**مقاله تحقیقی**

# تاثیر همزمان نانوسید، قارچ‌کش و قارچ تریکودرما بر گیاهچه‌های کلزا مبتلا به پوسیدگی سفید ساقه ناشی از *Sclerotinia sclerotiorum*

**فاطمه سلطانی نژاد[۱]، کامران رهنما[۲]، سید جواد صانعی[۳]**

۱، ۲، ۳– دانشجوی دکتری، دانشیار، استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران.

مسئول مکاتبات: فاطمه سلطانی‌نژاد، ایمیل: soltani_f79@yahoo.com.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۷/۲۲ ۱۰(۲)۱۰۹–۱۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۲

## چکیده

در این بررسی، اثر بازدارندگی گونه‌های تریکودرما به همراه نانوسید و قارچ‌کش برای مبارزه تلفیقی با قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* مورد مطالعه قرار گرفته است. بدین منظور، اثر جداگانه سه جدایه *Trichoderma harzianum*، یک جدایه *T. virens*، یک جدایه *T. atroviride* و یک جدایه *T. koningii* بر سه جدایه عامل بیمارگر (SS1، SS2 و SS3) در محیط‌کشت PDA دربردارنده ۵ سطح از نانوسید(۰، ۳۰، ۶۰، ۱۰۰ و ۱۳۰ پی‌پی‌ام)، به روش کشت متقابل در آزمایشگاه بررسی شد. سپس اثر *T. harzianum* (1211)، *T. koningii* (iso2) و *T. virens* (6011) به همراه نانوسید (سطوح ۱۰ و ۳۰ پی‌پی‌ام) و قارچ‌کش ایپرودیون–کاربندازیم (سطوح ۲ و ۵ پی‌پی‌ام) بر یک جدایه عامل بیمارگر درشرایط گلخانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار، مورد ارزیابی قرار گرفت. در کشت متقابل، کمترین درصد بازدارندگی از رشد قارچ اسکلروتینیا، ۶ درصد بود که متعلق به تیمار *Trichoderma virens* (6011) × *S. sclerotiorum* (SS2) در سطح ۱۰ پی‌پی‌ام نانوسید بود. در گلخانه، تریکودرما به دو روش پوشش سطحی بذر و نیز مخلوط با خاک، بکار برده شد و صفات مورد ارزیابی شامل ارتفاع بوته و وزن تر و خشک گیاه بود. در آزمایش اول به روش پوشش سطحی بذر با سوسپانسیون گونه‌های تریکودرما، بیشترین میزان وزن تر گیاه به تیمار *T. harzianum* (1211) و بیشترین ارتفاع نیز به تیمار *T. koningii* (iso2) مربوط بود. در آزمایش دوم به روش کاربرد گونه‌های تریکودرما به صورت مخلوط با خاک، بیشترین وزن تر و خشک گیاه در تیمار *T. harzianum* (1211) + ۳۰ پی‌پی‌ام نانوسید و بیشترین ارتفاع در تیمار *T. harzianum* (1211) + ۲ پی‌پی‌ام قارچ($P\leq0.01$) مشاهده شد. در مجموع، تیمارهایی که گونه‌های تریکودرما به تنهایی به کار رفته بود با تیمارهایی که نانوسید و قارچ‌کش هم اضافه شده بود، تفاوت معنی‌داری را در وزن تر، خشک و ارتفاع گیاه نشان نداد. به علاوه کاربرد گونه‌های تریکودرما به تنهایی نسبت به تلفیق آن با نانوسید و قارچ‌کش، تاثیر بهتری بر صفات رویشی گیاهچه‌های کلزای مبتلا به این بیماری داشت.

واژه‌های کلیدی: قارچ‌کش ایپرودیون–کاربندازیم، گونه‌های تریکودرما، مدیریت تلفیقی، نانوسید، *Sclerotinia sclerotiorum*

**مقدمه**

پوسیدگی سفید ساقه کلزا ناشی از قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary یکی از مهم‌ترین بیماری‌های کلزا در ایران و سایر کشورها از جمله چین و نیز علت اصلی مرگ و میر این گیاه زراعی در فرانسه و آلمان و دیگر نقاط اروپا است(Liu *et al.*, 1990). این قارچ در نواحی معتدل، گرمسیری و خشک به‌طور گسترده‌ای فعالیت دارد (Lehner *et al.*, 2017). دامنه میزبانی بسیار وسیعی با بیش از صدها گونه گیاهان تک لپه‌ای و دولپه‌ای شامل گیاهان زراعی، گل‌ها و علف‌های هرز دارد و تحقیقات

جدید نیز نشان داده است که این قارچ می‌تواند در میزبان‌هایی همچون برنج، گندم، ذرت، جو و جودوسر به‌عنوان اندوفیت نیز در گیاه حضور داشته باشد (Tian *et al.*, 2020). میزان خسارت این بیماری در شرایط آب و هوایی مطلوب ۲۰ تا ۳۵ درصد می‌باشد در حالی‌که در نواحی گرمسیری، خسارتی بین ۸۰ تا ۱۰۰ درصد نیز از این بیماری به ثبت رسیده است (Alkooranee *et al.*, 2017). علائم بیماری در کلزا شامل لکه‌های سفید، خاکستری در ساقه‌ها، شاخه‌ها یا غلاف‌ها، ظهور اسکلروت‌های سیاه و سخت درون ناحیه کورتکس ساقه‌های آلوده، گلدهی زودهنگام و پژمردگی بافت گیاهی در انتهای ساقه‌های آلوده می‌باشد (Derbyshire & Denton Giles, 2016). این قارچ خاکزی، پایداری بسیار زیادی در مزارع دارد. روش‌های مختلف مبارزه علیه این بیماری شامل تناوب ۴ ساله با غلات، کشت بذر سالم و عاری از آلودگی، شخم عمیق و دفن نمودن بقایای گیاهی آلوده به زیر خاک برای جلوگیری از جوانه زدن اندام سختینه قارچ یا اسکلروت‌ها می‌باشند. علاوه بر این، از بین بردن علف‌های هرز، کاشت ارقام مقاوم و مبارزه شیمیایی از جمله روش‌های مبارزه با بیماری می‌باشند، لیکن هر یک باعث افزایش هزینه‌های بسیار زیادی به مدیریت مزرعه می‌شود (Rahnama *et al.*, 2004, Vakili Zarj *et al.*, 2013, Sharma *et al.*, 2015). مهار این بیماری به دلیل خاکزی بودن عامل بیماری، با روش‌های شیمیایی کار آسانی نیست و لازم است از روش‌های دیگر مانند مهار زیستی درکنار روش‌های زراعی استفاده شود. گونه‌های مختلف جنس تریکودرما *Trichoderma* Pers. دارای اثر آنتاگونیستی روی دامنه وسیعی از قارچ‌های بیمارگر هستند و در برنامه مدیریتی برخی از بیماری‌های قارچی گیاهان در کنار سایر روش‌های مدیریت بیماری مورد استفاده قرار می‌گیرند (Mukherjee *et al.*, 2013). از میان قارچ‌های بیوکنترلی، گونه‌های تریکودرما در مهار قارچ‌های بیمارگر *Sclerotinia minor* (Jagger) و *S. sclerotiorum* بسیار موثر هستند و گزارش‌های زیادی مبنی بر مهار این قارچ‌های بیمارگر با گونه‌های تریکودرما از طریق کاهش شدید قدرت بقای اندام سختینه‌های آن‌ها وجود دارند (Harman, 1996). در تحقیقی که اثر ۷۱ جدایه تریکودرما روی *S. sclerotiorum* بررسی گردید، نشان داد که تمامی جدایه‌ها در مهار ریسه بیمارگر در آزمایشگاه و کاهش وقوع و شدت بیماری در گلخانه موثر بودند (Safari Motlagh & Abolghasemi, 2019). قارچ تریکودرما به طور کلی دارای تحمل زیادی نسبت به انواعی از توکسین‌ها و ترکیبات زنوبیوتیک از جمله آنتی‌بیوتیک‌های تولید شده به‌وسیله سایر میکروارگانیسم‌ها، ترکیبات ضدمیکروبی گیاهی و قارچ‌کش‌های شیمیایی می‌باشد (Harman *et al.*, 2004, Chaparro, 2011). بنابراین می‌توان امکان استفاده از این عوامل زیستی را در همراهی با قارچ‌کش‌های شیمیایی بررسی کرد (Glick, 2020). کنترل شیمیایی بیماری پوسیدگی سفید ساقه کلزا در ایران، اغلب توسط سموم کاربندازیم و تبوکونازول انجام می‌شود و از جمله قارچ‌کش‌های موثر برای کنترل این بیماری، قارچ‌کش ایپرودیون–کاربندازیم (روال‌تی‌اس) به شمار می‌رود (Alamdarloo *et al.*, 2018). براساس پژوهش‌های به عمل آمده، از ترکیب قارچ‌کش و تریکودرما بدون تأثیر منفی روی کارایی نسبی تریکودرما استفاده شده است. ترکیب قارچ‌کش کاربندازیم با قارچ *T. harzianum* در کنترل بیماری ناشی از قارچ *Magnaporth oryzae* در مزرعه برنج، نتیجه بهتری نسبت به استفاده از هر یک از این عوامل به تنهایی داشت (Jumbhulkar *et al.*, 2018). ضدعفونی بذر پنبه با ترکیب متالاکسیل و یک جدایه *T. virens* سبب جلوگیری از بیماری مرگ گیاهچه پنبه ناشی از *Pythium ultimum* Trow. و *Rhizoctonia solani* Kuhn. شد و نتیجه حاصله با کاربرد متالاکسیل به تنهایی، اختلاف معنی‌دار داشت (Howell *et al.*, 1997). بهره‌گیری از جدایه‌های مقاوم به سموم شیمیایی، به منظور استفاده از آن‌ها در مدیریت تلفیقی، حائز اهمیت زیادی می‌باشد و براین اساس Lederer *et al.* (1992) با بررسی اثر ۵۰ جدایه مختلف از گونه‌های تریکودرما در کشت متقابل با بیمارگر *Phytophthora cactorum* (Leb & Cohn.) Schroet. روی محیط‌کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار حاوی بنومیل نشان دادند که ۳۵

