های به‌هم فشرده با دیواره‌ی ضخیم و صاف می‌باشند که توسط ۵-۲ سلول احاطه شده‌اند. علایم بیماری عمدتاً از اواسط دوره‌ی رشد تا زمان برداشت قابل رویت بوده و ابتدا به‌صورت زردی در برگ‌های مسن نمایان می‌شود. با پیشرفت بیماری علایم نهایی به شکل پوسیدگی سفید ساقه گسترش می‌یابد که در نهایت باعث عدم تشکیل غده‌ی سیر گشته و عملکرد محصول را به‌طور چشم‌گیری کاهش می‌دهد (Davis *et al*., 2007). براساس مطالعات انجام شده در ایران بیماری پوسیدگی سفید حتی گاهی باعث خسارت صددرصد به محصول سیر می‌شود (Beheshti *et al*., 2011). در سال‌های ۱۳۹۰-۱۳۸۷ این بیماری در مزارع استان زنجان ۶۵ درصد خسارت به دنبال داشته است (Saremi *et al*., 2010). اگرچه در بسیاری از کشورها استفاده از ترکیبات شیمیایی قارچ‌کش سیستمیک مانند Dicarboximides, Iprodione, Vinclozolin, Tebuconazole, Triadimenol جهت کنترل بیماری پوسیدگی سفید به‌صورت تیمار بذور و یا محلول‌پاشی روی بافت برگی و قاعده ساقه توصیه شده، اما از طرفی باعث از بین رفتن سایر میکروارگانیسم‌های داخل خاک می‌شود (McLean, 2001). مطالعات نشان داده است که هرچه قدرت جوانه‌زنی و نرخ رشد میسلیوم‌های قارچ *Sclerotium cepivorum* بالا باشد میزان حساسیت به قارچ‌کش‌هایی مانند Procymidone کمتر است (Ricardo *et al*., 2000).

استفاده‌ی بی‌رویه و فراوان از سموم شیمیایی در کشاورزی در مبارزه با بیماری‌های گیاهی محصولات مختلف کشاورزی در سال‌های اخیر انتقادات زیادی را به‌دنبال داشته است. سموم شیمیایی از لحاظ بهداشتی زیان‌بار بوده و تأثیرات منفی بر موجودات غیر هدف از جمله انسان دارند. بنابراین جستجو جهت یافتن روش‌های غیر شیمیایی و سازگار با محیط زیست اجتناب ناپذیر می‌باشد. کنترل زیستی می‌تواند یکی از مناسب‌ترین روش‌ها محسوب گردد. روش‌های کنترل زیستی برای محیط زیست بی‌خطر بوده، تأثیرات منفی بر محیط زیست و موجودات غیر هدف نداشته و هزینه‌ی چندانی نیز در بر ندارد (Kakvan *et al.,* 2013; Heydari & Naraghi, 2014). در سال‌های اخیر پژوهش‌های زیادی با استفاده از قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست در ارتباط با کنترل بیماری‌های مختلف گیاهی انجام شده است (Kakvan *et al.,* 2013; Naraghi *et al.,* 2013; Heydari & Naraghi, 2014; Samavat *et al.,* 2014).

در زمینه‌ی کنترل زیستی قارچ *Sclerotium cepivorum* نیز پژوهش‌هایی در سایر کشورها صورت گرفته است. *Trichoderma harzianum* از بهترین آنتاگونیست‌ها شناخته شده است که پتانسیل بالایی در کنترل بیماری‌های خاک‌زاد دارد (Sikora *et al.,* 1993). کاربرد دو گونه‌ی *T. longibrachiatum* (T3, T10) و *Trichoderma asperellum* (T1, T11) در کنترل زیستی *Sclerotium cepivorum* بسیار مؤثر بوده است (Francisco *et al*., 2011). در پژوهش‌های انجام شده در سال‌های اخیر بیماری پژمردگی ورتیسلیومی در محصولات پنبه، خیار گلخانه‌ای، سیب‌زمینی، گوجه‌فرنگی و نیز بیماری پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه‌ی چغندر قند با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست *Talaromyces* و *Trichoderma* به‌طور مؤثری

کنترل گردیده است (Kakvan *et al*., 2013; Naraghi *et al*., 2013).

در مورد بیماری پوسیدگی سفید سیر نیز تحقیقات اندکی در زمینه‌ی کنترل زیستی در خارج از کشور انجام شده است. به‌عنوان مثال گونه‌هایی از قارچ آنتاگونیست تریکودرما علیه این قارچ مورد استفاده قرارگرفته‌است (McLean, 2001). همچنین در پژوهشی دیگر نشان داده شد که جدایه‌هایی از قارچ آنتاگونیست *T. viride* نقش مؤثری در کاهش فعالیت عامل بیماری مذکور در خاک داشت (Clarkson *et al*., 2002).

باتوجه به اهمیت محصول سیر و خسارت اقتصادی بیماری پوسیدگی سفید روی این محصول در ایران و به‌ویژه در استان همدان، و با در نظر گرفتن محدودیت‌های روش‌های شیمیایی در کنترل این بیماری و نیز لزوم جستجو جهت معرفی یک روش غیر شیمیایی و سازگار با محیط‌زیست، این پژوهش با هدف بررسی تأثیر فرمولاسیون‌های زیستی در مهار و کنترل بیماری پوسیدگی سفید سیر اجرا شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری و جداسازی عامل بیماری‌زا

طی بازدید به‌عمل‌آمده از مزارع سیر استان همدان در اردیبهشت ماه سال ۱۳۹۲، بوته‌های سیر مشکوک به علایم بیماری پوسیدگی سفید سیر جمع‌آوری و جهت بررسی در پاکت‌های کاغذی به تعداد ۱۳ عدد به آزمایشگاه انتقال داده شدند. نمونه‌ها تا زمان جداسازی عامل بیماری در یخچال نگهداری شدند.

