کنترل بیولوژیک *Sclerotinia sclerotiorum* (عامل بیماری کپک سفید سیب‌زمینی) توسط گونه‌های مختلف *Trichoderma* و *Coniothyrium minitans*

سید محمدرضا اجاقیان[۱]، دوستمراد ظفری[۱*] و غلام خداکرمیان[۱]

تاریخ دریافت: ۸۷/۴/۱۰ تاریخ پذیرش: ۸۸/۹/۲۱

۱- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و دانشیاران گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

*مسئول مکاتبه E-mail:zafari_d@yahoo.com

چکیده

با شیوع خشکیدگی ساقه و مرگ زودهنگام بوته‌های سیب‌زمینی در سطح وسیعی از مزارع استان همدان، به جداسازی و شناسایی عامل این بیماری اقدام شد. در نتیجه، عامل بیماری به عنوان *Sclerotinia sclerotiorum* شناسایی گردید. با توجه به خسارت این بیماری و عدم کنترل آسان آن توسط روش‌های زراعی و شیمیایی، اثر بیوکنترلی پنج گونه تریکودرما شامل *T. ceramicum*، *T. koningii*، *T. koningiopsis*، *T. virens* و *T. viridescens* و یک جدایه از گونه *Coniothyrium minitans* روی عامل بیماری بررسی شد. همه عوامل بیوکنترلی مذکور، با درجات مختلف باعث کنترل این بیمارگر در شرایط آزمایشگاه شدند، به طوری که در بررسی تاثیر ترکیبات فرار در رشد میسلیومی بیمارگر، بیش‌ترین درصد بازدارندگی به میزان ۵۶% مربوط به *T. koningiopsis* و در بررسی تاثیر ترکیبات خارج سلولی در غلظت‌های ۳۰ و ۱۵ درصد، بیش‌ترین درصد بازدارندگی بر رشد میسلیوم بیمارگر مربوط به *T. ceramicum* به ترتیب به میزان ۶۹ و ۵۳ درصد بود. *T. koningiopsis*، *T. viridescens* و *T. ceramicum* در کشت متقابل به طور کامل از تشکیل سختینه‌ها جلوگیری کردند و روی میسلیوم بیمارگر مستقر شده و تولید اسپور نمودند. هم‌چنین در بررسی اثر سوسپانسیون اسپور عوامل بیوکنترل مذکور بر جوانه‌زنی میسلیوژنیک سختینه‌ها، بیش‌ترین درصد کاهش جوانه‌زنی در تیمار با *T. ceramicum* و *T. koningiopsis* و حداقل تاثیر در تیمار *T. virens* و *C. minitans* مشاهده گردید. *T. koningiopsis*، *T. ceramicum* و *T. viridescens* گونه‌هایی از تریکودرما هستند که به تازگی معرفی شده‌اند و این تحقیق اولین بررسی اثر بیوکنترلی آن‌ها روی بیمارگرهای گیاهی در ایران می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: تریکودرما، سیب‌زمینی، کنترل بیولوژیک، *Coniothyrium minitans*

Biological Control of *Sclerotinia sclerotiorum* the Causal Agent of Potato White Mold by Different *Trichoderma* spp. and *Coniothyrium minitans*

SMR Ojaghian[1], D Zafari*[1] and G Khodakaramian[1]

Received: 10 April 2008 Accepted: 21 September 2009
[1]MSc Student and Associate Profs of Plant Protection of Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran
*Corresponding author: E-mail:zafari_d@yahoo.com

Abstract

The identity of outbreak of stem drying and early death on potato in vast area of potato fields of Hamedan province was studied. As a result, the causal agent of the disease was isolated and identified as *Sclerotinia sclerotiorum*. Considering the serious damage of this pathogen that can not be easily controlled by cultural and chemical control methods, alternative approaches such as biocontrol method using five species of *Trichoderma* including *T. ceramicum*, *T. koningii*, *T. koningiopsis*, *T. virens*, *T. viridescens* and one isolate of *Coniothyrium minitans* were evaluated against this pathogen. All mentioned biocontrol agents caused some control on the pathogen *in vitro*. In assessment of the effect of volatile metabolites on pathogen growth rate, the most inhibition percent was realized about *T. koningiopsis* with 56% and in case of extracellular compounds, the most inhibition percent in concentrations of 15 and 30% were showed *T. ceramicum* as 69% and 53%, respectively. In dual culture, *T. koningiopsis*, *T. viridescens* and *T. ceramicum* prevented sclerotia formation as such. They also grew and sporulated on the pathogen mycelia. In assessment of the affect of spore suspension of the biological agents on myceliogenic germination of sclerotia, the most inhibition was observed in *T. ceramicum* and *T. koningiopsis* and the less inhibition was in *T. virens* and *Coniothyrium minitans*. *T. ceramicum*, *T. koningiopsis* and *T. viridescens* are recently described *Trichoderma* spp. and this study is the first assessment of their biocontrol effect on plant diseases in Iran.

Keywords: Biological control, *Coniothyrium minitans*, Potato, *Trichoderma*

مقدمه

کپک سفید نام عمومی بیماری ناشی از *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary می‌باشد (هوکر ۱۹۹۰). این قارچ تک‌چرخه‌ای، هموتال و نکروتروف بوده و محدودیت میزبانی و جغرافیایی ندارد و می‌تواند به بیش از ۴۰۰ گونه از گیاهان زراعی، باغی، گلخانه‌ای و علف‌های هرز حمله کند (پوردی ۱۹۷۹). اغلب این میزبان‌ها دولپه‌ای بوده گرچه تعداد کمی از تک لپه‌ای‌ها نیز در گروه میزبان های این بیمارگر قرار می‌گیرند (بلند و هال ۱۹۹۴). یکی از میزبان‌های مهم این بیمارگر سیب‌زمینی است. علائم این بیمارگر بعد از مرحله بسته شدن ردیف‌ها توسط بوته‌های مجاور ظاهر