جدایه از گونه‌های تریکودرما دارای اثر بازدارندگی بودند. نانوسیلور یا همان نانوذرات نقره، یکی از پرکاربردترین ذرات در حوزه نانو است که به دلیل خاصیت میکروب‌کشی، ضدقارچی و ضدباکتریایی خود کاربردهای وسیعی پیدا نموده است (Cho *et al.*, 2005, Lipovsky *et al.*, 2011 & Mahdizadeh *et al.*, 2015). نقره در ابعاد غیرنانو، فلزی با خاصیت واکنش‌دهی کم می‌باشد، ولی زمانی که به ابعاد کوچک در حد نانو تبدیل می‌شود، اولاً خاصیت میکروب‌کشی آن بیش از ۹۹ درصد افزایش می‌یابد به حدی که می‌توان از آن جهت بهبود جراحات و عفونت‌ها استفاده کرد، ثانیا به علت سطح تماس بیشتر با فضای بیرون تاثیر بیشتری بر محیط می‌گذارد. همچنین این ذرات بر متابولیسم، تنفس و تولیدمثل میکروارگانیسم‌ها اثر می‌گذارند (Jabbari *et al.*, 2009). در سال‌های اخیر استفاده از نانوسیلور در جهان وسعت زیادی یافته و به دلیل خاصیت میکروب‌کشی، ضدقارچی و ضدباکتریایی خود کاربردهای وسیعی پیدا نموده است (Cho *et al.*, 2005, Lipovsky *et al.*, 2011 & Mahdizadeh *et al.*, 2015). نانوسیلور بر روی بسیاری از قارچ‌ها از جمله *S. sclerotiorum* اثر قارچ‌کشی دارد (Sharma *et al.*, 2018). بررسی خاصیت قارچ‌کشی نانوذرات نقره بر قارچ عامل پژمردگی آوندی عدس *Fusarium oxysporum* f. sp. *lentis* Vasudeva & Srinivasan. نشان داد که با روش غوطه‌ورسازی اسپور در نانوذرات نقره، این ماده در غلظت ۰/۵ پی‌پی‌ام، اثر قارچ‌کشی دارد. همچنین در روش کشت اسپور بر روی محیط‌کشت آب آگار در غلظت‌های ۳۰ و ۱۳۰ پی‌پی‌ام، قارچ ایستایی و در غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام، قارچ‌کشی مشاهده گردید (Ashrafi *et al.*, 2010). این ماده به‌صورت ضدعفونی بذر هم مورد استفاده قرار می‌گیرد به‌طوری‌که در بررسی دهقان (۲۰۱۰) مشخص گردید نانوسیلور می‌تواند درصد آلودگی گندم را به بیماری سیاهک پنهان از ۷۵ درصد (تیمار شاهد) به ۳ درصد در تیمار حاوی ۸۰ پی‌پی‌ام نانوسید به صورت ضدعفونی بذر، کاهش دهد. کشت قارچ *S. sclerotiorum* و *T. harzianum* بر روی محیط‌کشت‌های PDA حاوی نانوسیلور نشان داد که *T. harzianum* تحمل بیشتری در مقاومت نانوسیلور دارد و کاهش رشد کمتری در محیط کشت داشته است (Mahdizadeh, 2015). در تحقیقی که بر روی بیماری شانکر درخت سیب ناشی از قارچ *Valsa mali* انجام گرفت، استفاده همزمان نانوسیلور و قارچ‌کش ایپرودیون در کنترل این بیماری نسبت به کاربرد قارچ‌کش به تنهایی، اثر سینرژیستی داشت (Li *et al.*, 2022). همچنین کاربرد همزمان نانوسیلور و قارچ‌کش فلوکونازول نیز اثر این قارچ‌کش را افزایش داده است (Gajbhiya *et al.*, 2009).

اگرچه استفاده از سموم شیمیایی به عنوان تنها روش قاطع در مبارزه با بیماری‌های گیاهی هنوز مورد توجه بسیار قرار دارد. با این حال تنوع و تعدد عوامل بیماری‌زای گیاهی در سال‌های اخیر از یک سو و رعایت نکات زیست محیطی ناشی از استفاده بی‌رویه از سموم آفت‌کش در راستای رسیدن به کشاورزی سالم و پایدار از سوی دیگر، محققین را بر آن داشته است تا برنامه‌های مدیریت تلفیقی را با جدیت بیشتری مد نظر قرار دهند. بدیهی است که با چنین رویکردی، بررسی توان سازگاری قارچ‌ها و باکتری‌های آنتاگونیست و مفید خاک و فرا ریشه‌ی گیاهان در برابر سموم آفت کش مورد استفاده در محیط خاک در رسیدن به اهداف مدیریت تلفیقی (استفاده توام ترکیبات زیستی و شیمیایی) الزامی به نظر می‌رسد (Elad *et al.*, 1980, Hornby, 1997). این تحقیق در نظر دارد تا با مقایسه گونه‌های بومی تریکودرما به عنوان عامل مهار زیستی، اثر روال‌تی‌اس به عنوان یک قارچ‌کش شیمیایی و نیز نانوسید، بهترین الگوی کاربردی را بر رشد گیاهچه‌های کلزای آلوده به پوسیدگی سفید ساقه ناشی از *S. sclerotiorum* معرفی نماید. به‌علاوه در این پژوهش سعی گردیده است که مقادیری از نانوسید و قارچ‌کش را که بیشترین تاثیر را روی عامل بیمارگر و کمترین تاثیر را روی قارچ آنتاگونیست تریکودرما داشته باشد، برای مطالعات گلخانه‌ای انتخاب و بررسی نماید.

## مواد و روش پژوهش

### تهیه جدایه‌های بیمارگر

سه جدایه عامل بیمارگر *S. sclerotiorum* (SS1, SS2, SS3) از کلکسیون آزمایشگاه تحقیقات قارچ‌شناسی در گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه و بر روی محیط کشت PDA کشت داده شدند (Naseripour *et al.*, 2015).

### تهیه گونه‌های تریکودرما

عوامل زیست مهار قارچی شامل سه جدایه از گونه *T. harzianum* (T1, T21, 1211)، یک جدایه *T. virens* (6011)، یک جدایه *T. atroviridae* (6022) و یک جدایه *T. koningii* (iso2) از مجموعهٔ قارچ‌های زنده در گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شدند. برای انجام مراحل تحقیق، ایزوله‌ها در محیط کشت PDA کشت داده شدند و در یخچال نگهداری شدند (Habibi *et al.*, 201).

### بررسی اثر بازدارندگی جدایه‌های تریکودرما روی *S. sclerotiorum* با سطوح مختلف نانوسید

در این بررسی از روش کشت متقابل استفاده شد. ابتدا فلاسک‌های حاوی محیط‌کشت غذایی PDA در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۱ اتمسفر اتوکلاو شدند پس از سرد شدن محیط‌های کشت تا ۴۵ درجه سلسیوس، مقادیر ۱۰، ۳۰، ۶۰، ۱۰۰ و ۱۳۰ پی‌پی‌ام از ماده اصلی نانوسید (محلول ۴۰۰۰ پی‌پی‌ام ال ۲۰۰۰ از شرکت نانوپارس ایران) در شرایط هود آزمایشگاهی سترون، به آن‌ها اضافه گردید. سپس محتویات فلاسک‌ها به همراه نمونه شاهد حاوی محیط کشت بدون نانوسید، داخل تشتک‌های پتری سترون با قطر نه سانتی‌متر به میزان ۱۵ میلی‌لیتر ریخته شدند. سپس در یک طرف از تشتک پتری سترون حاوی محیط‌کشت PDA به همراه مقادیر مختلف نانوسید (۱۰، ۳۰، ۶۰، ۱۰۰ و ۱۳۰ پی پی‌ام)، یک قرص آگار ۵ میلی‌متری از کشت سه روزه عامل بیمارگر و در طرف دیگر روی یک خط مستقیم با فاصله ۸ سانتی‌متری یک قرص آگار ۵ میلی‌متری از کشت سه روزه هر یک از شش جدایه آنتاگونیست قرار داده شد. تیمارهای شاهد نیز در محیط‌کشت بدون نانوسید کشت داده شدند. سپس درب تشتک پتری‌ها با پارافیلم مسدود شدند و در انکوباتور ۲±۲۱ درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. هر سه روز در میان، رشد رویشی ریسه‌های قارچ بیمارگر در تشتک‌ها با خط‌کش اندازه‌گیری شدند. در صد بازدارندگی از رشد عامل بیمارگر از فرمول زیر به‌دست آمد:

=درصد بازدارندگی قارچ آنتاگونیست روی رشد قارچ بیمارگر

$$\frac{\text{قطر ناحیه رشدی در شاهد} - \text{قطر ناحیه رشدی در تیمار}}{\text{قطر ناحیه رشدی در شاهد}} \times 100$$

### بررسی قدرت کلونیزاسیون جدایه‌های تریکودرما روی پرگنه قارچ *S. sclerotiorum* با سطوح مختلف نانوسید

بدین منظور یک دیسک ۵ میلی‌متری از جدایه‌های تریکودرما به مرکز تشتک محیط کشت PDA حاوی کشت سه روزه *S. sclerotiorum* و مقادیر مختلف نانوسید و نمونه شاهد (بدون نانوسید) منتقل شد. تشتک‌ها در انکوباتور ۲±۲۱ درجه سلسیوس و تاریکی نگهداری شدند. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. سپس تشتک‌ها به مدت ۱۰ روز، هر سه روز در میان، توانایی کلونیزاسیون و جلوگیری از تشکیل سختینه قارچ بیمارگر توسط جدایه‌های تریکودرما مورد بررسی قرار گرفتند و مشاهدات ثبت شدند.