به‌منظور جداسازی قارچ بیمارگر از نمونه‌های گیاهی، تعیین مشخصات پرگنه (ریسه‌ها و سختینه) و نرخ رشد، از محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار Potato Dextrose Agar (Merck, Germany) استفاده شد. برای جداسازی عامل بیمارگر ابتدا نمونه‌ها با آب شیر شستشوی سطحی شده و بعد توسط اسکالپل سترون از حد فاصل بافت آلوده و سالم قطعاتی در حدود یک در یک سانتی‌متر جدا شده و جهت ضدعفونی در محلول هیپوکلریت سدیم یک و نیم درصد به‌مدت یک الی دو دقیقه قرار داده شدند. سپس سه مرتبه و هر بار یک دقیقه در آب مقطر سترون شستشو شدند. بعد از خشک شدن روی کاغذ صافی سترون، نمونه‌ها به محیط کشت PDA در داخل تشتک‌های سترون در اتاقک کشت انتقال داده و در دمای ۲±۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد داخل انکوباتور نگهداری شدند (Saremi *et al*., 2010).

پس از رشد کامل قارچ در محیط PDA، شناسایی قارچ توسط ویژگی‌های پرگنه، تولید سختینه، شکل آن‌ها و نحوه‌ی رشد ریسه‌ها در محیط PDA و با استفاده از کلید Barnett & Hunter (1998) شناسایی انجام گرفت.

آزمون بیماری‌زایی و انتخاب جدایه برتر بیماری‌زا

از بین جدایه‌های به‌دست آمده آزمون بیماری‌زایی با سه تکرار جهت سنجش و تشخیص جدایه‌ی برتر بیماری‌زا صورت گرفت. در این روش بذور سیر بعد از ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم دو درصد به‌مدت ۳۰ تا ۶۰ ثانیه، در گلدان‌هایی حاوی دو کیلوگرم خاک الک شده‌ی مزارع سیر که سه مرتبه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه و با فواصل زمانی ۲۴ ساعت سترون شده بود برای پنج جدایه با سه تکرار کاشته شدند (Mahdizadehnaraghi *et al*., 2007).

در هر گلدان پنج دیسک یک سانتی‌متری از محیط PDA حاوی سختینه در اطراف بذرهای سیر در داخل خاک قرار داده شد. علایم بیماری بسته به‌شدت بیماری‌زایی سویه‌ها ظاهر شد و سویه‌ای که بالاترین شدت بیماری‌زایی را با استفاده از شاخص Entwistle (1990) نشان داد انتخاب گردید. با رعایت اصول کخ عامل بیماری‌زا مجدداً از بافت‌های دارای علایم بیماری جداسازی شد (Bakonyi *et al*., 2011).

میزان بیماری با استفاده از معادله درصد وقوع بیماری=تعداد گیاهان آلوده به بیماری پوسیدگی سفید در هر تیمار تقسیم بر تعداد کل گیاهان در هر تیمار ضربدر ۱۰۰ محاسبه شد (Leta & Selvaraj, 2013). شدت بیماری بر اساس سیستم نمره دهی Entwistle (1990) تعیین گردید.

تهیه و آماده‌سازی قارچ‌های آنتاگونیست

جهت انجام پژوهش تعداد ده جدایه شامل چهار جدایه *Trichoderma harzianum*، چهار جدایه *Talaromyces flavus* از آزمایشگاه تحقیقات میکروارگانیسم‌های مفید موسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور و دو جدایه *Trichoderma asperellum* از آزمایشگاه قارچ شناسی دانشگاه بوعلی سینای همدان که شرح آن‌ها در جدول یک آمده است تهیه گردید.

جدول ۱- مشخصات جدایه‌های قارچی آنتاگونیست مورد استفاده.

Table 1- Characteristic of antagonistic fungal isolates used.

Isolate Identity	Isolate Code	Isolation Host	Isolation Location
T. harzianum (T. h- 9)	Th1	Garlic	Hamedan Province
T. harzianum (T.h-93)	Th2	Garlic	Hamedan Province
T. harzianum (T.h- 12)	Th3	Potato	Hamedan Province
T. harzianum (T. h-128)	Th4	Sugar beet	Karaj, Alborz Province
T. asperellum (T.a -1)	Ta1	Potato	Hamedan Province
T. asperellum (T. a-2)	Ta2	Garlic	Hamedan Province
T. flavus (T.f -134)	Tf1	Garlic	Hamedan Province
T. flavus (T.f-157)	Tf2	Garlic	Hamedan Province
T. flavus (T.f-135)	Tf3	Sugar beet	Karaj, Alborz Province
T. flavus (T.f-94)	Tf4	Sugar beet	Karaj, Alborz Province

مطالعه‌ی ساز و کار فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های قارچ *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma asperellum*، *Talaromyces flavus* بر *Sclerotium cepivorum*

مکانیسم فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های مختلف قارچ *Trichoderma harzianum*، *Trichoderma asperellum*، *Talaromyces flavus* طبق روش (Francisco *et al.*, 2011) در شرایط آزمایشگاه مورد ارزیابی قرارگرفت.

آزمون کشت متقابل (Dual culture)

این آزمون به‌منظور بررسی اثرات کشت متقابل ده آنتاگونیست و عامل بیماری در چهار تکرار انجام گرفت. در این روش هر تشتک سترون محتوی PDA از وسط، به دو نیمه مساوی با ماژیک تعریف شد. سپس در یک طرف حاشیه‌ی تشتک دیسک پنج میلی‌متری عامل آنتاگونیست و در طرف دیگر دیسک پنج میلی‌متری عامل بیماری قرار داده شد. و سپس تشتک‌ها در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. بعد از رشد کامل عامل بیماری در تشتک شاهد، با استفاده از شاخص (Francisco *et al.*, 2011) میزان قدرت بازدارندگی آنتاگونیست‌ها و قدرت استقرار آن‌ها بر عامل بیماری محاسبه شد.

