کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۸، شمارهٔ ۲،پاییز و زمستان ۱۳۹۸ (۳۸-۲۷)
DOI: 10.22059/jbioc.2018.238913.208

تاثیر برخی از گونه‌های قارچ تریکودرما بر رشد گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* L.) و پاسخ‌های دفاعی گیاه علیه *Rhizoctonia solani*

سیدجواد صانعی[1*] و سید اسماعیل رضوی[2]
۱ و ۲. مربی و استادیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(تاریخ دریافت: ۱۳۹٦/۰۵/۱۷- تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰٤/۰۵)

چکیده

در این مطالعه تاثیر آنتاگونیستی شش جدایه از دو گونه ***Trichoderma*** شامل ***Trichoderma harzianum*** و ***Trichoderma viride*** بر رشد گیاه ریحان و پاسخ‌های دفاعی گیاه علیه بیمارگر ***Rhizoctonia solani*** بررسی شده است. بذرهای گیاه ریحان پس از تیمار با دو گونه ***Trichoderma***، در خاک آلوده به ***R. solani*** کشت گردید و پس از ٤۰ روز ویژگی‌های رشد گیاه و شدت بیماری مرگ گیاهچه بررسی شد. میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز، فنلِ کل و مالون دی آلدئید به روش رنگ‌سنجی توسط اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد که تیمار بذرها با دو گونه ***Trichoderma*** با افزایش معنی‌دار ارتفاع و وزن خشک قسمت‌های هوایی و وزن خشک ریشه همراه بود، اما اثر دو قارچ آنتاگونیست بر قطر ساقه اختلاف معنی‌داری نداشت. حفاظت گیاه علیه بیماری مرگ گیاهچه در رابطه با جدایه‌های دو گونه ***Trichoderma*** در مقایسه با شاهد معنی دار بود، به‌طوری که میزان بیماری از ۷۱/۲۵ درصد در گیاهان شاهد آلوده به ۸/۷۵ الی ۱۵/۷۵ درصد در گیاهان تیمار شده با قارچ آنتاگونیست کاهش می‌یافت. دو گونه ***Trichoderma*** و ***R. solani*** هر یک به‌تنهایی در افزایش فعالیت پراکسیداز و فنل کل گیاه موثر بودند. بیشترین سطح آنزیم پراکسیداز و فنل کل در گیاهان تیمار شده با ***T. viridae*** مشاهده شد. غلظت مالون دی آلدئید نیز تنها در گیاهان آلوده بدون تیمار با عوامل آنتاگونیستی معنی‌دار بود. به این ترتیب، پوشش بذر توسط گونه‌های مختلف ***Trichoderma*** به‌طور قابل‌توجهی رشد و پاسخ‌های دفاعی ریحان را افزایش می‌دهد و می‌تواند به‌عنوان یک رهیافت بیولوژیک برای بهبود رشد و مقاومت به تنش ناشی از ***R. solani*** پیشنهاد شود.

واژه‌های کلیدی: فنلِ کل، کنترل بیولوژیک، مالون دی آلدئید، ***Rhizoctonia solani***، ***Trichoderma*** **spp.**

Growth responses of basil (*Ocimum basilicum* L.) to *Trichoderma* spp. and its influence in control and eliciting plant *defense responses* against *Rhizoctonia solani*

S.J. Sanei[1*] and S.E. Razavi[2]
1. Instructor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran; 2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
(Received: August 8, 2017 - Accepted: June 26, 2018)

ABSTRACT

This experiment was designed to investigate the antagonistic effect of six isolates of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* on growth and eliciting plant defense responses in basil (*Ocimum basilicum* L.) against fungal anthagonist *Rhizoctonia solani*. The basil seeds treated with two *Trichoderma* species were planted in infested soil and plant growth and severity of damping off were measured 40 days after planting. Peroxidase activity, total phenol and malondialdehyde levels were determined by colorimetic assay. The results showed that the antagonist species were able to significantly increase the height and dry weight of seedling shoots and root dry weight, but their effects were not significantly different on stem diameter. Severity of damping off was significantly reduced from 71.25% in infected control plants to 8.75-15.75% in plants treated with fungal anthagonists. *Trichoderma* species and *R. solani* individually increased peroxidase activity and levels total phenolic compounds, but they were more pronounced in the case of applying of antagonist and pathogen combinations (*Trichoderma* and *Rhizoctonia*) in comparision to the control. Experiments indicated that maximum level of total phenol is induced by *T. viride.* Increases in *levels* of malondialdehyde were observed only in infected plants without antagonist treatments. These findings indicate that the basil growth and defense responses enhancement by *Trichoderma* species and can be suggested for improve plant growth and *R. solani* resistance as a biological approach.