### بررسی میکروسکوپی تاثیر نانوسید روی ریسه قارچ تریکودرما و عامل بیمارگر *S. sclerotiorum*

در یک تشتک محیط کشت PDA حاوی ۳۰ پی‌پی‌ام نانوسید، یک حلقه ۵ میلی‌متری از حاشیه‌ی فعال پرگنه سه روزه جدایهٔ اسکلروتینیا و در پتری دیگر نیز یک حلقه از پرگنه قارچ تریکودرما قرار داده شد. پس از ۴۸ الی ۷۲ ساعت، از روی پرگنه رشد کرده روی محیط کشت، بصورت لایه نازک برداشته شد و بر روی لام میکروسکوپی

قرار داده شد. تغییرات ریخت‌شناختی ریسه توسط میکروسکوپ نوری عکس‌برداری گردید (Lederer *et al.*, 1992).

### تاثیر محیط‌کشت حاوی نانوسید بر اسپورزایی *T. koningii*

در این بررسی، میزان اسپورزایی قارچ *T. koningii* (iso2) بر روی محیط‌کشت PDA حاوی ۵ سطح از نانوسید (۱۰، ۳۰، ۶۰، ۱۰۰ و ۱۳۰ پی‌پی‌ام) مورد مطالعه قرار گرفت. پنج روز پس از اینکه قارچ در محیط‌کشت‌ها شروع به اسپورزایی کرد. درشرایط هود آزمایشگاهی، درب تشتک‌های پتری برداشته شد. سپس ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون روی سطح هر تشتک پتری ریخته شد. به کمک یک اسکالپل سترون ریسه‌های روی آگار به‌صورت سطحی خراش داده شدند. پس از گذشت ۳ دقیقه از آزاد شدن اسپورها از ریسه‌ها، سوسپانسیون اسپورها به دست آمد. به کمک یک پیپیت پاستور، ۳ میکرولیتر از آب مقطر حاوی اسپور از سطح محیط‌کشت برداشته و روی یک لام هموسیتومتر قرار داده شد. سپس، در زیر میکروسکوپ اقدام به رویت سلول اسپور (کنیدی‌ها) گردید. با شمارش این نوع تک کنیدیوم‌ها و ضمن مقایسه با تشتک پتری شاهد فاقد ماده نانوسید، درصد بازدارندگی اسپورزایی طبق روش (Lederer *et al.*, 1992) محاسبه گردید. شمارش اسپورها برای هر یک از تیمارها در ۵ تکرار انجام شد.

### مطالعات گلخانه‌ای

با توجه به هدف این آزمایش (تعیین مقادیری از نانوسید با بیشترین تاثیر روی عامل بیمارگر و کمترین تاثیر روی قارچ بیمارگر و نیز نتایج بررسی‌های مقدماتی آزمایشگاهی)، غلظت‌های بالاتر از ۳۰ پی‌پی‌ام به دلیل اینکه سبب محدودیت رشد برای قارچ تریکودرما می‌شدند، لذا برای انجام بررسی مناسب نبودند و غلظت‌های ۱۰ و ۳۰ پی پی‌ام برای بررسی‌های گلخانه‌ای انتخاب شدند. از میان سه جدایه *S. sclerotiorum*، که در شرایط آزمایشگاهی به روش کشت متقابل در مقابل تریکودرما مورد بررسی قرار گرفته بود، SS2 بیشترین مقاومت را به نانوسید نشان داد. بنابراین برای بررسی‌های گلخانه‌ای از این جدایه استفاده شد.

### آزمون بیماری‌زایی

بدین منظور، تعدادی بذور کلزا رقم هایولا ۴۰۱ در خاک آلوده به میسلیوم قارچ عامل بیمارگر (به روش ذکر شده در آزمایشات مرحله اول گلخانه)، کاشته شد. پس از سبز شدن و ظهور گیاهچه، علائم یادداشت برداری شدند. سپس قطعاتی از ریشه و ساقه با آب مقطر شستشو داده و به قطعات یک میلی‌متری برش داده شدند. بر روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. پس از نگهداری در انکوباتور در دمای ۲۱ درجه سلسیوس، قارچ بیماری‌زا پس از یک هفته جداسازی شد.

### بررسی تاثیر قارچ‌کش و نانوسید همراه با تیمار سطحی بذر با سوسپانسیون گونه‌های تریکودرما (آزمایشات مرحله اول)

به منظور تهیه زادمایه قارچ بیمارگر، ۲۵۰ گرم دانهٔ گندم شسته شده همراه با ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر درون فلاسک‌های یک لیتری اتوکلاو شد. فلاسک‌های حاوی گندم اتوکلاو شده پس از خنک شدن با چند قرص آگار به قطر۱۰ میلی‌متری از کشت ۳ روزه *S. sclerotiorum*، مایه‌زنی شدند. سپس به مدت ۳۰ روز در مجاورت نور قرار داده شدند. در طول این مدت فلاسک‌ها دو روز در میان تکان داده می‌شدند (Clarkson *et al.*, 2004). جهت تهیه سوسپانسیون اسپور گونه‌های آنتاگونیست، به کشت ۱۰ روزه گونه‌های تریکودرما ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد. با استفاده از اسکالپل سترون روی پرگنه حاوی قارچ خراش ایجاد شد تا سوسپانسیون اسپور حاصل شود. سپس با استفاده از لام هموسیتومتر (اسپورشمار)، غلظتی از این سوسپانسیون معادل $۳ \times ۱۰^{۷}$ اسپور در هر میلی‌لیتر برای گونه‌های *T. atroviridae* (6022)، *T. koningii* (iso2) و *T. harzianum* (1211) تهیه شد (این گونه‌ها بیشترین قدرت پوده‌رُستی و همپوشانی را روی ریسه‌های *S. sclerotiorum* در محیط‌کشت از خود نشان دادند). در مرحله بعد، بذور کلزا رقم هایولا ۴۰۱، با هیپوکلریت‌سدیم

یک درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی و پس از آن با آب مقطر سترون شستشو داده شدند. بذور به مدت ۳ ساعت در ۲۰ میلی‌لیتر مایه تلقیح عوامل زیست مهار قارچی نگهداری شدند. سپس جهت خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت روی کاغذ صافی در دمای اتاق قرار داده شدند ( Expert & Digat, 1995). پس از آن، مقادیر۱۰ و ۳۰ پی‌پی‌ام نانوسید و مقادیر ۲ و ۵ پی‌پی‌ام از قارچ‌کش رورال‌تی‌اس با فرمولاسیون پودر وتابل (ماده موثره ۵۲/۵ درصد شامل ایپرودیون ۳۵ درصد + کاربندازیم۱۷/۵ درصد) آماده شد. خاک مورد بررسی شامل خاک مزرعه و ماسه و خاک برگ بود که به مدت یک ساعت در دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱ اتمسفر در ۲ روز متوالی، در اتوکلاو استریل شد. بذور آغشته شده به سوسپانسیون گونه‌های تریکودرما، با نانوسید و قارچ‌کش رورال‌تی‌اس پوشش سطحی داده شدند. دانه‌های گندم حاوی قارچ اسکلروتینیا به میزان ۱۰ گرم در یک کیلوگرم خاک استریل، به گلدان با حجم یک کیلوگرمی اضافه شد. گلدان‌های شاهد فقط حاوی دانه گندم سترون به میزان ۱۰ گرم در یک کیلوگرم خاک بودند(Clarkson *et al.*, 2004). سپس بذور به تعداد ۲ بذر در خاک در شرایط گلخانه کاشته شدند.

## بررسی تاثیر قارچ‌کش و نانوسید همراه با کاربرد گونه‌های تریکودرما به صورت مخلوط با خاک (آزمایشات مرحله دوم)

مایه تلقیح اسکلروتینیا پس از تهیه بر روی بذور گندم، به میزان ۱۰ گرم در یک کیلوگرم به خاک اضافه گردید (Clarkson *et al.*, 2004). مایه تلقیح گونه‌های تریکودرما نیز همانند قارچ اسکلروتینیا بر روی دانه‌های گندم تهیه شد و به میزان ۱۰ گرم در یک کیلوگرم خاک گلدان‌ها اضافه گردید. سپس بذور کلزا رقم هایولا ۴۰۱، با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۳۰ ثانیه ضدعفونی و پس از آن با آب مقطر سترون شستشو شدند و جهت خشک شدن به مدت ۲۴ ساعت روی کاغذ صافی در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس بذور با نانوسید (در سطوح ۱۰ و ۳۰ پی‌پی‌ام) و قارچ‌کش رورال‌تی‌اس (در سطوح ۲ و ۵ پی‌پی‌ام) پوشش سطحی داده شدند و به تعداد ۲ عدد در خاک هر گلدان کاشته شدند. شاخص‌های مورد ارزیابی در آزمایش‌های گلخانه‌ای شامل وزن تر و خشک گیاهچه و نیز اندازه‌گیری ارتفاع گیاهچه‌های ۲ ماهه کلزا بود. داده‌های حاصل از بررسی گلخانه‌ای به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب یک طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار و ۱۲ تیمار، توسط نرم‌افزار آماری MSTAT–C (ver. 2.10) مورد واکاوی آماری قرار گرفتند. گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون کمترین اختلاف معنی‌دار(LSD) در سطح احتمال ۱ درصد انجام گرفت.