می‌گردد (آتالا و جانسون ۲۰۰۴). چون بافت‌های آلوده و سختینه‌ها در قسمت‌های پایین بوته‌های همپوشانی شده قرار می‌گیرند و این پدیده در اواخر فصل زراعی رخ می دهد، لذا اغلب از دید مخفی می‌ماند. از آنجا که قسمت اصلی غده‌بندی بوته‌های سیب‌زمینی در اواخر فصل زراعی انجام می‌شود، مدیریت بیماری کپک سفید می‌تواند باعث افزایش عملکرد این محصول شود و با توجه به اینکه این بیمارگر محدودیت میزبانی ندارد، کنترل بیماری کپک سفید در سیب زمینی می‌تواند باعث جلوگیری از شیوع این بیماری در میزبان‌های حساس مجاور شود (ونت ۱۹۹۸). در رابطه با سیب‌زمینی مشخص شده است که جوانه زنی کارپوژنیک سختینه ها باعث تولید بیماری می‌شود و در واقع آسکوسپورها منبع اصلی آلودگی سیب زمینی هستند (آتالا و جانسون ۲۰۰۴). به علت عمر زیاد سختینه‌ها و دامنه میزبانی زیاد، تناوب زراعی راهکار مدیریتی مناسبی به نظر نمی‌رسد. همچنین قارچ کش موثری علیه سختینه‌ها وجود ندارد و از طرف دیگر چون سختینه ها علاوه بر سطح خاک در داخل خاک نیز وجود دارند لذا استفاده از سموم علیه سختینه ها غیر ممکن است (تو ۱۹۸۶). کاربرد تدخین و آفتاب دهی نیز در سطوح وسیع دشوار و غیر اقتصادی به نظر می‌رسد. این در حالی است که هیچ رقم کاملا" مقاومی در سیب‌زمینی علیه کپک سفید شناسایی نشده است (آتالا و جانسون ۲۰۰۴). با توجه به مطالب مذکور، کنترل بیولوژیکی این بیماری در کنار سایر روش‌های مدیریتی، امری اجتناب ناپذیر می‌باشد. تاکنون قارچ‌های بیوکنترلی متعددی برای این منظور معرفی و استفاده شده است که از جمله آن‌ها می‌توان به *Trichoderma virens* (تو ۱۹۸۰)، *Clonostachys rosea* (ارویو و همکاران ۱۹۶۴)، *Coniothyrium minitans* (هوآنگ و هوز ۱۹۷۶)، *Trichoderma harzianum*، *T. viride*، *T. koningii* و *T. pseudokoningii* (دوسانتوس و دینگرا ۱۹۸۲)، *Paecilomyces lilacinus* (Thom) Samson (کاروواراا ۱۹۶۰)، *Mucor* spp.، *Penicillium* spp. و *Sporodesmium sclerotivorum* (آدامز ۱۹۹۰) اشاره کرد. در رابطه با این بیماری تک‌چرخه ای، کاهش اینوکولوم اولیه (آسکوسپورها) می‌تواند منجر به کاهش بیماری شود و این امر تنها با کاهش سختینه ها از طریق عوامل بیوکنترل امکان‌پذیر است. با توجه به خسارت قابل توجه بیماری کپک سفید در مزارع سیب زمینی استان همدان و جداسازی و شناسایی میکوپارازیت سختینه‌ها *Coniothyrium minitans* و نیز وجود تعداد زیادی از گونه‌های تعیین توالی شده تریکودرما در آزمایشگاه بیماری شناسی گروه گیاه پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا، در این تحقیق اثرات بازدارندگی این عوامل بیوکنترل روی قارچ *S. sclerotiorum* مورد بررسی قرار گرفت.

روش‌های بررسی

نمونه برداری و جداسازی *S. sclerotiorum*

در شهریور ماه دو سال متمادی ۱۳۸۵ و۱۳۸۶ اقدام به نمونه‌برداری از مزارع سیب زمینی آلوده استان همدان گردید و تعداد ۳۵ سختینه از خاک و بافت های آلوده ۱۲ مزرعه مختلف سیب زمینی جمع آوری گردید. سختینه‌ها با محلول هیپوکلریت ۵% به مدت ۲-۱ دقیقه ضدعفونی و دوبار در آب مقطر استریل (هر بار به مدت دو دقیقه) شستشو و بر روی محیط پی دی ای[1] قرار داده شدند. سخیتنه‌هایی که بر روی محیط مذکور رشد نکردند، دو نیم شدند و به داخل بافت هویج بریده شده تازه منتقل و در داخل یک اتاقک مرطوب قرار گرفتند. تعدادی از آن‌ها بعد از ۷-۴ روز تولید میسلیوم کردند. در نهایت ۲۱ جدایه از این بیمارگر به دست آمد. جدایه SS4-4 به علت تولید علایم شدیدتر در مزرعه و نیز تولید سختینه بیشتر در بافت هویج، جهت کارهای آزمایشگاهی و گلخانه ای انتخاب شد.

[1]PDA

تهیه عوامل بیوکنترل

در این تحقیق، پنج جدایه تریکودرما شامل گونه‌های *T. virens*، *T. koningiopsis*، *T. ceramicum*، *T. koningii* و *T. viridescens* از گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی سینا تهیه گردید.

این جدایه‌ها قبلا به طور دقیق با استفاده از ویژگی‌های مورفولوژیکی و تعیین توالی نواحی ITS1 و ITS2 و ژن 5.8s از rDNA ژنومی شناسایی شده بودند. همچنین *Coniothyrium minitans*، میکوپارازیت معروف سختینه‌ها نیز از یک سختینه جداسازی و بعد از انجام تست بیوکنترلی و شناسایی دقیق مورد استفاده قرار گرفت.

تهیه سختینه و اینوکولوم از عوامل بیوکنترل در شرایط آزمایشگاه

تهیه اینوکولوم به روش جونز و همکاران (۲۰۰۳)، انجام شد. برای این منظور ۵۰ گرم گندم در یک ارلن نیم لیتری ریخته شد و ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد سترون شد. دیسک های پنج میلی متری از حاشیه پرگنه چهار روزه قارچ عامل بیماری و قارچ های بیوکنترل، جهت تلقیح این محیط مورد استفاده قرار گرفت. سختینه ها بعد از ۳-۲ هفته تولید و از بافت های گندم جدا شدند و در معرض هوا خشک گردیدند. عوامل بیوکنترلی نیز بعد از دو هفته از ارلن خارج و در معرض هوا خشک شده و در یخچال نگه‌داری شدند.