بررسی کاهش رشد میسلیومی بیمارگر توسط ترکیبات فرار آنتاگونیست‌های قارچی

تشتک‌های پتری حاوی PDA به دو گروه تقسیم می‌شوند. ابتدا در وسط یک سری از تشتک‌های نه سانتی‌متری یک دیسک از عامل بیمارگر با قطر پنج میلی‌متری گذاشته و برای ثابت شدن دیسک‌ها، تشتک‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در یخچال قرار داده شدند. سپس در سری دیگر، دیسکی به قطر پنج میلی‌متر از هر کدام از ده آنتاگونیست با چهار تکرار در وسط تشتک قرار داده شدند. سپس درب تشتک‌ها برداشته شده و تشتک آنتاگونیست پایین و تشتک حاوی عامل بیمارگر در بالا روی هم قرار داده و دهانه هر دو تشتک با نوار پارافیلم مسدود شد. سپس آن‌ها در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شدند. چهار تشتک نیز حاوی محیط کشت اما بدون دیسک برای تهیه‌ی چهار تشتک شاهد که تشتک عامل بیمارگر در بالای آن‌ها قرار می‌گیرد درنظرگرفته شد. بعد از رشد کامل تشتک شاهد با استفاده از شاخص Francisco *et al* (2011) میزان کاهش رشد میسلیومی بیمارگر محاسبه شد.

بررسی تأثیر ترکیبات غیر فرار (ترشحات خارج سلولی) قارچ‌های آنتاگونیست در رشد میسلیومی بیمارگر

در این آزمون ابتدا محیط کشت مایع C'zapeck Dox Broth به میزان ۱۵۰ سی‌سی در ده ظرف شیشه‌ای درب‌دار تهیه شد و سپس داخل هر یک چهار دیسک میسلیومی با قطر یک سانتی‌متر از حاشیه‌ی پرگنه

هریک از ده قارچ آنتاگونیست انداخته شد و به‌مدت ده روز روی شیکر با سرعت 100 rpm قرار داده شد. بعد از گذشت این دوره محتویات هر شیشه با استفاده از پمپ خلا و میکروفیلترهای ۰/۲۵ میکرومتری ساخت شرکت Millipore و تحت شرایط سترون عصاره‌گیری شدند. عصاره به‌نسبت ۲۰ درصد با محیط کشت PDA در حال سرد شدن مخلوط گشته و سپس داخل تشتک‌های سترون ریخته شد. بعد از انعقاد و سرد شدن، دیسک پنج میلی‌متری از عامل بیماری در وسط تشتک‌ها قرار داده شد و سپس تشتک‌ها در انکوباتور در دمای بین ۲۷-۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. بعد از رشد کامل چهار تشتک شاهد به‌طور کامل، میزان رشد میسلیومی عامل بیمارگر در تشتک ها و قدرت بازدارندگی ترکیبات غیر فرار با استفاده از شاخص Francisco *et al* (2011) محاسبه شد.

تهیه‌ی فرمولاسیون‌های بیولوژیک از جدایه‌های مؤثر قارچ‌های آنتاگونیست

در این مرحله از میان جدایه‌ها، شش جدایه (دو جدایه از *Trichoderma harzianum*، دو جدایه از *Trichoderma asperellum* و دو جدایه از *Talaromyces flavus*) که در بررسی‌های آزمایشگاهی نسبت به سایر جدایه‌ها بیشترین تأثیر بازدارندگی علیه قارچ بیماری‌زا را نشان دادند. برای تهیه‌ی فرمولاسیون با استفاده از بستر آلی سبوس برنج انتخاب شدند. برای تهیه‌ی سوسپانسیون اسپور ابتدا جدایه‌های مختلف قارچ‌های *Talaromyces* و *Trichoderma* در محیط کشت PDA کشت داده شد و در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. هنگام کشت قارچ روی بستر ابتدا با اضافه کردن ده میلی لیتر آب مقطر سترون به هر تشتک و شستشوی اسپورهای تولید شده، سوسپانسیونی با غلظت 10^7اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون تهیه و به میزان ده میلی‌لیتر به‌هریک از کیسه‌های سلوفانی حاوی ۵۰ گرم از بستر سبوس برنج که قبلاً اتوکلاو (فشار یک و نیم اتمسفر، حرارت ۱۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه) شده بود، اضافه و کاملا مخلوط گردید.

کیسه‌های تلقیح شده به‌مدت سه هفته در دمای ۲۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شدند تا اسپورهای قارچ کاملاً روی سطح بستر کشت مشاهده شوند. پس از سه هفته محتویات مربوط به هر کیسه، خارج شده و در دمای آزمایشگاه (حدود ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد) کاملاً خشک شدند. بدین‌ترتیب از آن‌ها به‌عنوان فرمولاسیون بیولوژیک جهت آغشته‌سازی بذرهای سیر استفاده شد.

سترون کردن خاک

در این مرحله از خاک مزارع سیر در شهرستان همدان استفاده شد. خاک مورد نظر ابتدا غربال شد و کلوخ‌های بزرگ آن حذف گردید. سپس در دمای ۱۰۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون شد (Mahdizadehnaraghi *et al*., 2007).

ارزیابی قابلیت آنتاگونیستی فرمولاسیون بیولوژیک روی بیماری پوسیدگی سیر در گلخانه

این آزمایش در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و بر پایه‌ی شش جدایه قارچ آنتاگونیست که شامل دو جدایه از *T. harzianum* و دو جدایه از *T. asperellum* و دو جدایه از *T. flavus* در یک بستر آلی، به‌همراه سایر تیمارها شامل بذر آغشته به قارچ‌کش، شاهد سالم و بدون هیچ آلودگی، شاهد آلوده و متأثر از عامل بیماری‌زا به‌طور کلی در نه تیمار انجام شد. برای هر تیمار چهار تکرار که هر تکرار شامل یک گلدان دو کیلویی محتوی خاک سترون مزرعه سیر و سه بذر (سوخچه) رقم حساس سیر توده‌ی سفید بود، در نظر گرفته شد.