## نتایج

### اثر بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر توسط گونه‌های تریکودرما بروش کشت متقابل در محیط‌کشت حاوی نانوسید

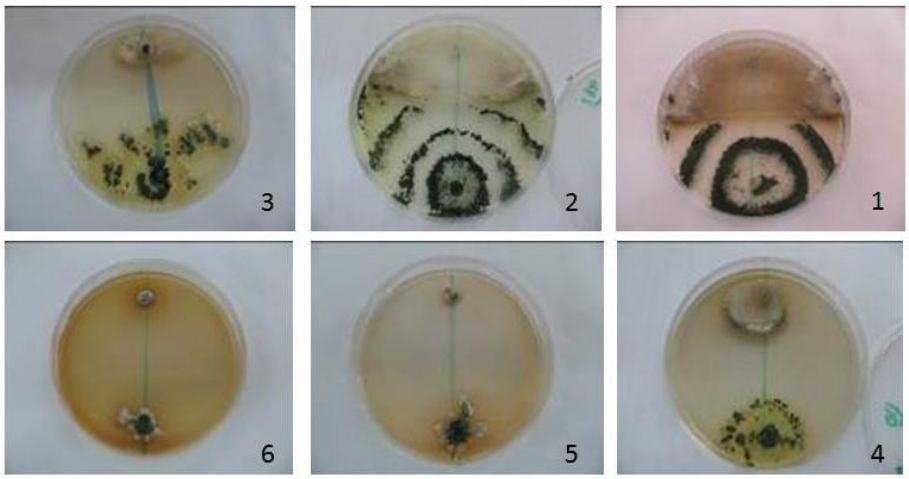
طبق نتایج بدست آمده از جدول تجزیه واریانس (جدول ۱)، جدایه‌های مختلف اسکلروتینیا و مقادیر مختلف نانوسید با احتمال ۹۹ درصد با یکدیگر اختلاف معنی‌داری داشتند. در بین جدایه‌های مختلف گونه‌های تریکودرما نیز اثر بازدارندگی با احتمال ۹۵ درصد اختلاف معنی‌دار بود. در این میان اثرات متقابل نانوسید وجدایه‌های اسکلروتینیا و همچنین کاربرد نانوسید با گونه‌های تریکودرما و اسکلروتینیا همراه با کاهش رشد پرگنه با احتمال ۹۹ درصد معنی‌دار شد (شکل ۱). لیکن اثر متقابل اسکلروتینیا و تریکودرما واثر متقابل تریکودرما و نانوسید تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. بیشترین میزان رشد پرگنه قارچ اسکلروتینیا در محیط‌کشت PDA بدون نانوسید، پس از تیمار شاهد *S. sclerotiorum* (SS3)، مربوط به تیمار SS3 × *T. harzianum* (T1) (۳۰/۵ میلی‌متر) بود. کمترین رشد این قارچ نیز مربوط به تیمار *S. sclerotiorum* (SS2) × *T. harzianum* (T1) (۲۰ میلی‌متر) بود.

جدول ۱– نتایج تجزیه واریانس آزمون تأثیر نانوسید و جدایه‌های گونه‌های تریکودرما روی رشد پرگنه جدایه‌های مختلف *Sclerotinia sclerotiorum* (SS1) در شرایط آزمایشگاهی.

Table 1. Results of analysis of variances of the effect of Nanocide and *Trichoderma* spp. isolates on the growth of different isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* (SS1) *in vitro*.

| Source | df | Ss | Ms | Fs | P |
|---|---|---|---|---|---|
| *S. sclerotiorum* | 2 | 19.392 | 9.969 | 177.7495** | 0.0001> |
| *Trichoderma* | 5 | 0.706 | 0.141 | 2.5880* | 0.0259 |
| Nanocide | 5 | 374.817 | 74.963 | 1374.2462** | 0.0001> |
| *Sclerotinia* × *Trichoderma* | 10 | 0.950 | 0.095 | 1.7424n.s | 0.0705 |
| *Sclerotinia* × Nanocide | 10 | 6.002 | 0.600 | 11.0029** | 0.0001> |
| *Trichoderma* × Nanocide | 25 | 1.670 | 0.067 | 1.2245n.s | 0.2142 |
| *Sclerotinia* × *Trichoderma* × Nanocide | 50 | 4.448 | 0.089 | 1.6309** | 0.0069 |
| Error | 324 | 17.674 | 0.055 | | |
| Total | 431 | 425.659 | | | |
| ٪CV | 25.38 | | | | |

"ns –non significant", "*": significant at $P<0.01$. "**": significant at $P<0.05$.



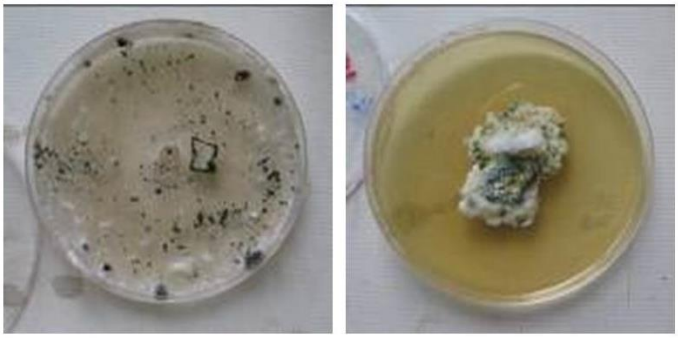

شکل۱- تاثیر نانوسید در کشت متقابل *Trichoderma koningii* (iso2) (پرگنه پایین برنگ تیره) با قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (SS2) (پرگنه بالایی برنگ روشن) در محیط‌کشت PDA حاوی مقادیر مختلف از نانوسید (۱۰ پی‌پی‌ام (۲)، ۳۰ پی‌پی‌ام (۳)، ۶۰ پی‌پی‌ام (۴)، ۱۰۰ پی‌پی‌ام (۵) و ۱۳۰ پی‌پی‌ام (۶)) در مقایسه با تشتک شاهد (۱) پس از یک هفته در ۲۱ درجهٔ سلسیوس و تاریکی.

Fig. 1. Effect of Nanocide on *T. koningii* (iso2) (lower dark colonies) and *Sclerotinia sclerotiorum* (upper light colonies) in dual culture on PDA containing different concentrations of Nanocide (10ppm (2), 30 ppm (3), 60 ppm (4), 100 ppm (5) and 130 ppm (6)) in comparison with control plate after one week at 21 °C in the dark.

## بررسی قدرت کلونیزاسیون جدایه‌های تریکودرما روی پرگنه قارچ *S. sclerotiorum* با سطوح مختلف نانوسید

در این آزمایش مشاهده گردید که تمامی جدایه‌های تریکودرما در تمام سطوح نانوسید توانایی رشد و اسپورزایی روی پرگنه‌ها را دارند. از بین جدایه‌های مورد بررسی، گونه‌های *T. atroviridae* (6022) و *T. harzianum* (1211) نسبت به سایر جدایه‌ها از سرعت رشد بیشتری برخوردار بودند و پس از یک هفته نیمی از پتری را فرا گرفتند و در نهایت تمام سطح پرگنه قارچ اسکلروتینیا را فرا گرفتند (شکل۲). *T. harzianum* (T21) نیز در حضور نانوسید کاملاً بر روی ریسه‌های اسکلروتینیا کلنی‌زایی نمود

اما در تیمار شاهد نتوانست به‌طور کامل ریسه‌های این قارچ را احاطه کند.

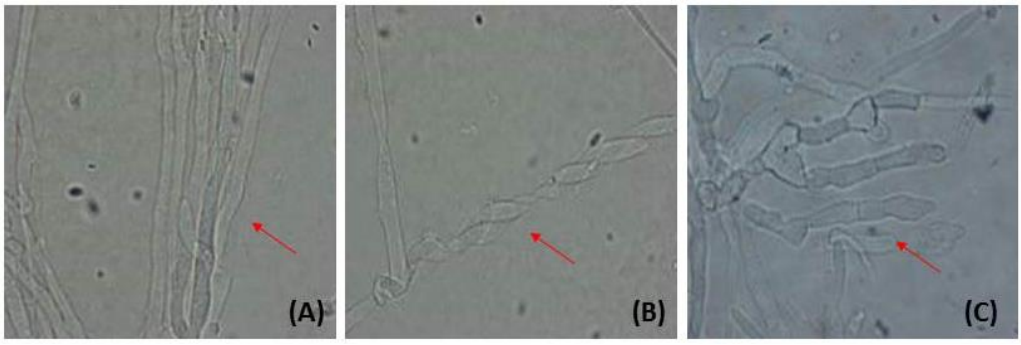


شکل۲- کلونیزاسیون جدایه (1211) *Trichoderma harzianum* روی پرگنه (SS2) *Sclerotinia sclerotiorum* در محیط کشت PDA حاوی ۱۳۰ پی‌پی‌ام نانوسید (راست) و شاهد بدون نانوسید (چپ) پس از ۱۰ روز در ۲۱ درجهٔ سلسیوس و تاریکی.

Fig. 2. Colonization of *Sclerotinia sclerotiorum* (SS2) by *T. harzianum* (1211) on PDA containing 130 ppm Nanocide (right) and control without Nanocide (left) after 10 days at 21 °C in the dark.

## بررسی میکروسکوپی تاثیر نانوسید روی ریسه قارچ تریکودرما و عامل بیمارگر *S. sclerotiorum*

نتایج میکروسکوپی هیچ گونه تغییری در ریسه‌های گونه‌های تریکودرما را نشان نداد اما با توجه به شکل۳، تغییراتی در ریخت‌شناسی ریسه اسکلروتینیا همراه با پیچش (شکل ۳–B) و ضخیم شدن در اثر کاربرد نانوسید، مشاهده شد.