بررسی خواص عوامل بیوکنترل روی عامل کپک سفید در شرایط آزمایشگاه

الف- کشت متقابل

در کشت متقابل، حلقه های پنج میلی متری از حاشیه پرگنه چهار روزه قارچ بیمارگر در یک طرف تشتک پتری حاوی پی دی ای تلقیح و در شرایط آزمایشگاه (دمای ۲۶-۲۳ درجه سانتی گراد و نور طبیعی و فلورسنت) نگه‌داری شد. بعد از ۲۴ ساعت، منتهی الیه رشد پرگنه بیمارگر علامت گذاری شد و حلقه میسلیومی از عوامل بیوکنترل در طرف دیگر تشتک پتری قرار داده شد. برای هر عامل بیوکنترل سه تکرار در نظر گرفته شد و در پتری شاهد، بجای عامل بیوکنترل از یک دیسک پی دی ای استفاده گردید. در این آزمایش، توانایی استقرار عوامل بیوکنترل روی هیف بیمارگر و تولید اسپور، ایجاد هاله بازدارنده و پیچیدگی هیف های عوامل بیوکنترل به دور هیف بیمارگر و جلوگیری از تولید سختینه در بیمارگر، در دو، سه، هفت و ۱۵ روز پس از تلقیح عوامل بیوکنترل مورد بررسی قرار گرفت.

ب- تاثیر ترکیبات فرار عوامل بیوکنترل در بازدارندگی رشد میسلیومی بیمارگر

این آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام گرفت. در این آزمایش، حلقه های میسلیومی پنج میلی متری از حاشیه پرگنه چهار روزه قارچ بیمارگر به مرکزپتری‌های هم اندازه (با قطر نه سانتی متر) تلقیح و در شرایط آزمایشگاه (دمای ۳±۲۳ درجه سانتی گراد) نگه داری شدند. از حاشیه پرگنه عوامل بیوکنترل نیز دیسک‌هایی به قطر پنج میلی متر به وسط پتری‌هایی به قطر نه سانتی‌متر تلقیح و در شرایط آزمایشگاه قرار داده شد. بعد از ۲۴ ساعت، منتهی الیه رشد پرگنه بیمارگر علامت گذاری شد. در شرایط سترون، تشتک-های پتری حاوی تریکودرما و بیمارگر روی هم گذاشته و جهت جلوگیری از آلودگی آن‌ها، بلافاصله محل انطباق دو تشتک پتری با سلوفان مسدود شد. این پتری‌ها در شرایط آزمایشگاه و روی میز نگه‌داری شدند، به طوری که تشتک پتری حاوی عامل بیوکنترل در کف قرار گرفت. در پتری شاهد، بجای عامل بیوکنترل از یک حلقه پی دی ای استفاده گردید. بعد از ۴۸ ساعت، درصد

بازدارندگی از رشد میسلیوم بیمارگر توسط فرمول زیر محاسبه گردید و در نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت:

/ (رشد قارچ در تیمار - رشد قارچ در شاهد) = درصد بازدارندگی

۱۰۰× رشد قارچ در شاهد

پتری‌های جفت شده به مدت ۱۵ روز دیگر در دمای ۳ ± ۲۳ درجه سانتی‌گراد روی میز آزمایشگاه نگه‌داری شدند تا تاثیر این مواد فرار در تشکیل سختینه-ها نیز ظاهر و بررسی شود. لازم به ذکر است که در مقایسه سختینه‌ها، تعداد آن‌ها در هر دو پتری معیار مقایسه تیمارها با همدیگر و با شاهد قرار گرفت چون در شاهد، بسیاری از سختینه‌ها در محل اتصال دو پتری به وجود آمدند.

ج- تاثیر مواد خارج سلولی عوامل بیوکنترل در بازدارندگی رشد میسلیومی عامل کپک سفید

جهت بررسی مواد خارج سلولی عوامل بیوکنترل، جدایه های این عوامل به محیط کشت مایع سیب‌زمینی - دکستروز تلقیح شدند. محیط کشت مذکور به روش زیر تهیه گردید:

۲۰۰ گرم سیب زمینی پوست کنده و قطعه قطعه شده در یک بشر حاوی نیم لیتر آب مقطر به مدت ۲۵ دقیقه جوشانده شد. سپس سیب‌زمینی پخته شده با آب همراه آن در پارچه ململ عصاره گیری شد. سپس به این محلول ۲۰ گرم دکستروز اضافه و حجم آن با آب مقطر استریل به یک لیتر رسانده شد. در هر ارلن ۲۵۰ میلی لیتری ۱۰۰ میلی لیتر از این محلول ریخته شد و ارلن‌ها در دمای ۱۲۰ درجه سانتی گراد و فشار ۱/۵ بار به مدت ۲۰ دقیقه سترون شدند.

چهار حلقه میسلیومی با قطر یک سانتی‌متر از حاشیه در حال رشد جدایه های عوامل بیوکنترل به داخل هر یک از ارلن های محتوی پی دی بی انداخته شد و در داخل شیکر چرخان در دمای ۲۴ - ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. شیکر روی ۱۲۰ دور در دقیقه تنظیم گردید. پس از ۱۵ روزمحتویات ارلن ها با میلی پور و پمپ خلاء و با استفاده از میکروفیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر عصاره گیری شدند. فیلتراسیون و جمع آوری عصاره کاملا" در شرایط سترون و با میلی پور و ارلن های سترون شده انجام شد.