برای آغشته‌سازی بذور به ازای هر ۱۰۰ گرم بذر ابتدا میزان پنج گرم از هر بستر وزن کرده و ۱۵ میلی لیتر آب مقطر در شرایط سترون به تشتک سترون منتقل شد. سپس بذرها به درون این محلول در تشتک ریخته شدند، ظروف به‌آرامی تکان داده شد به‌طوری‌که تمامی بذور کاملاً با محلول مذکور آغشته شدند. پس از حدود ۶۰ دقیقه بذرهای آغشته شده از محلول مذکور خارج و به روی کاغذ صافی درون تشتک‌هایی با در نیمه باز قرار داده شدند و با گذشت حدود دو ساعت تحت جریان هوای سترون زیر هود

(هواکش روشن) به‌صورت تدریجی خشک شدند و تا زمان کاشت در دمای چهار درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند (Naraghi *et al.*, 2005).

به جز گلدان‌های شاهد منفی، در همه‌ی گلدان‌ها پنج دیسک قارچی *S. cepivorum* به‌قطریک سانتی‌متر به خاک اضافه شد. در تیمار قارچ‌کش نیز از قارچ‌کش ایپرودیون–کاربندازیم به‌عنوان قارچ‌کش رایج به‌نسبت یک گرم به ازای هرکیلو گرم بذر استفاده شد (Clarkson *et al.*, 2002). در شاهد مثبت (آلوده) فقط عامل بیماری به خاک اضافه شد و از هیچ قارچ آنتاگونیست استفاده نشد. ارزیابی تأثیر فرمولاسیون‌های بیولوژیک بر بیماری پوسیدگی سفید ساقه‌ی سیر، ۶۰ روز پس از کاشت بذور با تعیین شاخص علایم بیماری در تیمارهای مختلف با استفاده از شاخص Entwistle (1990) و مقایسه‌ی آن‌ها با شاهد انجام شد.

پردازش آماری نتایج

بررسی میزان آلودگی بذرهای سیر در تیمارهای مختلف و ارزیابی بیماری پوسیدگی سفید سیر براساس تعداد گیاهچه‌های سالم موجود در هرگلدان با استفاده از شاخص Entwistle (1990) انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی در چهار تکرار مورد پردازش قرار گرفت.

نتایج

نتایج این پژوهش در جداول ۶-۲ ارائه شده است. جدول ۲ نتایج آزمون بیماری‌زایی قارچ *Sclerotium cepivorum* را نشان می‌دهد. طبق جدول ذیل در بین پنج جدایه، جدایه‌ی شماره‌ی ۴ با ۵۱/۲۰ درصد بیماری‌زاترین جدایه بود که برای ادامه‌ی پژوهش انتخاب گردید.

جدایه‌ی شماره ۴ در آزمون بیماری‌زایی روی گیاه میزبان سیر به‌طور گسترده علایم زردی برگ‌ها، پژمردگی و در نهایت پوسیدگی ساقه را به‌شدت بیشتر نسبت به سایر جدایه‌ها نشان داد.

جدول ۲- نتایج آزمون بیماری‌زایی جدایه‌های مختلف قارچ *S. cepivorum*.

Table 2- Result of pathogenecity test of different isolates of *S. cepivorum*.

Isolate Code.	Disease Severity	Disease Incidence (%)
(*Sclerotium cepivorum* 1) Sc1	3	19.41
(*S. cepivorum* 2) Sc 2	3	18.93
(*S. cepivorum* 3) Sc 3	2	10.58
(*S. cepivorum* 4) Sc 4	5	51.20
(*S. cepivorum* 5) Sc 5	3	23.58
Control (no pathogen)	1	0

۱: عدم بروز بیماری و عدم مشاهده‌ی زردی در برگ‌ها.۲: ۱۰-۱ درصد زردی در برگ‌های مسن.۳: ۲۵-۱۱ درصد پژمردگی برگ و گسترش زردی (کلروز). ۴: ۵۰-۲۶ درصد علایم برگی. ۵: بیش از ۵۰ درصد علایم برگی و پوسیدگی ساقه و ظهور سختینه در قاعده ساقه.

جدول ۳- نتایج آزمون کشت متقابل در بازدارندگی از رشد *S. cepivorum* توسط جدایه های آنتاگونیست.

Table 3- Results of Dual culture test in growth inhibition of *S. cepivorum* caused by antagonistic isolates.

Isolate Identity	Isolate Code	Growth inhibition (%)
T. harzianum (T. h- 9)	Th1	61.105 a
T. harzianum (T.h-93)	Th2	56.245 ab
T. harzianum (T.h- 12)	Th3	51.943 abcd
T. harzianum (T. h-128)	Th4	54.160 abc
T. asperellum (T.a -1)	Ta1	46.525 bcd
T. asperellum (T. a-2)	Ta2	51.970 abcd
T. flavus (T.f -134)	Tf1	40.273 d
T. flavus (T.f-157)	Tf2	42.360 cd
T. flavus (T.f-135)	Tf3	40.968 cd
T. flavus (T.f-94)	Tf4	39.163 d

اعداد مشخص شده با حروف مشابه براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند($P<0.05$)

Values marked with the same letter (s) are not statistically different according to Duncan Multiple Range Test ($P<0.05$)

بررسی خواص ضد قارچی *Trichoderma* & *Talaromyces* بر قارچ *Sclerotium cepivorum* عامل بیماری پوسیدگی سفید سیر در شرایط آزمایشگاه

آزمون کشت متقابل

نتایج آزمون کشت متقابل در جدول ۳ ارایه شده است. براساس نتایج این جدول بیشترین درصد بازدارندگی از رشد

قارچ *S. cepivorum* مربوط به جدایه‌ی Th1 به‌میزان ۶۱/۱۰٪ و کمترین درصد بازدارندگی مربوط به جدایه‌ی Tf4 به‌میزان ۳۹/۱۶٪ می‌باشد.