شکل۳- تغییرات ریخت‌شناختی ریسه *Sclerotinia sclerotiorum* در محیط‌کشت PDA حاوی ۳۰ پی‌پی‌ام نانوسید. A) دسته‌ای شدن ریسه‌ها، B) پیچ خوردگی ریسه ، C) دفرمه شدن یا ضخیم شدن ریسه.

Fig. 3. Morphological changes of *Sclerotinia sclerotiorum* hyphae on PDA containing Nanocid: A) bunching of mycelia, B) curling of mycelia, C) deformation of mycelia.

## بررسی تاثیر محیط‌کشت حاوی نانوسید بر اسپورزایی *T. koningii*

شمارش اسپور قارچ *T. koningii* (iso2) در محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف نانوسید نشان داد که با افزایش میزان نانوسید، میزان اسپوردهی قارچ، کاهش پیدا کرد. با استناد به نتایج (جدول ۲)، بیشترین میزان اسپوردهی این قارچ نسبت به شاهد، سطح ۱۰ پی‌پی‌ام نانوسید بود که ۶/۷ درصد بازدارندگی از اسپورزایی داشت. غلظت‌های ۳۰ تا ۶۰ پی‌پی‌ام نانوسید به دلیل عدم دارا بودن اختلاف معنی‌دار، مناسب‌ترین غلظت‌ها برای مطالعات تکمیلی گلخانه‌ای در نظر گرفته شدند که پایداری جمعیت گونه‌های تریکودرما را نیز تضمین می‌نمایند.

جدول ۲– درصد بازدارندگی از اسپورزایی (iso2) *Trichoderma koningii* در غلظت‌های مختلف نانوسید در محیط PDA پس از پنج روز در ۲۱ درجهٔ سلسیوس در تاریکی.

Table 2. Percentage of the sporulation inhibition of *Trichoderma koningii* (iso2) on PDA containing different concentrations of nanocide after five days at 21 °C in the dark.

| Nanocide dosage (ppm) | Inhibition (%) |
|---|---|
| 10 | 6.70[a] |
| 30 | 11.10[ab] |
| 60 | 25.60[ab] |
| 100 | 44.40[b] |
| 130 | 55.60[b] |

میانگین‌های با حروف مشابه داخل هر ستون در سطح آماری ۱ درصد معنی دار نیستند.

Within columns, numbers fallowed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.01$

## نتایج گلخانه‌ای

### بررسی تاثیر قارچ‌کش و نانوسید همراه با تیمار سطحی بذر با سوسپانسیون گونه‌های تریکودرما

جداول تجزیه واریانس آزمایش‌های گلخانه‌ای در مرحله اول (پوشش سطحی بذر با سوسپانسیون گونه‌های تریکودرما) نشان داد که تاثیر تیمارهای مختلف بر روی هر سه مولفه‌های رشد گیاهچه (وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاهچه‌های ۲ ماهه کلزا) در سطح ۹۹ درصد معنی‌دار بود. نتایج مقایسه گروهی تیمارها (اورتوگونال) با استفاده از نرم افزار MSTAT–C نشان داد که تیمار گونه‌های تریکودرما به همراه نانوسید و قارچ‌کش روال‌تی‌اس با تیمار تریکودرما به تنهایی اختلاف معنی‌داری را در سطح یک درصد در وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاهچه کلزا از خود نشان داد. به طوری‌که تیمار تریکودرما بدون نانوسید و قارچ‌کش، تاثیر بهتری در وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاهچه ۲ ماهه کلزا داشته است. در مقایسه تیمار تریکودرما و نانوسید با تیمار تریکودرما و قارچ‌کش، اختلاف معنی‌داری در وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاه نشان نداد. اما این تفاوت در وزن خشک گیاه در سطح یک درصد معنی‌دار بود. همچنین تیمارهای دارای ۲ پی‌پی‌ام قارچ‌کش با تیمارهای دارای ۵ پی‌پی‌ام قارچ‌کش روورال‌تی‌اس، نیز تفاوت معنی‌داری در سطح پنج درصد در وزن ترگیاه نشان دادند اما این تفاوت در وزن تر و ارتفاع گیاهچه کلزا معنی‌دار نبود. شاهد آلوده با تیمارهای همراه با تریکودرما و نانوسید و قارچ‌کش در وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاهچه تفاوت در سطح یک درصد را نشان داد. نظر به نتایج حاصل در جدول ۳ در آزمایش‌های گلخانه‌ای مرحله اول بیشترین میزان وزن تر گیاه مربوط به تیمار *T. harzianum* (1211) (شاهد) بود. بیشترین وزن خشک مربوط به *T. atroviridae* (6022) +۳۰ پی‌پی‌ام نانوسید بود که تفاوت معنی‌داری با تیمار *T. harzianum* (1211) و *T. atroviridae* (6022) نداشت. کمترین وزن تر و خشک نیز مربوط به تیمار شاهد آلوده می‌باشد. بیشترین ارتفاع گیاه نیز مربوط به تیمار *T. koningii* (iso2) (شاهد) و کمترین آن مربوط به *T. koningii* (iso2)+ ۲ پی‌پی‌ام روورال‌تی‌اس بود. در مجموع از میان گونه‌های تریکودرما در این آزمایش، کارکرد قارچ *T. harzianum* (1211) در مقایسه با سایر تیمارها تاثیر بیشتری روی میانگین وزن تر و خشک و ارتفاع گیاه نشان داد.

جدول۳-تاثیر قارچ‌کش و نانوسید بر روی وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاهچه‌های ۲ ماهه کلزا در شرایط گلخانه به‌روش آغشته سازی بذور به قارچ تریکودرما

Table 3. Effect of Fungicide and Nanocide on fresh and dry weight, and height of two–month–old canola seedlings in greenhouse condition in the seed coating method.

| Treatments | Plant height mean (cm) | Dry weight mean (mg) | Fresh weight mean(g) |
|---|---|---|---|
| *T. koningii* (iso2) | $11.25^{A}$ | $60^{D}$ | $0.86^{ABC}$ |
| 2 ppm Rovral TS +*T. koningii* (iso2) | $5^{D}$ | $35^{I}$ | $0.44^{D}$ |
| 5 ppm Rovral TS + *T. koningii* (iso2) | $8.87^{ABC}$ | $70^{B}$ | $1.01^{AB}$ |
| 10 ppm Nanocide +*T. koningii* (iso2) | $5.3^{CD}$ | $35^{I}$ | $0.51^{CD}$ |
| 30 ppm Nanocide +*T. koningii* (iso2) | $6.25^{BCD}$ | $60^{D}$ | $0.90^{ABC}$ |
| *T. harzianum* (1211) | $8.82^{ABC}$ | $74.2^{A}$ | $1.06^{A}$ |
| 2 ppm Rovral TS +*T. harzianum* (1211) | $9.32^{AB}$ | $68^{C}$ | $0.89^{ABC}$ |
| 5 ppm Rovral TS +*T. harzianum* (1211) | $7.25^{BCD}$ | $30^{J}$ | $0.56^{CD}$ |
| 10 ppm Nanocide + *T. harzianum* (1211) | $8.25^{ABCD}$ | $43^{G}$ | $0.61^{BCD}$ |
| 30 ppm Nanocide + *T. harzianum* (1211) | $7.37^{BCD}$ | $46^{F}$ | $0.66^{ABCD}$ |
| *T. atroviridae* (6022) | $8.87^{ABC}$ | $75.7^{A}$ | $0.91^{ABC}$ |
| 2 ppm Rovral TS +*T. atroviridae* (6022) | $8^{ABCD}$ | $40^{H}$ | $0.52^{CD}$ |
| 5 ppm Rovral TS +*T. atroviridae* (6022) | $7.65^{BCD}$ | $39.5^{H}$ | $0.83^{ABCD}$ |
| 10 ppm Nanocide +*T. atroviridae* (6022) | $7.87^{ABCD}$ | $53.5^{E}$ | $0.83^{ABCD}$ |
| 30 ppm Nanocide +*T. atroviridae* (6022) | $7.82^{ABCD}$ | $76^{A}$ | $0.71^{ABCD}$ |
| Untreated control | $8.37^{ABCD}$ | $53.2^{E}$ | $0.64^{BCD}$ |
| Infected control | $7^{BCD}$ | $25^{K}$ | $0.66^{ABCD}$ |
| LSD | 3.576 | 1.89 | 0.3455 |

میانگین‌های با حروف مشابه داخل هر ستون در سطح آماری ۱ درصد معنی دار نیستند.