تعداد ۱۲ ارلن هر یک حاوی ۵۰ میلی لیتر محیط کشت ربع قدرت پی دی ای با ۲۵ درصد آگار اضافی در اتوکلاو سترون شدند. پس از سرد شدن و رسیدن به دمای ۵۰ - ۴۵ درجه سانتی گراد، ۱۵ میلی لیتر از عصاره فیلتر شده شش گونه عامل بیوکنترل (شامل پنج جدایه تریکودرما و یک جدایه *C. minitans*) به شش ارلن اضافه و به هم زده شد و محتویات هر ارلن در سه پتری تقسیم و نام جدایه مربوط بر روی آن ثبت شد. در شش ارلن بعدی بجای ۱۵ میلی لیتر ، ۷/۵ میلی لیتر از عصاره فیلتر شده عوامل بیوکنترل به آن‌ها اضافه شد (بنابراین محیط‌های حاوی ۳۰% و ۱۵% از عصاره عوامل بیوکنترل تهیه گردید). در شرایط سترون (داخل هود سترون) از حاشیه در حال رشد پرگنه سه روزه بیمارگر، حلقه‌های میسلیومی با قطر پنج میلی‌متر بوسیله چوب‌پنبه سوراخ‌کن تهیه شد و یک حلقه میسلیومی در مرکز هرپتری از پتری‌های فوق الذکر تلقیح و در شرایط آزمایشگاه (دمای ۳±۲۴ درجه سانتی‌گراد و نور طبیعی و فلورسنت) نگه‌داری شدند. رشد شعاعی پرگنه بیمارگر در ۴۸ ساعت بعد در تمام تیمارها اندازه گیری و ثبت شد.

این آزمایشات در قالب یک طرح کاملا" تصادفی با سه تکرار برای هر عامل بیوکنترل، انجام و مورد ارزیابی قرار گرفت. درصدهای بازدارندگی برای تکرارهای هر تیمار به وسیله نرم افزار SAS در سطح ۰/۰۱ آزمون دانکن تجزیه و تحلیل و محاسبه گردید. لازم به ذکر است که درصدهای بازدارندگی بر اساس

فرمول اشاره شده در بند ب محاسبه گردید. پتری‌های فوق مجددا" بعد از اندازه‌گیری اولیه به مدت ۱۵ روز دیگر در شرایط اشاره شده در بالا نگه‌داری شدند تا تاثیر متابولیت‌های خارج سلولی در تشکیل سختینه‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد.

بررسی تاثیر عوامل بیوکنترل بر جوانه زنی میسلیوژنیک سختینه‌ها

الف: انجام آزمایش

در این آزمایش، نخست حدود ۱۰ کیلوگرم خاک از مزرعه ای در نزدیکی دانشکده کشاورزی دانشگاه بوعلی تهیه گردیده و جهت حذف مواد خارجی و کلوخه-های بزرگ غربال گردید. کل خاک با بیلچه با هم مخلوط و به دو قسمت پنج کیلوگرمی تقسیم شد. یکی از بخش-های پنج کیلویی خاک، در داخل پلاستیک ضخیم قرار داده شد و دو بار سترون گردید. این آزمایش در قوطی-های پلاستیکی درب‌دارکوچکی انجام شد که گنجایش ۱۰۰ گرم خاک را داشتند. آن‌ها قبل از مصرف در حرارت ۱۲۰ درجه و فشار یک اتمسفر بمدت ۱۵ دقیقه سترون شدند. به ازای هر تیمار، شش قوطی در نظر گرفته شد و سه عدد از آن‌ها با خاک سترون و ۳ عدد دیگر با خاک غیر سترون پر شدند. در هر قوطی ۵۰ سختینه (ضد عفونی شده با اتانل به مدت یک دقیقه) قرارگرفت و با خاک (در عمق ۴-۰ سانتی متری قوطی) مخلوط شدند. از کلیه عوامل بیوکنترلی سوسپانسیون اسپور تهیه شد. غلظت اسپورها با هماسیتومتر اندازه گیری شد. غلظت سوسپانسیون برای کلیه تیمارها 10^7 اسپور در میلی لیتر تنظیم گردید. در تهیه سوسپانسیون-ها از آب مقطر سترون حاوی دو گرم در لیتر صمغ عربی (بعنوان ماده چسباننده) استفاده شد. در تهیه سوسپانسیون اسپور از اینوکولوم گونه‌های تریکودرما، در صورت چسبندگی اسپورها در سوسپانسیون، علاوه بر رعایت موارد مذکور، از آب مقطر حاوی یک قطره ماده خیس کننده (مایع ظرفشویی) استفاده شد. در تهیه سوسپانسیون اسپور *C. minitans*، جهت اطمینان از خلوص و تازگی اسپورها بجای اینوکولوم تهیه شده روی گندم از محیط کشت‌های ۴۵ روزه این قارچ استفاده شد. برای این منظور، نخست مقدار ۱۵-۱۰ میلی لیترآب مقطر سترون روی محیط کشت ریخته و با یک کاردک (ضدعفونی شده با الکل) کل پرگنه قارچ را بصورت تکه تکه از محیط کشت جدا و همراه با آب موجود در آن پتری، در پتری دیگر ریخته شد. سپس مقدار پنج میلی لیترآب مقطر سترون دیگر در پتری دوم ریخته شد و با همان کاردک، کل محتویات پتری کاملا" کوبیده شد. از آنجا که دیواره پیکنیدیوم‌ها در جنس *Conioyhyrium* بسیار ظریف است بنابراین با ضربه‌های بسیار ضعیف شکسته وپیکنیدیوسپورهای آن آزاد می‌گردند. سپس این محلول جهت حذف محیط کشت احتمالی موجود در آن، از کاغذ صافی سترون عبور داده شد و سوسپانسیون با غلظت مناسب و مورد نظر تهیه گردید. قبل از اضافه کردن سختینه‌ها، به ازای هر گرم خاک موجود در قوطی، یک میلی لیتر از سوسپانسیون به ظرف اضافه و با خاک مخلوط شد. در شاهد، بجای سوسپانسیون اسپور از آب مقطر سترون استفاده گردید. این ظروف به مدت ۲ ماه در شرایط آزمایشگاه (دمای ۲۶-۲۰ درجه سانتی گراد و نور طبیعی و فلورسنت) نگه‌داری شدند. به طور متوسط، هر ۱۰ روز یکبار مقدار ۲۰ میلی لیتر آب مقطر سترون توسط یک سرنگ تازه به قسمت زیرین خاک‌های موجود در ظروف تزریق می شد تا رطوبت لازم در آن‌ها جهت فعالیت میکروبی فراهم باشد.