تأثیر قدرت درصد کاهش رشد میسلیومی عامل بیمارگر توسط ترکیبات فرار قارچ‌های آنتاگونیست در شرایط آزمایشگاه

جدول ۴ نشان دهنده‌ی تأثیر ترکیبات فرار تولید شده توسط جدایه‌های قارچ‌های آنتاگونیست بر رشد قارچ بیماری‌زا است. بیشترین تأثیر بازدارندگی مربوط به جدایه‌ی Th1 به‌میزان ۸۳/۴۴٪ و کمترین تأثیر بازدارندگی مربوط به جدایه‌ی Tf4 به‌میزان ۶۲/۰۶٪ می‌باشد.

جدول ۴- نتایج آزمون تأثیر ترکیبات فرار قارچ‌های آنتاگونیست در بازدارندگی از رشد قارچ *S. cepivorum*.

Table 4- Results of the effect of volatile compounds of fungal antagonists in growth inhibition of *S. cepivorum.*

Isolate Identity	Isolate Code	Growth inhibition (%)
T. harzianum (T. h- 9)	Th1	83.443 a
T. harzianum (T.h-93)	Th2	81.375 a
T. harzianum (T.h- 12)	Th3	80.685 ab
T. harzianum (T. h-128)	Th4	79.133 abc
T. asperellum (T.a -1)	Ta1	76.203 abc
T. asperellum (T. a-2)	Ta2	77.925 abc
T. flavus (T.f -134)	Tf1	68.785 bcd
T. flavus (T.f-157)	Tf2	67.238 cd
T. flavus (T.f-135)	Tf3	63.443 d
T. flavus (T.f-94)	Tf4	62.063 d

اعداد مشخص شده با حروف مشابه براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند($P<0.05$).

Values marked with the same letter(s) are not statistically different according to Duncan Multiple Range Test ($P<0.05$).

تأثیر و ارزیابی قدرت تولید ترکیبات غیر فرار (ترشحات خارج سلولی) تولید شده آنتاگونیست‌های قارچی در شرایط آزمایشگاه

تأثیر ترکیبات غیر فرار تولید شده توسط جدایه‌های آنتاگونیست بر رشد قارچ *S. cepivorum* در جدول ۵ ارائه شده‌است. همان‌طور که این جدول نشان می‌دهد بیشترین تأثیر بازدارندگی مربوط به جدایه‌ی Tf1 به‌میزان ۸۹/۹۱٪ می‌باشد.

جدول ۵- نتایج آزمون تأثیر ترکیبات غیر فرار قارچ‌های آنتاگونیست در بازدارندگی از رشد قارچ *S. cepivorum*.

Table 5- Results of the effect of non volatile compounds of fungal antagonists in growth inhibition of *S. cepivorum.*

Isolate Identity	Isolate Code	Growth inhibition (%)
T. harzianum (T. h- 9)	Th1	78.518 bcd
T. harzianum (T.h-93)	Th2	65.688 de
T. harzianum (T.h- 12)	Th3	65.388 de
T. harzianum (T. h-128)	Th4	68.970 cde
T. asperellum (T.a -1)	Ta1	81.50 abc
T. asperellum (T. a-2)	Ta2	85. 230 ab
T. flavus (T.f -134)	Tf1	89.913 ab
T. flavus (T.f-157)	Tf2	69.568 cde
T. flavus (T.f-135)	Tf3	69.643cde
T. flavus (T.f-94)	Tf4	62/063 d

اعداد مشخص شده با حروف مشابه براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند($P<0.05$).

Values marked with the same letter(s) are not statistically different according to Duncan Multiple Range Test ($P<0.05$).

آزمون گلخانه ای

نتایج آزمایشات گلخانه‌ای که به‌صورت شیوع و شدت بیماری ۶۰ روز بعد از کاشت تعیین گردید در جدول شماره‌ی ۶ ارائه گردیده است. در بررسی‌های گلخانه‌ای از شش فرمولاسیون استفاده شده، سه فرمولاسیون بیولوژیک $RBTh_1$; $RBTh_2$; RBTa2 دارای میانگین درصد علایم بیماری کمتری نسبت به‌سایر تیمارها بودند و از لحاظ تأثیر در کنترل بیماری مشابه قارچ‌کش بودند. و بیماری پوسیدگی سفید سیر را به‌طور معنی‌داری در مقایسه با شاهد آلوده کاهش دادند. از لحاظ آماری همه‌ی فرمولاسیون‌ها به‌همراه قارچ‌کش در یک گروه آماری قرارگرفتند و با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نداشتند جدول ۶. در بین تیمارهای آزمایش، برترین تیمار بیولوژیک RBTh1 بود که میانگین درصد علایم بیماری در این تیمار ۱۱/۳۳ ٪ محاسبه شد. در بین فرمولاسیون‌های بیولوژیک استفاده شده کمترین تأثیر در کاهش بیماری مربوط به RBTf2 بود.

جدول ۶- نتایج بررسی تأثیر فرمولاسیون‌های بیولوژیک مختلف بر شیوع و شدت بیماری پوسیدگی سفید سیر در شرایط گلخانه.

Table 6- Effects of different formulations on the incidence and severity of Allium white rot disease in the greenhouse.

Treatment	Disease Incidence (%)	Disease Severity
Rice Bran *Trichoderma harzianum* 1 (RBTh1)	11.33b	1.00b
Rice Bran *Trichoderma harzianum* 2 (RBTh2)	11.42b	1.00b
Rice Bran *T. asperellum* 1 (RBTa1)	13.34b	1.25b
Rice Bran *T. asperellum* 2 (RBTa2)	11.37b	1.00b
Rice Bran *Talaromyces flavus* 1 (RBTf1)	13.45b	1.25b
Rice Bran *Talaromyces flavus* 2 (RBTf2)	13.57b	1.25b
Control +	53.82a	4.75a
Control -	9.24b	1.00b
Fungicide	11.23b	1.00b

اعداد مشخص شده با حروف مشابه براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن دارای اختلاف معنی‌دار نمی‌باشند ($P<0.05$).

Values marked with the same letter(s) are not statistically different according to Duncan Multiple Range Test ($P<0.05$).