Within columns, numbers fallowed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.01$

## بررسی تاثیر قارچ‌کش و نانوسید همراه با کاربرد گونه‌های تریکودرما به صورت مخلوط با خاک

جداول تجزیه واریانس آزمایش‌های گلخانه‌ای مرحله دوم (کاربرد گونه‌های تریکودرما به صورت مخلوط با خاک) نشان دادند که تاثیر تیمارهای مختلف بر روی وزن تر و خشک گیاهچه‌های ۲ ماهه کلزا در سطح ۹۹ درصد معنی‌دار شد و بر روی ارتفاع گیاهچه‌ها این تفاوت غیرمعنی‌دار بود. نتایج مقایسه گروهی تیمارها (اورتوگونال) نشان داد که تیمار گونه‌های تریکودرما به همراه نانوسید یا قارچ‌کش با تیمار تریکودرما به تنهایی اختلاف معنی‌داری را در وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاه کلزا از خود نشان نداد. تیمار تریکودرما و نانوسید با تیمار تریکودرما و قارچ‌کش، اختلاف معنی‌داری را در وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاه نشان نداد. تیمارهای دارای مقدار ۱۰ پی‌پی‌ام نانوسید با تیمارهای دارای مقدار ۳۰ پی‌پی‌ام نانوسید با هر دو جدایه *T. harzianum* (1211) و *T. atroviridae* (6022)، تفاوت معنی‌داری در وزن تر و وزن خشک و ارتفاع گیاه نداشتند. همچنین تیمارهای دارای ۲ پی‌پی‌ام قارچ‌کش با تیمارهای دارای ۵ پی‌پی‌ام قارچ‌کش رورال‌تی اس، نیز تفاوت معنی‌داری در وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاه نداشتند. شاهد آلوده با بقیه تیمارهای دارای تریکودرما و نانوسید و قارچ‌کش تفاوت معنی‌داری در سطح ۱درصد در وزن تر و خشک گیاه داشت اما ارتفاع گیاه تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. تیمار شاهد سالم با بقیه تیمارها

تفاوت معنی‌داری را در وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاه نشان نداد. آزمایش‌های گلخانه‌ای مرحله دوم نشان داد که بیشترین وزن تر مربوط به تیمار (1211) *T. harzianum* + ۳۰ پی‌پی‌ام نانوسید بود که تفاوت معنی داری با تیمار *T. harzianum* (1211) + ۱۰ پی‌پی‌ام نانوسید نداشت (جدول ۴). بیشترین وزن خشک مربوط به (1211) *T. harzianum* + ۳۰ پی‌پی‌ام نانوسید و بیشترین ارتفاع گیاه نیز مربوط به تیمار (1211) *T. harzianum*+ ۲ پی‌پی‌ام رورال‌تی‌اس بود. کمترین وزن تر و خشک گیاهچه کلزا مربوط به شاهد آلوده و کمترین ارتفاع مربوط به تیمار *T. atroviridae* (6022)+ ۱۰ پی‌پی‌ام نانوسید بود. گروه‌بندی آماری (اورتوگونوال) نیز نشان داد، تیمارهایی که در آن‌ها تریکودرما به تنهایی به‌کار رفته بود با تیمارهایی که نانوسید و قارچ‌کش هم اضافه شده بودند تفاوت معنی‌داری را در وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاه نشان نداد. بین دو مقدار نانوسید و نیز دو مقدار از قارچ‌کش نیز در سه صفت ذکر شده تفاوت معنی‌داری وجود نداشت و تیمارهای دارای نانوسید با تیمارهای دارای قارچ‌کش نیز تفاوت معنی‌داری را در وزن تر، وزن خشک و ارتفاع گیاه نشان ندادند.

جدول ۴- تاثیر تیمارهای مختلف بر روی وزن تر، خشک و ارتفاع گیاهچه‌های ۲ ماهه کلزا در شرایط گلخانه به روش کاربرد گونه‌های تریکودرما به صورت مخلوط با خاک.

Table 4. Effect of different treatments on fresh weight, dry weight, and height of two month–old canola seedlings in greenhouse condition using *Trichoderma* spp. mix with soil.

| Treatments | plant height mean(cm) | dry weight (mg) | fresh weight (g) |
|---|---|---|---|
| *T. harzianum* (1211) | $8.37^{AB}$ | $59.5^{BC}$ | $0.812^{AB}$ |
| 2ppm Rovral TS +*T. harzianum* (1211) | $12.5^{A}$ | $59.7^{BC}$ | $0.807^{AB}$ |
| 5ppm Rovral TS +*T. harzianum* (1211) | $8.5^{A}$ | $52.2^{D}$ | $0.697^{ABC}$ |
| 10ppm Nanocide + *T. harzianum* (1211) | $10^{AB}$ | $63.5^{AB}$ | $0.950^{A}$ |
| 30ppm Nanocide + *T. harzianum* (1211) | $9.62^{AB}$ | $69.2^{A}$ | $0.987^{A}$ |
| *T. atroviridae* (6022) | $8^{AB}$ | $24.2^{F}$ | $0.307^{D}$ |
| 2ppm Rovral TS +*T. atroviridae* (6022) | $8.5^{AB}$ | $44.5^{E}$ | $0.770^{AB}$ |
| 5ppm Rovral TS + *T. atroviridae* (6022) | $8.6^{AB}$ | $40.0^{E}$ | $0.520^{BCD}$ |
| 10ppm Nanocide +*T. atroviridae* (6022) | $6^{B}$ | $27.0^{F}$ | $0.380^{CD}$ |
| 30ppm Nanocide +*T. atroviridae* (6022) | $7.75^{AB}$ | $27.2^{F}$ | $0.370^{CD}$ |
| شاهد سالمUntreated control | $8.37^{AB}$ | $53.2^{CD}$ | $0.772^{ABC}$ |
| شاهد آلوده Infected control | $6.75^{B}$ | $28.7^{F}$ | $0.370^{CD}$ |
| LSD | 4.926 | 6.081 | 0.374 |

میانگین‌های با حروف مشابه داخل هر ستون در سطح آماری ۱درصد معنی دار نیستند.

Within columns, numbers followed by the same letter are not significantly different $P \leq 0.01$.

## بحث

نظر به بررسی‌های انجام شده در این تحقیق، سرعت رشد گونه‌های تریکودرما بسیار بیشتر از قارچ عامل بیمارگر بود. به‌طوری‌که در محیط‌کشت فاقد ماده نانوسید (شاهد) پس از طی۳ روز، جدایه‌های تریکودرما تمام سطح پرگنه قارچ بیماری‌زا را پوشاندند و با اشغال محل رشد و پوشش زیاد روی ریسه‌های عامل بیمارگر پخش شدند و با رشد رویشی بیشتر، تولید اسپور نمودند. جدایه‌های *T. koningii*

(iso2)، *T. harzianum* (1211) و *T. atroviridae* (6022) بیشترین توانایی پوده‌رُستی و رشد را روی ریسه‌های قارچ عامل بیمارگر اسکلروتینیا در محیط‌کشت غذایی PDA از خود نشان دادند. از تیمار سطح ۳۰ پی‌پی‌ام نانوسید به بعد، هر دو قارچ رشد کمی داشتند و حتی در برخی تیمارها که رشد هر دو قارچ حدوداً ۱ میلی‌متر بود، ریسه‌ها به صورت متورم و توده‌ای شکل شده و تولید ریسه‌های هوایی نمودند که این نشان دهنده فعال بودن ریسه‌ها در شرایط سمی بودن محیط‌کشت حاوی نانوسید بود. اما در مقادیر ۶۰، ۱۰۰ و ۱۳۰ پی‌پی‌ام نانوسید، رشد هر دو قارچ از نظر آماری به‌طور معناداری کاهش پیدا کرد. که نتایج این آزمایش با تحقیقات مهدی‌زاده و همکاران (۲۰۱۵) مطابقت داشت. این محققان هم نشان دادند که رشد *S. sclerotiorum* در محیط‌کشت PDA حاوی غلظت‌های بالاتر از ۶ پی‌پی‌ام نانوسید کاملاً سرکوب شده بود. اما رشد *T. harzianum* از ۱۲ پی‌پی‌ام نانوسید، ۱۰۰درصد بازدارندگی رشد را نشان داد (Mahdizadeh *et al.*, 2015). این نتایج نیز نشان‌دهنده حساسیت بیشتر قارچ بیمارگر اسکلروتینیا به محیط‌کشت حاوی نانوسید، نسبت به قارچ تریکودرما بود. تفاوت در واکنش قارچ‌ها به ذرات نانو نقره می‌تواند به نحوه عمل متفاوت ذرات نانونقره ربط داده شود همان‌طور که در مورد مکانیسم‌های مقاومتی متفاوتی که در قارچ‌های مختلف وجود دارد، رخ می‌دهد (Clement & jarret, 1994). با توجه به نتایج جدول (۳) و گروه بندی آماری در مرحله اول آزمایشات گلخانه‌ای که قارچ آنتاگونیست به صورت پوشش سطحی بذر به کار گرفته شد، تیمارهایی که در آن بذر فقط آغشته به تریکودرما بودند، نسبت به تیمارهایی که علاوه بر تریکودرما با قارچ‌کش و یا نانوسید نیز پوشش سطحی داده شدند، درصد بازدارندگی بیشتری از قارچ عامل بیماری را نشان دادند. دلیل این امر احتمالاً می‌تواند این باشد که پوشش مجدد بذر با نانوسید و قارچ‌کش می‌تواند باعث نابود شدن و از بین رفتن اسپورهای تریکودرما که بر روی بذر وجود دارند، شود و از کارایی آنتاگونیستی گونه‌های تریکودرما بکاهد. همچنین در بررسی‌های آزمایشگاهی که تاثیر نانوسید بر روی اسپورزایی گونهٔ تریکودرما مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که اسپورزایی قارچ *T. koningii* (iso2) با افزایش غلظت نانوسید کاهش پیدا کرد (جدول ۲). بیشترین میزان اسپوردهی این قارچ نسبت به شاهد، زمانی رویت گردید که محیط‌کشت غذایی حاوی ۱۰ پی‌پی‌ام نانوسید دارای ۶/۷ درصد بازدارندگی از اسپورزایی گونه‌ی تریکودرما بود. Mahdizadeh *et al*. (2015) نیز اثر نانوسید را بر روی گیاه خربزه آلوده به قارچ بیمارگر *Macrophomina phaseolina* بررسی نمودند و دریافتند که با اضافه نمودن نانوسید با غلظت ۶ پی‌پی‌ام به خاک آلوده به عامل بیمارگر، پارامترهای رشدی همچون ارتفاع ، وزن تر و خشک ریشه و اندام هوایی با گیاه شاهد سالم، برابر است. در بین آزمایش‌های گلخانه‌ای مرحله اول و دوم، بالاترین میزان افزایش در وزن تر و وزن خشک گیاه، متعلق به آزمایش پوشش دادن سطحی بذر با سوسپانسیون اسپور گونه‌های تریکودرما بود. در حالی‌که ارتفاع گیاه در آزمایش کاربرد گونه‌های تریکودرما به صورت مخلوط با خاک، بالاترین سطح را نشان داد. در پژوهشی که Alamdarlou *et al*. (2009) تاثیر نانوسید بر روی *S. sclerotiorum* را طی چند بار محلول‌پاشی روی گیاه کلزا بررسی کردند، نتایج حاصل نشان داد که با اضافه کردن غلظت‌های مختلف نانوسید به محیط‌کشت، پس از ۸ روز هیچ رشد میسلیومی یا تولید اندام سختینه در سطوح بالاتر از۱۰ پی‌پی‌ام وجود نداشت و پس از ۱۴ روز تعداد کمی اندام سختینه در مقادیر بیش از ۱۰ پی‌پی‌ام تشکیل گردید. میزان مقاومت جدایه‌های مورد بررسی قارچ بیمارگر در این آزمایش و نیز شرایط تحقیق قبلی به نظر تنها عوامل تاثیرگذاری هستند که می‌توان به آن‌ها اشاره نمود. با توجه به اظهار نظر موخرجه (۲۰۱۳)، با طولانی شدن مدت زمان آزمایش (۱۴ روز)، قرار داشتن بیشتر ریسه قارچ بیمارگر در معرض شرایط تنش‌زای ناشی از وجود نانوسید در محیط کشت باعث تغییر چرخه زندگی آن و منجر به تولید اندام سختینه گردیده که این پدیده در بررسی حاضر نیز مشاهده شد (Mukherjee *et al.*, 2013). دلیلی و همکاران (۲۰۱۵) میزان $EC_{50}$ قارچ‌کش روال‌تی اس روی *S. sclerotiorum*، ۰/۳۵۱۳ اعلام نمودند ونشان