ب: ارزیابی میزان کنترل جوانه زنی میسلیوژنیک سختینه‌ها توسط سوسپانسیون عوامل بیوکنترل

بعد از دو ماه کل سختینه‌ها از ظروف پلاستیکی خارج و با آب سترون شده کاملا" شستشو شدند. سختینه‌های بکلی تخریب شده در تیمارهای مختلف مورد محاسبه قرار گرفتند. در این آزمایش از طرح فاکتوریل کاملا" تصادفی استفاده شد و سختینه‌ها روی

محیط کشت پی دی ای قرار داده شدند و تولید و یا عدم تولید میسلیوم در بیمارگر و یا رشد عوامل بیوکنترل از سختینه‌ها مورد ارزیابی و شمارش قرار گرفت. سختینه-هایی که از آن‌ها هیچ میسلیومی رشد نکرد، دربین دو لایه کاغذ صافی مرطوب سترون قرار گرفتند و بعد از تولید میسلیوم به عنوان سختینه‌های سالم قلمداد شدند و در غیر این‌صورت، با توجه به تغییر رنگ قسمت مغز (که در حالت عادی سفید رنگ است) و یا رشد عوامل بیوکنترلی، سختینه از بین رفته محاسبه شدند. بعد از تعیین درصد سختینه‌های فاقد قدرت جوانه‌زنی میسلیوژنیک ، اعداد مربوطه در هر تیمار در نرم افزار SAS مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتایج و بحث

خواص بیوکنترلی عوامل قارچی در کشت متقابل با بیمارگر

در این آزمون، جنبه های مختلفی از تاثیر عوامل بیوکنترل (جدایه‌های تریکودرما و *C. minitans*) بر قارچ عامل کپک سفید مورد ارزیابی قرار گرفت (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج آزمون کشت متقابل عامل کپک سفید و عوامل بیوکنترلی مختلف

ریف	نام عامل بیوکنترل	رشد روی پرگنه بیمارگر	پیچش دور هیف بیمارگر	مرز حائل با پرگنه بیمارگر	اسپورزایی روی پرگنه بیمارگر	درصد جلوگیری از تولید سختینه
۱	***T. ceramicum***	+	+	+	+	۷۰
۲	***T. koningii***	+	+	+	+	۱۰۰
۳	***T. koningiopsis***	+	-	+	+	۱۰۰
٤	***T. virens***	+	-	+	+	٤٥
٥	***T. viridescens***	+	+	+	+	۱۰۰
٦	***C. minitans***	-	-	+	-	-٥*

*عامل بیوکنترل نه تنها باعث کاهش سختینه نشده است بلکه به میزان آن عدد باعث تحریک تولید سختینه بیشتری نسبت به شاهد شده است.

همان طور که در جدول (۱) قابل مشاهده است، گونه‌های *T. koningii*، *T. koningiopsis* و *T. viridescens* ، اثر بهتری نسبت به سایر گونه‌ها داشته‌اند و گونه *C. minitans* نه تنها از تشکیل سختینه جلوگیری نکرد بلکه باعث تحریک تشکیل سختینه نسبت به شاهد هم شده است.

مواد خارج سلولی فرار عوامل بیوکنترل در بازدارندگی رشد میسلیومی عامل کپک سفید

بر اساس نتایج، همه گونه‌ها نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار نشان دادند و باعث کاهش رشد پرگنه قارچ عامل بیماری شدند (جدول ۲). بیشترین کاهش رشد (بیشترین اثر بازدارندگی) مربوط به *T. koningiosis* و *T. koningii* به ترتیب ۵۶% و ۵۴% و کمترین تاثیر بازدارندگی به میزان ۴۱% مربوط به *T. viridescens* بود. همچنین متابولیت‌های فرار این عوامل بیوکنترلی (غیر از *C. minitans*) از تشکیل سختینه جلوگیری کردند.

جدول ۲- تاثیر متابولیت‌های فرار عوامل بیوکنترلی مختلف در محدود سازی رشد پرگنه قارچ عامل کپک سفید

ردیف	عوامل بیوکنترل	میانگین[1] رشد شعاعی پرگنه بیمارگر در ٤٨ ساعت پس از تلقیح (میلی متر)	درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ عامل بیماری	گروه‌بندی تیماری در آزمون دانکن[2]	میانگین[1] تعداد سختینه‌های تشکیل شده بعد از ۱۵ روز
۱	شاهد	۲۲	-	A	۳٦
۲	*T. ceramicum*	۱۱	٥۰	CD	۰
۳	*T. koningii*	۱۰	٥٤	FED	۰
٤	*T. koningiopsis*	۹/٥	٥٦	GE	۰
٥	*T. virens*	۱۰/٥	٥۲	FECD	۰
٦	*T. viridescens*	۱۳	٤۱	B	۰
۷	*C. minitans*	۱۰/٥	٥۲	FEB	۱۲

۱- میانگین مربوط به سه تکرار می باشد.

۲- تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند در سطح یک درصد با هم اختلاف معنی دار ندارند.

تاثیر متابولیت‌های خارج سلولی عوامل بیوکنترلی مختلف در بازدارندگی رشد میسلیومی عامل کپک سفید

در آزمون استفاده از متابولیت‌های فیلتر شده با غلظت ۳۰%، کلیه عوامل بیوکنترلی نسبت به شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند و باعث کاهش رشد پرگنه قارچ عامل بیماری شدند. بیشترین درصد بازدارندگی رشد پرگنه مربوط به *T. cearmicum* و *T. viridescens* به ترتیب به میزان ۶۹ و ۵۹% درصد و نیز بیشترین تاثیر بازدارندگی از تشکیل سختینه نیز مربوط به *T. ceramicum* و *T. viridescens* بود. همچنین کمترین درصد بازدارندگی رشد پرگنه مربوط به *T. virens* به میزان ۲۵ درصد بود. در غلظت ۱۵% نیز بازدارندگی کلیه تیمارها نسبت به شاهد معنی‌دار بود. اثر بازدارندگی *T. ceramicum* با میزان ۵۳% بیشتر از همه بود. *T. koningii*، *T. koningiopsis* و *C. minitans* با مقدار ۲۳% کمترین اثر بازدارندگی را داشتند. در این غلظت نیز، بیشترین تاثیر بازدارندگی از تشکیل سختینه در *T. cearmicum* و *T. viridescens* بود (جدول ۳).