بحث و پیشنهادات

نتایج کلی این پژوهش نشان دهنده‌ی این می‌باشد که با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست *Trichoderma* و *Talaromyces* می‌توان عامل بیماری پوسیدگی سفید سیر را کنترل نموده و شدت بیماری و وقوع آن را به‌طور مؤثری در شرایط گلخانه کاهش داد. در این پژوهش تعداد ده جدایه از قارچ‌های آنتاگونیست از گونه‌های مختلف *T. harzianum; T. asperellum; Talaromyces flavus* استفاده شد که این گونه‌ها در پژوهش‌های پیشین نیز در کنترل بیماری‌های دیگری مؤثربوده‌اند (Kakvan *et al*., 2013; Naraghi *et al*., 2013).

مطالعات نشان داده است که در خاک‌های آلوده به‌قارچ عامل بیماری پوسیدگی سفید سیر *Trichoderma koningii* قادر است به‌میزان ۷۹-۶۳ درصد قدرت بازدارندگی داشته باشد. تریکودرما با تولید endochitinases و exo-acting chitinolytic enzymes دیواره‌ی سلولی قارچ *S. cepivorum* را تخریب می‌کند (Metcalf *et al*., 2004).

قارچ‌های آنتاگونیست مورد استفاده در این تحقیق دارای مکانیسم‌های متنوعی از جمله مایکوپارازیتیسم، تولید ترکیبات فرار و تولید ترکیبات غیر فرار می‌باشند که با استفاده از این مکانیسم‌ها در کنترل بیولوژیکی قارچ‌های بیمارگر تأثیر خود را نشان می‌دهند (Naraghi *et al.,* 2013). در بخش اول این پژوهش تأثیرات جدایه‌های آنتاگونیست استفاده شده بر رشد قارچ *S. cepivorum* عامل بیماری پوسیدگی سفید سیر از طریق انجام آزمون‌های مختلف در شرایط آزمایشگاه مورد بررسی قرارگرفت. درآزمایش کشت متقابل بعضی از جدایه‌ها نسبت به جدایه‌های دیگر مؤثرتر نشان دادند. اختلاف در تأثیر جدایه‌ها می‌تواند مربوط به‌گونه‌ی قارچ آنتاگونیست، میزبان آن، محل جداسازی و یا اختلافات ژنتیکی جدایه‌ها باشد که در تحقیقات پیشین نیز مشاهده گردیده است (Kakvan *et al.,* 2013).

در بخش دیگری از پژوهش‌های آزمایشگاهی تأثیرات ترکیبات فرار و ترکیبات غیر فرار تولید شده توسط جدایه‌های آنتاگونیست بر رشد قارچ *S. cepivorum* روی محیط کشت مورد ارزیابی قرار گرفت. تولید ترکیبات فرار و ترکیبات غیر فرار مانند آنتی بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها و هورمون‌ها از مکانیسم‌های مؤثری می‌باشند که در خصوصیات آنتاگونیستی قارچ‌ها و میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست نقش مهمی ایفا می‌نمایند (Kakvan *et al.,* 2013; Naraghi *et al.,* 2013; Heydari & Naraghi, 2014; Samavat *et al.,* 2014).

در این پژوهش تأثیر ترکیبات فرار تولید شده توسط قارچ‌های آنتاگونیست بر رشد قارچ *S. cepivorum* نسبت به‌ترکیبات غیر فرار اندکی بیشتر بود که این می‌تواند ناشی از تفاوت در حساسیت قارچ بیماری‌زا نسبت به این ترکیبات و نیز مربوط به تفاوت شیمیایی و بیوشیمیایی این ترکیبات باشد (Naraghi *et al.,* 2013); (Samavat *et al.,* 2014). همچنین تأثیرات مختلف جدایه‌های گوناگون آنتاگونیست در این مورد می‌تواند ناشی از خصوصیات ژنتیکی جدایه‌ها، تفاوت در جنس و گونه‌ی آن‌ها و نیز گیاه میزبان و محل جداسازی باشد. در بخش دوم این پژوهش که شامل

آزمایشات گلخانه‌ای بود شش فرمولاسیون تهیه شده از جدایه‌های مؤثر آزمایشگاهی (از هر گونه دو جدایه) و روی بستر آلی سبوس برنج تهیه و مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از بسترهای آلی مانند سبوس برنج موضوعی است که در پژوهش‌های پیشین مشاهده شده و این بستر به‌عنوان یک حامل مؤثر و مناسب در انتقال و پایداری میکروارگانیسم‌های مختلف از جمله قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست نقش مهمی داشته است (Jorjani *et al.,* 2011; Naraghi *et al.,* 2013).

براساس نتایج آزمایشات گلخانه‌ای این پژوهش، فرمولاسیون‌های بیولوژیک استفاده شده نتایج تقریباً مشابه‌ای نشان دادند. گرچه تأثیر برخی از آن‌ها از لحاظ کمی اندکی متفاوت بود. تأثیر مشابه آماری فرمولاسیون‌ها در کاهش وقوع و شدت بیماری پوسیدگی سفید سیر می‌تواند ناشی از یکسان بودن بستر مورد استفاده آن‌ها باشد که سبوس برنج بوده است. اختلاف کمی در تأثیر جدایه‌ها نیز می‌تواند احتمالاً مربوط به اختلاف قارچ‌های مختلف آنتاگونیست به لحاظ جنس و گونه‌ی قارچ، گیاه میزبان قارچ، محل جداسازی و نیز اختلافات ژنتیکی آن‌ها باشد (Kakvan *et al.,* 2013). تحقیقات نشان داده است که استفاده از بستر سبوس جهت تکثیر و فعالیت آنتاگونیست‌های قارچی بسیار مؤثرتر از سوسپانسیون آن‌ها در کنترل بیماری‌های قارچی می‌باشد به‌گونه‌ای که کنترل بیولوژیک *S. rolfsii* از طریق فرمولاسیون تریکودرما بسیار مؤثرتر از آن است.