دادند غلظت ۱ پی‌پی‌ام از آن، سبب بازداری کامل از رشد بیمارگر روی محیط‌کشت شده است (Dalili *et al.*, 2015). در پژوهش دیگری، منتظرنیا (۲۰۰۸) به منظور بررسی تاثیر قارچ‌کش روی رشد میسلیومی قارچ عامل پوسیدگی زغالی سویا *Macrophomina phaseolina* و قارچ آنتاگونیستی *T. harzianum* از مقادیر ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۰۰ پی پی‌ام روال‌تی‌اس استفاده کرد. نتایج آزمایش کشت متقابل بر روی گونه‌ی تریکودرما نشان داد که در سطوح ۱۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام گونه‌ی تریکودرما هیچ گونه رشدی نداشته است و فقط در سطح ۵ پی‌پی‌ام برخی از گونه‌های تریکودرما سازگاری به رشد پیدا نمودند و تمامی جدایه‌های تریکودرما توانایی رشد و گسترش میسلیومی خود را از سطح ۲ پی‌پی‌ام تا کمترین میزان ۰/۱ پی‌پی‌ام قارچ‌کش حفظ نمودند. سپس در بررسی‌های گلخانه‌ای که از سطح ۵ پی‌پی‌ام استفاده شد. مشخص گردید که ارتفاع گیاهچه‌های سویا در تیمار کاربرد توام جدایه *T. harzianum* MKR132، قارچ‌کش روال‌تی‌اس و مایه تلقیح عامل بیمارگر، بیشتر از سایر تیمارها و حتی تیمار شاهد تلقیح نشده، بود (Montazernia, 2008). لازم به یاد آوری است گونه‌های *T. harzianum* (1211) و *T. atroviridae* (6022) که در این تحقیق استفاده شده است، همان گونه‌های تریکودرما مورد بررسی در تحقیق منتظرنیا (۲۰۰۸) بودند. بنابراین، وجود تفاوت در نتایج بررسی حاضر با نتایج سایر محققان نشان می‌دهد که گونه‌های تریکودرما در برابر بیمارگرها، تنش‌های محیطی و حتی در برابر مواد سمی مانند قارچ‌کش‌ها، واکنش‌های متفاوتی را از خود بروز می‌دهند. در این میان، میزان تحمل گیاه نیز می‌تواند با توجه به گونه بیمارگر و زمان محلول‌پاشی با قارچ‌کش‌ها متفاوت باشد (Kia & Rahnama, 2016). براساس نتایج حاصل تیمار بذر با میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست با توجه به مزایایی که دارد برای مهار بیماری‌های بذرزاد و خاکزاد مناسب می‌باشد. از مزایای این روش می‌توان به حجم کم مایه آنتاگونیست مورد نیاز جهت پوشش بذر اشاره کرد. علاوه بر آن، وقتی آنتاگونیست به خاک اضافه می‌شود نسبت به حالتی که به صورت پوشش دادن بذر به کار می‌رود ممکن است احتمال کمتری برای تماس با ریشه‌های گیاهان داشته باشند. به علاوه، این روش ارزان‌ترین راه برای اضافه کردن آنتاگونیست‌ها به خاک برای محافظت گیاهان از عوامل بیماری‌زای خاک‌زی است (Fernando *et al.*, 2004). طبق نتایج منتظرنیا (۲۰۰۸)، آغشته کردن بذرهای سویا به سوسپانسیون جدایه‌های تریکودرما در مقایسه با روش افزودن مایه قارچی به خاک، در تمام تیمارهای مورد بررسی به جز *T. harzianum* MKR1321 + *M. phaseolina* باعث افزایش درصد گیاهان سالم شد. وی همچنین نشان داد که رشد طولی گیاه در تیمار کاربرد توام قارچ‌کش روال تی‌اس با گونه‌های تریکودرما به طور مشهودی بیشتر بود که با بررسی‌های انجام شده در این تحقیق مطابقت ندارد (Montazernia 2008). علت بروز این تفاوت را با احتمال بیشتری می‌توان به شرایط انجام دو آزمایش و نوع گیاه نسبت داد. با وجود این، در بررسی‌های دیگری در شرایط گلخانه، این قارچ‌کش روی کاهش طول زخم ساقه کلزا در اثر آسیب *S. sclerotiorum* و نیز افزایش میزان وزن تر و خشک گیاه تاثیر چندانی نداشت و میانگین‌های به دست آمده با میانگین شاهد آلوده تفاوت معنی‌داری نداشتند (Kia & Rahnama, 2016).

## نتیجه‌گیری و پیشنهادها

نظر به این تحقیق، کاربرد نانوسید و قارچ‌کش با گونه‌های قارچ عامل مهار زیستی تریکودرما به صورت توام توصیه نمی‌شود. به‌خصوص وقتی که گونه‌های تریکودرما به صورت آغشته به بذر بکار رود. اما در شرایطی که مایه قارچی با گونه‌های تریکودرما قبل از کشت به خاک اضافه شود تلفیق نانوسید و قارچ‌کش می‌تواند برای مهار بیشتر بیماری موثر باشد، اما در کل این تیمارها تفاوت معنی‌داری را با تیمارهای شاهد که فقط گونه‌های تریکودرما به کار رفته بود نشان ندادند. در میان گونه‌های تریکودرما، *T. harzianum* (1211) که در آزمایش‌های گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفته بودند، بیشترین وزن تر و وزن خشک را برای گیاه در پی داشت و با افزایش ارتفاع گیاه که مربوط به اثر تیمار *T. koningii* (iso2) بود نیز تفاوت معنی‌داری را با

گونه فوق نشان نداد. بنابراین در بررسی‌های آینده پیشنهاد می‌شود جهت کاربرد توام سموم مورد آزمایش در این بررسی و انتخاب دو گونه تریکودرما که تحمل و یا سازگاری بیشتری با نانوسید داشته‌اند از این شیوه تلفیقی بهره گرفته و اثرات متقابل را به صورت میدانی بر علیه عامل بیمارگر در شرایط خاک مزرعه مورد آزمایش تکمیلی قرار دهند.

**References**


Alamdarlou, M.R., Zaman Mirabadi, A., Esmailifar, A. & Foroozan, K. 2009. Study on the effect of number of sprayings with fungicides on rapeseed *Sclerotinia* stem rot control. The 17th Australian plant pathology society conference 225–226, Newcastle, Australia.

Alamdarlou, M.R., Salari, M., Aghajani, M.A., Panjekeh, N. & Sabbagh, S.K. 2018. Effect of Some Fungicides on Causal Agent of *Sclerotinia* Stem Rot Disease of Rapeseed in Mazandaran Province. Journal of Applied Research in plant protection, 7(3): 103–115. (In Persian with English Summary).

Alkooranee, J.T., Aledan, T.R., Ali, A.K., Lu, G., Zhang, X., Wu, J., Fu, C. & Li, M. 2017. Detecting the hormonal pathways in oilseed rape behind induced systemic resistance by *Trichoderma harzianum* TH12 to *Sclerotinia sclerotiorum*, 12(1).

Ashrafi, S.J., Falahati Rastegar, M., Jafarpour, B., Tahmasebi, N. & Anil Kumar, S. 2010. Study on the effectiveness of silver Nano particles in controlling *Fusarium* wilting of lentil. 19th Iranian plant protection congress 7–8, Tehran, Iran.

Chaparro, A.P., Carvajal, L.H. & Orduz, S. 2011. Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains. Agricultural Sciences, 2(3): 301–307.

Cho, K.H., Park, J.E., Osaka, T. & Park, S.G. 2005. The study of antimicrobial activity and preservative effects of Nanosilver ingredient. Electrochimica Acta, 51(5): 956– 960.

Clarkson, J.P., Phelps, K., Whipps, J.M., Young, C.S., Smith, J.A. & Watling, M. 2004. Forecasting *Sclerotinia* disease on lettuce: Toward developing a prediction model for carpogenic germination of *Sclerotinia*. Phytopathology, 94(3): 268–279.

Clement, J.L. & Jarret, P.S. 1994. Antimicrobial silver. Metal–Based Drugs, 1(5–6): 467–482.