جدول ۳- تاثیر متابولیت‌های خارج سلولی عوامل بیوکنترل روی پرگنه عامل کپک سفید در غلظت‌های ۳۰ و ۱۵ درصد ۴۸ ساعت بعد از تلقیح

ردیف	عوامل بیوکنترل	میانگین[1] رشد شعاعی پرگنه بیمارگر		درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ عامل بیماری		گروه‌بندی تیماری[2]		میانگین[1] تعداد سختینه ها در پتری بعد از ۱۵ روز	
		%۳۰	%۱۵	%۳۰	%۱۵	%۳۰	%۱۵	%۳۰	%۱۵
۱	شاهد	۱٦	۱۷	-	-	A	A	۱۲	۱۳
۲	*T. ceramicum*	٥	۸	٦۹	٥۳	B	B	٤	٦
۳	*T. koningii*	۸	۱۳	٥۰	۲۳	D	E	۷	۷
٤	*T. koningiopsis*	۷	۱۳	٥٦	۲۳	D	D	٦	۷
٥	*T. virens*	۱۲	۱۱	۲٥	۳٥	B	G	۱۰	۱۱
٦	*T. viridescens*	٦/٥	۱۲	٥۹	۲۹	C	C	٥	٥
۷	*C. minitans*	۹	۱۳	٤٤	۲۳	D	F	۸	۱۱

۱- میانگین مربوط به سه تکرار می‌باشد.

۲- تیمارهایی که دارای حروف مشترک می‌باشند در سطح یک درصد خطا با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

تاثیر عوامل بیوکنترل بر جوانه‌زنی سختینه‌ها در خاک استریل و غیر استریل

دو ماه پس از تلقیح سوسپانسیون اسپور عوامل بیوکنترلی به ظروف محتوی سختینه در خاک استریل و غیر استریل، درصد سختینه‌های فاقد قدرت جوانه زنی میسلیوژنیک مورد ارزیابی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصله، کلیه تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول ۴) و باعث کاهش میزان جوانه‌زنی سختینه‌ها شدند. بیشترین درصدکاهش جوانه‌زنی مربوط به *T. ceramicum* و *T. koningiopsis* بود و حداقل تاثیر در تیمار *T. virens* و *C. minitans* مشاهده گردید.

بحث

در آزمون کشت متقابل، گونه های تریکودرما رشد قارچ عامل بیماری را محدود کردند ولی این کاهش رشد بیشتر از آنکه مربوط به نشت متابولیت‌های خارج سلولی این عوامل به سمت پرگنه بیمارگر باشد، مربوط به تسخیر سریع سوبسترا توسط عوامل بیوکنترل می باشد زیرا رشد سریع این عوامل شرایط مناسبی را برای تصاحب مکان (سطح محیط کشت) و غذا و قبل از آنکه نشت متابولیت‌های خارج سلولی این عوامل بیوکنترلی (که تولید تاخیری و بعد از رشد را دارد) در آگار این تاثیر را ایجاد کند، فراهم می سازد. تحقیقات سیمون و سیواسیتامپارام (۱۹۸۹)، شریمباک و همکاران (۱۹۹۴)، کوک و کیوانک (۲۰۰۴) این نتایج را تایید می کند. در آزمون کشت متقابل، بیشتر عوامل بیوکنترلی برای رشد بیمارگر محدودیت رشد ایجاد کردند و سطح پرگنه قارچ بیمارگر را پوشاندند. هرموزا و همکاران (۲۰۰۰) نیز با قرار دادن پرگنه *Phoma beta*، *Rosellinia necatrix*، *Botrytis cinerea* و *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* در مقابل چند جدایه تریکودرما روی محیط کشتهای سی ام ای، ام ای و پی دی ای به این نتیجه رسیدند که اسپورزایی و قدرت تهاجمی (رشد تریکودرما روی پرگنه قارچ بیمارگر) جدایه‌های تریکودرما در

جدول ٤- بررسی تاثیر سوسپانسیون اسپور عوامل بیوکنترل بر جوانه زنی میسلیوژنیک سختینه بیمارگر در خاک استریل و غیراستریل

ردیف	عوامل بیوکنترل	میانگین[1] درصد سختینه‌های فاقد قدرت جوانه زنی در خاک استریل	میانگین درصد سختینه های فاقد قدرت جوانه زنی در خاک غیر استریل	گروه‌بندی تیماری[2]
۱	شاهد	2	4	A
۲	*T. ceramicum*	45	50	E
۳	*T. koningii*	35	45	C
٤	*T. koningiopsis*	52	42	ED
٥	*T. virens*	22	34	B
٦	*T. viridescens*	42	45	DC
۷	*C. minitans*	39	28	B

۱- میانگین‌ها در خاک استریل و غیراستریل بر اساس سه تکرار است.

۲- تیمارهایی که دارای حروف مشترک می باشند در سطح یک درصد خطا با هم اختلاف معنی‌دار ندارند.

آزمون‌های کشت متقابل به نوع قارچ عامل بیماری و ترکیب محیط کشت بستگی دارد. برخی ازجدایه‌هایی که موفق به رشد روی پرگنه قارچ عامل بیماری شدند، ایجاد پیچیدگی هیفی (میکوپارازیتیسم) در اطراف میسلیوم-

های قارچ عامل بیماری کردند. میکوپارازیتسم قارچ‌های عامل بیماری توسط بعضی جدایه های تریکودرما و تولید آنزیم‌های هیدرولیتیک از قبیل کیتیناز و گلوکاناز در طی مراحل میکوپارازیتیسم به اثبات رسیده است. این حالت در اکثر تحقیقات کنترل بیولوژیک مورد توجه واقع شده است (هرموزا و همکاران ۲۰۰۴ و مکین تایر و همکاران ۲۰۰۴).