براساس نتایج این پژوهش می‌توان بین نتایج به‌دست آمده در شرایط آزمایشگاهی و شرایط گلخانه‌ای همبستگی بالایی مشاهده نمود. به‌عبارتی جدایه‌هایی که قدرت تسخیر بالا و توانایی تولید متابولیت‌های مختلف را داشته‌اند، بسته به میزان قدرت در شرایط گلخانه‌ای نیز به‌همان میزان دارای تأثیر بیشتر بوده‌اند. تشابه و یکنواخت بودن تأثیر میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست مانند قارچ‌ها و باکتری‌های مورد استفاده در کنترل بیولوژیک بیماری‌های مختلف از جمله پوسیدگی بذر و مرگ گیاهچه‌ی چغندر قند، بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه گندم، پوسیدگی ریشه‌ی چغندرقند، مرگ گیاهچه‌ی پنبه و پژمردگی ورتیسلیومی گوجه‌فرنگی و خیار گلخانه‌ای، پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی نیز در پژوهش‌های پیشین مشاهده شده است (Jorjani *et al.,* 2011; Abdolahi *et al*., 2013; Hajimashaalahbazaz *et al.,* 2013; Kakvan *et al.,* 2013; Naeimi & Zare, 2013; Naraghi *et al.,* 2013; Heydari & Naraghi, 2014; Samavat *et al.,* 2014).

نتایج کلی پژوهش حاضر نشان دهنده‌ی این امر می‌باشد که بیماری پوسیدگی سفید سیر (Allium White Rot) که یک بیماری مهم و خسارت‌زا در مزارع سیر کشور می‌باشد می‌تواند با استفاده از قارچ‌های آنتاگونیست *Talaromyces* و *Trichoderma* و فرمولاسیون‌های تهیه شده از آن‌ها به طور مؤثری کنترل گردد. نتایج این پژوهش نوید بخش بوده و بعد از انجام بررسی‌هادر شرایط مزرعه و به‌دست آوردن نتایج در مراحل آتی تحقیق می‌تواند به‌عنوان یکی از اجزای مهم در مدیریت تلفیقی (Integrated Pest Management) بیماری مذکور به‌شمار آید و ضمن کاهش خسارت بیماری، در افزایش محصول و حفاظت از ذخایر بیولوژیکی و زیست‌محیطی مؤثر واقع شود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله صمیمانه از جناب آقای دکتر دوستمراد ظفری استاد محترم گروه بیماری شناسی گیاهی دانشگاه بوعلی سینا به لحاظ اهدای جدایه صمیمانه قدردانی می‌نمایند. از سرکار خانم دکتر لاله نراقی نیز بابت مساعدت و همکاری در اجرای این پژوهش تشکر می‌شود.

References

Abdolahi, M. Ommati, F. & Zaker, M. 2013. Efficacy of some native *Trichoderma* isolates in biological control of *Pythium aphanidermatum*, the causal agent of sugar beet root rot under green house condition. Biocontrol in Plant Protection, 1 (1) 41-52.

Anonymous. 2011. Agricultural Information Bank. Management of Plan and program Agriculture Organization Hamedan province. http://www.iana.ir /9895-1.html.

Bakonyi, j. Vajna, L. Szeredi, A. Tímár, E. Kovács, G.M. Csősz, M. & Varga, A. 2011. First Report of *Sclerotium cepivorum* causing white rot of garlic in Hungary. New Disease Reports. Phytopathology, 87:112-117.

Barnett, H. L. & Hunter, B. 1998. Illustracted genera of Imperfect Fungi. American Phytopathological Society, 218 pp.

Beheshti, B. Sharifi-Sirchi,G.R. Mansouri, M. Hosseinipour, A. & Schlaich, N.L. 2011. Resistanceto citrus canker in key mexican lime induced by β-aminobutyric acid and green tea. American journal of Agricultural and biological Sciences, 6: 242-248.

Berk, M. 1841. *Sclerotium cepivorum*, Annals and Magazine of Natural History. Series 1:6-359.

Clarkson, P. Payne, T. Nmead, A. & Whipps, J. 2002. Selection of fungal biological control agents of *Sclerotium cepivorum* for control of white rot by sclerotial degradation in a UK soil. Plant Pathology, 51: 735-745.

Davis, R.M. Aegerter, B. Laemmlen, F. F. & Voss, R.E. 2007. Onion and garlic white rot. Reviewed 1/07 University of California agriculture and natural resources.

Entwistle, A., R. 1990. *Allium* white rot and its control. Soil Use and Management. 6: 201-209.

Francisco, D.H. Angelica, M.P. Gabriel, M. Melchor, C.S. Raul, R. Cristobal, N. & Francisco, C.R, 2011. In vitro antagonist action of *Trichoderma* strains against *Sclerotium cepivorum* and *Sclerotinia sclerotirum*. American journal of Agricultural and biological Sciences, 6(3): 410-417.

Hajimashaalahbazaz, S. Razavi, M. & Ghasemi, A. 2013. Evaluation of *Pseudomonas fluorescens* for biological control of wheat crown and root rot disease (*Fusarium culmorum*). Iranian Journal of Biocontroln in Plant Protection, 1(2): 2-16.

Heydari, A. & Naraghi, L. 2014. Application of antagonistic bacteria for the promotion of cotton seedlings growth characteristics. International Journal of Agriculture and Crop Sciences, 7(13): 1267-1273.

Jorjani, M. Heydari, A. Zamanizadeh,H.R. Rezaee, S. & Naraghi, L. 2011. Development of *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus coagulans* based bioformulations using organic and inorganic carriers and evaluation of their influence on growth parameters of sugar beet. Journal of Biopesticides, 4 (2): 180-185.

Kakvan, N. Heydari, A. Zamanizadeh, H.R. Rezaee, S. & Naraghi, L. 2013. Development of new bioformulations using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal antagonists for biological control of sugar beet damping-off disease. Crop Protection, 53: 80-84.