Dalili, A., Bakhtiari, S., Barari, H. & Aldaghi, M. 2015. Effect of some fungicides against the growth inhibition of *Sclerotinia sclerotiorum* mycelial compatibility groups. Journal of Plant Protection Research, 55(4): 354–361. (In Persian with English Summary).

Dehghan, M.A. 2010. Investigation and comparison effect of Nanosilver and Defenconazole fungicide in control seed treatment of wheat covered smut. Proceedings 19th Iranian plant protection congress. Tehran, Iran, 836–837.

Derbyshire, M.C. & Denton Giles, M. 2016. The control of *sclerotinia* stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): Current practices and future opportunities. Plant Pathology, 65: 859–877.

Elad, Y., Katan, J. & Chet, I. 1980. Physical, biological and chemical control integrated for soilborne disease in potato. Phytopathology, 70(5): 418–442.

Expert, J.M. & Digat, B. 1995. Biocontrol of *Sclerotinia* wilt of sunflower by *Pseudomonas putida* strains. Canadian Journal of Microbiology, 41(8): 685–691.

Fernando, W.G.D., Nekkeeran, S. & Zhang, Y. 2004. Ecofriendly methods in combating *Sclerotinia sclerotiorum*(lib.) de Bary. Developmental and Environmental Biology, (1): 329–347.

Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A. & Rai, M. 2009. Fungus–mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. Nanomedicine, 5(4): 382–386.

Glick, BR. 2020. Biocontrol of Bacteria and Fungi, Beneficial Plant–Bacterial Interactions. Springer, 181–230.

Habibi, R., Rahnama, K. & Taghinasab, M. 2015. Evaluating the effectiveness of native *Trichoderma* species in fproduction of extracellular enzymes during interaction with plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Applied Research in Plant Protection, 4(2): 73–85. (In Persian with English Summary).

Harman, G.E. 1996. *Trichoderma* for biocontrol of plant pathogens: from basic research to commercialized products. Proceedings of Cornell community conference on biological control April 11–13. http://www.nysaes.cornell.edu/ent/bcconf/talks /harman.html (verified August 12, 2011) 52. Harman, G.E., Taylor, A.G

Harman, G.E., Howell, C.R., Vibterbo, A., Chet, I. & Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Microbiology, 2(1): 43–56.

Hornby, D. 1997. Biological control of Soil–borne Plant Pathogens. CAB International Publishing Division, 826 pp.

Howell, C.R., Devay, J.E., Garber, R.H. & Batson, W.E. 1997. Field control of cotton seedling diseases with *Trichoderma virens* in combination with fungicide seed treatments. Cotton Science, 1(1): 15–20.

Jabbari, H., Mansouri, N., Abdollahi, A., Chehrehei, M. & Naddafi K. 2009. Studying the effect of nanosilver painting on control of air–transmitted fungi. Health and environment, 2(1): 28–35. (In Persian with English Summary).

Jambhulkar, P.P., Sharma, P., Manokaran, R., Lakshman, D.K., Rokadia, P. & Jambhulkar, N. 2018. Assessing synergism of combined applications of *Trichoderma harzianum* and *Pseudomonas fluorescens* to control blast and bacterial leaf blight of rice. European Journal of Plant Pathology, 152: 747–757

Lehner, M.S., De Paula Junior, T.J., Del Ponte, E.M., Mizubuti, E.S.G. & Pethybridge, S.J. 2017. Independently founded populations of *Sclerotinia sclerotiorum* from a tropical and a temperate region have similar genetic structure. PLoS ONE, 12(3). e0173915.

Li, T., Huang, W. & Yu, H. 2022. Synergetic Antimicrobial Effect of Silver Nanoparticles Conjugated with Iprodione against *Valsa mali*. Materials, 15(15): 5147.

Kia, S. & Rahnama, K. 2016. Study on the efficiency of *Trichoderma* isolates in controlling charcoal rot disease of soybean caused by *Macrophomina phaseolina* under greenhouse conditions. Biocontrol in Plant Protection 4(1): 1–10. (In Persian with English Summary).

Lederer, W., Lorenz, K.H. & Seemuller, E. 1992. Studies on Antagonistic effects of *Trichoderma* isolates against *Phytophthora cactorum*. Phytopathology, 136(2): 154–164.

Lipovsky, A., Nitzan, Y., Gendanken, A. & Lubart, R. 2011. Antifungal activity of ZNO nanoparticles–the role of ROS mediated cell injury. Nanotechnology, 22(10): 101–105.

Liu, C.Q., Du, D.Z. & Zou, C.S. 1990. Initial studies on tolerance to *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib De Bary.) in *Brassica napus* L. Proceedings of Symposium of China International Rapeseed Sciences. Shanghai, China, 70–71.

Mahdizadeh, V., Safaie, N. & Khelghatibana, F. 2015. Evaluation of antifungal activity of silver nanoparticles against some phytopathogenic fungi and *Trichoderma harzianum*. Journal of cop protection, 4(3): 291–300.

Montazernia, B. 2008. Evaluation of integrated management potential to control of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) in soybean by *Trichoderma* spp. M.sc. Thesis, Gorgan university of Agricultural sciences and Natural Resources.

Mukherjee, P.K., Horwitz, B.A., Singh, U.S., Mukherjee, M. & Schmoll, M. 2013. *Trichoderma*: biology and applications, CABI 230–246.

Naseripour, T., Nasrollah Nezhad, S., Shahbazi, S. & Rahnama, K. 2015. Using gamma–ray to increased exoglucanase activity in *Trichoderma* and improvement of *Sclerotinia* rot of canola biocontrol. Biological Forum, 7(2): 57–60.

Rahnama, K., Vakili, Z. & Razavi, S.I. 2004. Distribution of canola stems white rot (*Sclerotinia sclerotiorum*) in Golestan province and its control. The Second Proceeding of National oil seeds festival. Gorgan, Iran, 34–35.

Safarimotlagh, M.R. & Abolghasemi, S. 2019. Biological control of crown rot disease of canola by isolates of *Trichoderma in vitro* and under greenhouse conditions. Plant protection, 42(2): 1–18.

Sharma, P., Meena, P.D., Verma, P.R., Saharan, G.S., Mehta, N., Singh, D. & Kumar, A. 2015. *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary causing *Sclerotinia* rot in oilseed Brassicas: A. review. Journal of oilseed Brassicae 6: 1–44.

Sharma, J., Singh, V.K., Kumar, A., Shankarayan, R. & Mallubhotla, S. 2018. Role of Silver Nanoparticles in treatment of plant disease. Microbial Biotechnology, 2: 435–454.

Tian, B., Xie, J., Fu, Y., Cheng, J., Li, B.O., Chen, T., Zhao, Y., Gao, Z., Yang, P. & Barbetti, M.J. 2020. A cosmopolitan fungal pathogen of dicots adopts an endophytic lifestyle on cereal crops and protects them from major fungal diseases. The ISME Journal, 14: 3120–3135.

Vakili Zarj, Z., Rahnama, K. & Rahnama, M. 2013. The comparative growth and determination of the isolates reaction of *Sclerotinia sclerotiorum* on oilseed rape cultivars. International journal of agronomy and plant production, 4(5): 928–935.

# Simultaneous effects of Nanocide, Fungicide and *Trichoderma* fungi on the Canola Seedlings Affected by Stem Rot Pathogen, *Sclerotinia sclerotiorum*

**Fatemeh Soltani Nezhad[1], Kamran Rahnama[2], Seyed Javad Sanei[3]**

1., 2., 3. Ph.D. Student, Associated Professor, Assistant Professor, Department of Plant Protection Faculty of Plant production, Agricultural Sciences and Natural Resources of Gorgan University, Iran.

Corresponding author: Fatemeh soltani nezhad, email: soltani_f79@yahoo.com

Received: Oct., 14, 2023 10(2) 109–124 Accepted: Nov., 13, 2023

**Abstract**

In this research, the compatibility of *Trichoderma* species along with Nanocide and fungicide for the integrated management of this pathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum*, has been studied. For this purpose, the effect of three isolates of *Trichoderma harzianum*, one isolate of *T. virens*, one isolate of *T. atroviride* and one isolate of *T. koningii* on the three isolates of pathogenic agent (SS1, SS2, SS3) in PDA medium containing 5 levels of Nanocide (0,30,60,100,130) by dual culture technique in the laboratory condition were studied. Then the effects of *T. harzianum* (1211), *T koningii* (iso2) and *T. virens* (6011) with two levels of Noniocid (10 & 30 ppm) and Iprodione+carbendazim fungicide (2 & 5 ppm) on one isolate of pathogenic agent in greenhouse condition, were evaluated. The lowest inhibition of mycelia growth of *S. sclerotiorum* in PDA medium with Nanocide, was 6%, that indicated for treatment *S. sclerotiorum* (SS2) × *T. virens* (6011) at level 10 ppm. In greenhouse condition, *Trichoderma* spp were tested in two stages, seed coated with *Trichoderma* conidia cell suspension and use *Trichoderma* mixed with soil. The evaluated parameters were height and wet and dry weight of the plant. The first experiment, was seed coated with *Trichoderma* conidia cell suspension, the most fresh weight was for *T. harzianum* (1211) as control and the most height was for *T. koningii* (iso2) alone. The second experiment, was for *Trichoderma* mixed with soil showed a significant increase in the most fresh and dry weight were for *T. harzianum* (1211) + 30 ppm Nanocide treatment and the most height of seedlings was also for *T. harzianum* (1211) + 2 ppm Iprodione–carbendazim ($P \leq 0.01$). the statistical grouping showed that the treatments in which *Trichoderma* species were used alone showed no significant difference with treatments with Nanocid and fungicide in the wet and dry weight and height plant. Beside, using *Trichoderma* alone rather than the combination of Nanocid and fungicide, showed the better effect on growth parameters of the infected canola.

**Keywords:** Integrated management, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma*, Nanocid, Iprodione+carbendazim fungicide