در آزمون کشت متقابل، *T. ceramicum*، *T. koningii* و *T. viridescens* از دیگر عوامل بیوکنترل موفق‌تر ظاهر شدند. هر سه گونه مذکور در بررسی ترکیبات فرار نیز بسیار موثر بودند. به طور کلی، اغلب استرین‌های تریکودرما مواد خارج سلولی فرار و غیر فرار سمی تولیدکرده که رشد عوامل بیماری‌زای قارچی را متوقف می‌کنند و یا به طرز چشمگیری کاهش می‌دهند (خت و همکاران ۱۹۹۷). در بین مواد خارج سلولی مترشحه در گونه‌های تریکودرما می توان به اسید هارزیانیک، آلامتیسین، تریکولین، پپتابولها، آنتی بیوتیکها، ۶- فنیل- آلفا- پیرون، ویریدین، گلایوویریدین و هپتلیدیک اسید اشاره کرد (وی و همکاران ۲۰۰۱). بر اساس مطالعات خت و همکاران (۱۹۹۷)، موتانت‌هایی از *T. virens* که میزان زیادی گلایوویرین تولید می‌کنند، گیاهچه‌های پنبه را از *P. ultimum* (عامل مرگ گیاهچه) حفاظت کردند. در تحقیقات دنیس و وبستر (۱۹۷۱)، شریمباک و همکاران (۱۹۹۴) و کوک و کیوانک (۲۰۰۴)، به نقش گونه‌های تریکودرما درتولید آنتی‌بیوتیک‌هایی همچون تریکودرمین، تریکودرمول، هارزیانوم آ و هارزیانولید اشاره شده است.

یکی از بهترین راه‌های کاهش سختینه‌ها در خاک به کارگیری عوامل بیوکنترلی در خاک است. عوامل بیوکنترلی متعددی (قارچ‌ها، باکتری‌ها) جهت مبارزه با بیماری کپک سفید مورد مطالعه قرار گرفته اند. در این تحقیق ۵ گونه تریکودرما به اضافه یک جدایه *C. minitans* مورد مطالعه قرار گرفتند. کارآیی این عوامل بیوکنترل در کاهش بیماری کپک سفید به دفعات به اثبات رسیده است که به عنوان مثال می توان به استفاده از *T. virens* توسط تو (۱۹۸۰)، کاربرد *T. koningii* و *T. viride* توسط دوسانتوس و دینگرا (۱۹۸۲) و کاربرد *C. minitanms* توسط هوآنگ و همکاران (۲۰۰۰) اشاره کرد.

هوآنگ و همکاران (۲۰۰۰) طی سال‌های ۱۹۹۴-۱۹۹۲، جهت بیوکنترل بیماری کپک سفید در مزارع لوبیا از سوسپانسیون اسپور چهار قارچ (*T. virens*، *T. roseum*، *C. minitan* و *Epicoccum purpurascens*) در زمان گلدهی استفاده کردند و همه آن‌ها به طور معنی‌داری شیوع بیماری را کنترل کردند. *T. virens* در یک تحقیق مزرعه ای توانست کپک سفید خیار را در قسمت‌های هوایی به ،میزان ۱۰۰-۹۴ درصد کاهش دهد (اتو و همکاران ۲۰۰۵). در تحقیق حاضر، *C. minitans* برای نخستین بار از یکی از مزارع سیب‌زمینی استان همدان جداسازی و در کنترل بیولوژیکی مورد استفاده قرار گرفت. استفاده از این قارچ در بیوکنترل برخی قارچ‌های مولد سختینه، به دفعات مورد توجه قرار گرفته است. از جمله آن‌ها می‌توان به تحقیقات مک لارن و همکاران (۱۹۹۴) در کنترل کپک سفید در آفتابگردان و گرلاف و همکاران (۱۹۹۴) در کنترل این بیماری در کاهو اشاره کرد. در این تحقیقات، *C. minitans* بصورت سوسپانسیون اسپور و یا مواد جامد در خاک مورد استفاده قرار گرفته است. لی و همکاران (۲۰۰۵)، سوسپانسیون اسپور این میکوپارازیت را در کنار سوسپانسیون آسکوسپور این بیمارگر در شرایط مزرعه و آزمایشگاه) بر روی گلبرگ‌های یونجه به کاربردند و رشد ساپروفیتیک این بیمارگر را مورد ارزیابی قرار دادند و نتیجه گرفتند که این میکوپارازیت بخوبی می‌تواند بلایت شکوفه یونجه (ناشی از عامل کپک سفید) را کنترل کند. در *C. minitans* مشخص شده است که توانایی جدایه‌ها در کاهش بیماری کپک سفید بسیار متفاوت است (گرلاف و همکاران ۱۹۹۴) و با توجه به پایین بودن قدرت بیماری‌زایی جدایه به کار رفته در این تحقیق در کاهش قدرت جوانه زنی میسلیوژنیک سختینه‌ها، به

نظر می‌رسد که باید به جداسازی جدایه هایی با قدرت بیماری زایی بیشتر اقدام شود. در این تحقیق، هر چند *T. koningii* موثرترین عامل بیوکنترل در بین گونه‌های به کار رفته نبود ولی در مجموع بسیار موثر ظاهر گردید و در کشت متقابل مانع از بوجود آمدن سختینه در پتری شد. تراتمن و کین (۱۹۹۰) نیز *T. koningii* را در شرایط آزمایشگاه و مزرعه لوبیا مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که این قارچ می‌تواند در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد در مدت دو هفته ۵۰% سختینه ها را در شرایط *in vitro* آلوده کند. در رابطه با این عامل بیوکنترلی، نتایج این تحقیق در تضاد با نتایج تحقیقات عمرانی (۱۳۷۸) بود زیرا او *T. koningii* را دارای کمترین توانایی در لیز کردن سختینه‌ها می‌داند.

در رابطه با بیوکنترل بیماری کپک سفید توسط *T. koningiopsis*، *T. ceramicum* و *T. viridescens* هیچ گونه منبع تحقیقی یافت نگردید بنابراین این سه گونه می‌توانند به عنوان عوامل بیوکنترل جدید علیه کپک سفید معرفی شوند. هر سه گونه مذکور قابلیت بازدارندگی بسیار بالایی را در کشت متقابل نشان دادند. *T. koningiopsis* در کلیه مراحل انجام این تحقیق، در بیوکنترل کپک سفید موثر عمل می‌نمود به طوری که ۹۵% سختینه‌ها را بر روی محیط پی دی ای لیز نمود. در آزمایشات مختلف، *T. ceramicum* قابلیت بالایی را در بیوکنترل این بیمارگر از خود نشان داد، به طوری که قابلیت جوانه زنی سختینه‌ها را در خاک سترون و غیر سترون به میزان ۵۰-۴۵ درصد تقلیل داد. *T. viridescens* نیز می‌تواند به عنوان یک عامل بیوکنترل قوی در کاهش خسارت کپک سفید در نظر گرفته شود زیرا در کشت متقابل با عامل بیماری توانست به میزان ۱۰۰% از تشکیل سختینه در پتری جلوگیری کند و در بقیه آزمایشات *in vitro* نیز توانست به میزان چشمگیری باعث کاهش تشکیل سختینه شود و نیز به میزان ۴۵-۴۲ درصد از جوانه زنی سختینه‌ها در خاک استریل و غیر استریل جلوگیری کرد. شیوع این بیماری در اثر آبیاری بارانی در مزارع سیب زمینی و ناکارآمد بودن کنترل شیمیایی آن، کاربرد جدایه‌های دارای توان بیوکنترلی بالا با توجه به اینکه آبیاری بارانی شرایط مساعد استقرار و رشد تریکودرما را به خوبی مهیا می‌کند، توصیه می‌شوند.