Keller, E.R.J. Senula, A. & Dreiling, M, 2005. Gene banking of vegetative propagated medicinal plants – two cases: Allium and Mentha. Journal of ActaHortic, 676: 103 – 109.

Leta, A. & Selvaraj, Th. 2013. Evalution of Arbuscular mycorrizal fungi and *Trichoderma* species for the control of onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk). Plant Pathology Microbiology, 4(159):1-6.

Mahdizadehnaraghi, R. Zafari, D. Zamanizadeh, H.R. & Arjmandian, A. 2007. Identification of the fungal disease agents on garlic in Hamedan province. Agricultural Research (Water, Soil, Plant in agriculture), 7(3): 11-29.

McLean, kirstin, L. 2001. Biological control of onion white rot using *Trichoderma harzianum*. Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy at Lincoln University.http://hdi.handle.net/10182/1494.

Metcalf, D.A. Dennis, J.J.C. & Wilson, C.R. 2004. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* on the ability of *Trichoderma koningii* to suppress white rot of onion. Plant Disease, 88 (3): 287-291.

Naeimi, S. & Zare, R. 2013. Evaluation of indigenous *Trichoderma* spp. isolates in biological control of *Botrytis cinerea* the causal agent of strawberry gray mold disease. Iranian Journal of Biocontrol in Plant Protection, 1 (2): 52-74.

Naraghi, L. Heydari, A. & Rezaee, S. 2005. Study of Antagonistic Mechanisms and action different isolates *Talaromyces Flavus* and Determination of genetic diversity. The thesis submitted for the degree of PhD. in field of plant pathology, Islamic Azad University Science and Research Branch, Tehran. Iran.

Naraghi L., Heydari A., Rezaee S., & Razavi M. 2013. Study on some antagonistic mechanisms of *Talaromyces flavus* against *Verticillium dahliae* and *Verticillium albo-atrum*, the causal agents of wilt disease in several important crops. Biocontrol in Plant Protection, 28 (1): 13-28.

Ricardo, J. Zavaleta, E. & Aguilera, G. 2000. Variability of four Mexican isolates of *Sclerotium cepivorum*. Revista Mexicana Phytopathologia, 103-110.

Samavat, S. Heydari, A., Zamanizadeh, H. R. Rezaee, S. & Alizadehaliabadi, A. 2014. Comparison between *Pseudomonas aureofaciens* (chlororaphis) and *P. fluorescens* in biological control of cotton seedling damping-off disease. Iranian Journal of Plant Protection Science, 54 (2): 115-121.

Saremi, H. Ammarellou, A. & Saremi, H. 2010. Garlic white rot caused by Sclerotium cepivorum and its managing by soil solarization in Zanjan province, northwest Iran. Journal of food, Agriculture & Environment, 8(3, 4): 411-414.

Sikora, R.A. & Hoffman-Hergarten, S. 1993. Biologycal control of plant parasitic nematodes with plant health promoting rhizobacteria, in pest management: Biologically based technologies, proceeding of Beltsville symposium XVIII, edited by Iumsden Redland Vaughn, J.L. American Chemical Society. Washington, 166-172.

Biological control of *Sclerotium cepivorum*, the causal agent of Allium (garlic) white rot disease, using *Trichoderma* and *Talaromyces* fungal antagonists in the laboratory and green house conditions

Razak Mahdizadehnaraghi[1], Asghar Heydari[2], Hamidreza Zamanizadeh[1], Saeed Rezaee[1] and Jafar Nikan[3]

1. Departmant of Plant Pathology, College of Agriculture and Natural Resources, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran.
2. Diseases Research Department, Iranian Research Institute of Plant protection, Tehran.
3. Plant Protection Research Department, Hamedan Province Agriculture and Natural Resources Research Center, Hamedan.

Corresponding author: Razak Mahdizadehnaraghi, email: mahdizadehnaraghi2007@gmail.com

Received: Oct. 20, 2014 **2 (2) 13-24** **Accepted: Nov. 26, 2014**

Abstract

White rot caused by *Sclerotium cepivorum* (Berk).is one of the most widespread and damaging fungal diseases of garlic This diseas causes significant losses to garlic crops in Iran including Hamadan province evey year. At the present, the most common control control method of the disease is the use of chemical fungicides. This control measure is costly and contaminates the agricultural environment. Moreover, since the pathogen is soil-borne, this control method is not quite effective in controlling the disease. In this study, the effects of two antagonistic fungi including *Trichoderma and Talaromyces* as bio-control agents in the control of the causal fungal pathjogen were investigated under laboratory and greenhouse conditions. For this purpose, ten isolates of the antagonistic fungi, four isolates of *T. harzianum* (Th), two isolates of *T. asperellum* (Ta) and four isolates of *T. flavus* (Tf) were selected. The effects of antagonistic agents on the growth of the pathogen were evaluated in *in vitro* using dual culture method. Moreover, the impact of the volatile and non-volatile metabolites of the antagonistic agents on growth of the pathogen was also investigated. The results of the laboratory experiments showed that six isolates (two isolate from each species) significantly reduced the pathogen growth. Several new bioformulations were then developed and prepared using rice bran (RB) as an organic carrier and the most effective antagonistic isolates. The effectiveness of the developed bioformulations in controlling the white rot disease of garlic was studied under green-house conditions. The experiment was conducted as completely randomized design consisted of nine treatments (six bioformulations, one fungicide and two controls) each with four replications. The results of the greenhouse experiments indicated that regarding disease incidence and severity, there were significant differences among the treatments ($P<0.05$). The highest infection rate (53.82%) was observed in the positive control (treatment without biological agent or fungicide). The lowest infection rates were belonged tohealthy control (9.24%), fungicide (11.23%), RBTh1 (11.33%), RBTa2 (11.37%) and RBTh2(11.42%) respectively which were placed in the same statistical group.These overall results indicate that the biological control of Allium white rot disease using antagonistic fungi is possible as an effective alternative method.

Keywords: Allium White Rot Disease, Biological control; Formulation; Garlic, Rice bran.