منابع مورد استفاده

عمرانی خ، ۱۳۷۸. کنترل بیولوژیکی و شیمیایی *Sclerotinia sclerotiorum* عامل کپک سفید بادمجان. پایان نامه کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده کشاورزی.

Adams PB, 1990. The potential of mycoparasites for biological control of plant diseases. Annu Rev Phytopathol 28: 59-72.

Atallah ZK and DA. Johnson. 2004. Development of *Sclerotinia* stem rot in potato fields in south-central Washington. Plant Dis 88: 419-423.

Boland GJ and R. Hall. 1994. Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can J Plant Pathol 16: 93-100.

Chet I, Inbar J and Hadar I, 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. Pp. 165-184. In: Wicklow DT and Soderstrom B, (eds). The mycota IV: Environmental and microbial relationships. Springer- verlag, Berlin.

Dennis C and Webster J, 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. Hyphal interactions. Trans Brit Mycol Soc 57: 363-369.

Dos Santos AF and. Dhingra OD, 1982. Pathogenicity of *Trichoderma* spp. on the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. Can J Bot 60: 472-475.

Ervio LR, Halkilahti AM and Pohjakallio O, 1964. The survival of sclerotia in soil. Experimental Mycol 5: 212-273.

Ethue LZ, Blume E, Muniz M, Silvia ACF, Stefanela DR and Rocha EK, 2005. Fungi anagonic to *Sclerotinia sclerotiorum* on cucumber grown in greenhouse. Fitopathologia Brasileira 30: 127-133

Gerlagh M, Kruse HM and Whipps JM, 1994. Growth and survival of *Coniothyrium minitans* on lettuce leaves in contact with soil in the presence and absence of *Sclerotinia sclerotiorum*. Europ J Plant Pathol 100: 55–59

Hermosa MR, Grondona I, Iturriaga EA, Diaz-Minguez JM, Castro C, Monte E and Garcia-Acha I, 2000. Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. Appl Environ Microbiol 66: 1890–1898.

Hooker WJ, 1990. Compendium of potato diseases. The American Phytopathological Society.

Huang HC and Hoes JA, 1976. Penetration and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* by *Coniothyrium minitans*. Can J Bot 54: 406-410.

Huang HC, Bremer E, Hynes RK and Erickson RS, 2000. Foliar application of fungal biocontrol agents for the control of white mold of dry bean caused by *Sclerotinia sclerotiorum*. Biol Control 18: 270-276.

Jones EE, Mead A and Whipps JM, 2003. Evaluation of different *Coniothyrium minitans* inoculum sources and application rates on apothecial production and infection of *Sclerotinia sclerotiorum* sclerotia. Soil Biol and Biochem 35 : 409–419

Karhuvaara L, 1960. On parasites of the sclerotia of some fungi. Acta Agric Scand 10: 127-134.

Kucuk C and Kivanc M, 2004. *In vitro* antifungal activity of strains of *Trichoderma harzianum*. Turk. J Biol 28: 111-115.

Li GQ, Huang HC, Acharya SN and Erickson RS, 2005. Effectiveness of *Coniothyrium minitans* and *Trichoderma atroviride* in suppression of sclerotinia blossom blight of alfalfa. Plant Pathol 54: 204-211.

McIntyre M, Nielsen J, Arnau J, Van der Brink H, Hensen K and Madrid S, 2004. Biocontrol mechanisms of trichoderma strains. Pp. 249-260. Proceedings of the 7th European Conference on Fungal Genetics. Copenhagen, Denmark.

McLaren DL, Huang HC, Kozub GC and Rimmer SR, 1994. Biological control of Sclerotinia wilt of sunflower with *Talaromyces flavus* and *Coniothyrium minitans*. Plant Dis 78: 231-235.

Purdy LH, 1979. *Sclerotinia sclerotiorum*: History, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact. Phytopathol 69: 875–880.

Schirmbock M, Loroto M, Wang YL, Hayes CK, Arisan- Atac I, Scala F, Harman GE and Kubicek CP, 1994. Parallel formation and synergism of hydrolytic enzymes and peptaibol antibiotics, molecular mechanisms involved in the antagonistic action of *Trichoderma harzianum* against phytopathogenic fungi. Appl Environ Microbiol 60: 4364-4370.

Simon A and Sivasithamparam K, 1989. Pathogen suppression: A case study in biological suppression of *Gaeumannomyces graminis* in soil. Soil Biol Biochem 21: 331-337.

Trutmann P and Keane PJ, 1990. *Trichoderma koningii* as a biocontrol agent for *Sclerotinia sclerotiorum* in Southern Australia. Soil Biol Biochem 22 (1): 43-50.

Tu JC, 1980. *Gliocladium virens*, a destructive mycoparasite of *Sclerotinia sclerotiorum*. Phytopathol 70: 670-674.

Tu JC, 1986. Integrated disease control of white mold (*Sclerotinia sclerotiorum*) in navy bean (*Phaseolus vulgaris*). Int Symp Crop Prot 39: 731–740.

Venette J, 1998. *Sclerotinia* spore formation, transport, and infection. Pp. 4-7. Proceedings of the *Sclerotinia* Workshop. Fargo, North Dakota, USA.

Vey A, Hoag IRE and Butt TM, 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. Pp. 311-346. In: Butt, TM Jackson, C and Magan N (eds). Fungi as biocontrol agents. Progress, problems and potential. CAB International , Bristol.