Key words: Biological control, *Rhizoctonia solani*, Malondialdehyde, Total phenol, *Trichoderma* spp.
* Corresponding author E-mail: sa_nei@yahoo.com

مقدمه

کشت گیاهان دارویی و خوشبو از دیرباز دارای جایگاه ویژه‌ای در نظام‌های سنتی کشاورزی ایران بوده است و این نظام‌ها از دیدگاه ایجاد تنوع و پایداری نقش مهمی ایفا کرده‌اند (Koochaki *et al*. 2004). ریحان (*Ocimum basilicum* L.) گیاهی یک‌ساله، علفی، معطر، ایستاده، به ارتفاع ۶۰- ۳۰ سانتی‌متر از گیاهان مهم متعلق به تیره نعناع (*Lamiaceae*) است که به‌دلیل خواص دارویی، ادویه‌ای و همچنین خوراکی توجهات زیادی را به‌خود جلب کرده است و به‌میزان زیاد در مناطق مختلف کشت می‌گردد (Reuveni *et al*. 2002, Sajjadi 2006). ریحان به‌عنوان یک گیاه دارویی در درمان سردرد، سرفه، اسهال، یبوست، زگیل‌ها و نقص عملکرد کلیه‌ها کاربرد دارد (Chenni *et al*. 2016).

تنش‌های غیرزنده (محدوده‌ای از عوامل محیطی) و زنده (آفات و بیمارگرهای گیاهی) از طریق سازوکارهای مختلف باعث کاهش عملکرد گیاه می‌گردند (Reuveni *et al*. 2002). گیاه ریحان به تعدادی از عوامل بیمای‌زا حساس است و بیشترین خسارت به آن از طریق بیمارگرهایی وارد می‌شود که گیاهچه و ریشه گیاه را مورد هدف قرار می‌دهند (Taheri and Tarighi 2011). بیماری مرگ گیاهچه یکی از بیماری‌های ریحان در مناطق مختلف کشت آن می‌باشد که جوانه‌زدن و رشد اولیه گیاهچه را تحت‌تاثیر قرار می‌دهد. این بیماری دارای گسترش جهانی است و به‌وسیله مجموعه‌ای از عوامل بیماری‌زا، به‌ویژه عوامل قارچی *Rhizoctonia solani* Kühn، *Fusarium* spp. و *Pythium* spp. به‌وجود می‌آید. این بیمارگرها قادرند کلیه مراحل رشدی گیاه ریحان را تحت تاثیر قرار دهند (Garibaldi *et al*. 1997). با توجه به ماهیت خاک‌زی بودن عوامل مرگ گیاهچه و عدم کاربرد صحیح روش‌های شیمیایی مثل پوشش‌دادن بذر با سموم شیمیایی یا سم‌پاشی مزرعه، استفاده از این روش‌ها نتیجه رضایت‌بخشی به‌همراه ندارد. همچنین ایجاد مقاومت قارچ‌ها و باکتری‌ها به سموم مختلف توجه محققان را به بهبود رشد بذر و اجتناب از بیماری جلب کرده است (Al-Sohaibani *et al*. 2011).

طی دهه‌های گذشته به‌کارگیری عوامل زنده سودمند همچون قارچ‌های خاک‌زی در عرصه‌های کشاورزی برای فعال نگه‌داشتن سیستم زیستی خاک مورد توجه قرار گرفته است (Darzi *et al*. 2009). از بین قارچ‌های خاک‌زی، بیشتر گونه‌های قارچ *Trichoderma*، همزیست‌های گیاهی سودمندی هستند که امکان حضور آن‌ها در همه جا وجود دارد. این قارچ‌ها رشد سریعی دارند و از آن‌ها به‌طور گسترده برای بهبود رشد، کنترل زیستی و یا به‌عنوان یک اصلاح‌گر متابولیسم گیاه در بخش کشاورزی استفاده می‌شود (Harmosa *et al*. 2012). گونه‌های مختلف *Trichoderma*، در افزایش رشد گیاه و بازدهی محصولات مختلف موثر هستند (Darzi *et al*. 2009). این قارچ‌ها همچنین با سازوکارهای ویژه از جمله تولید آنزیم‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها و نفوذ در بدنه قارچ‌های بیماری‌زا سبب کنترل زیستی بیمارگرهای خاک‌زی می‌گردند (Amini *et al*. 2014).

از جمله مهم‌ترین سازوکار کنترل زیستی توسط گونه‌های مختلف *Trichoderma* تحریک سیستم دفاعی گیاه از جمله سنتز و ترشح مواد فنلی، پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی و افزایش فعالیت آنزیم پراکسیداز است که نوعی مقاومت سیستمیک میزبان را در مقابل عامل بیماری‌زا موجب می‌شود (Gravel *et al*. 2007). ترکیبات فنلی با حفاظت از گیاهان در مقابل تنش‌های زنده و غیرزنده نقش مهمی در برهمکنش گیاهان با محیط دارند. افزایش این ترکیبات در ارتباط با مقاومت گیاهان علیه بیمارگرهای قارچی از جمله سیب‌زمینی علیه *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) L.R. Jones and Grout (Shahbazi *et al*. 2010)، گندم علیه *Pyricularia oryzae* Cavara (Debona *et al*. 2012) و *Neovossia indica* (Mitra) Mundkur (Gogoi *et al*. 2001) و سویا علیه *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goidanich (Khaledi and Taheri 2016) گزارش شده است. تنش‌های زنده و غیرزنده در گیاهان با تولید گونه‌های فعال اکسیژن موجب آسیب به لیپیدهای غشای سلول آسیب و نشت مواد از سلول می‌گردند (Saleem *et al*. 2011). بنابراین، پراکسیداسیون لیپیدهای غشا را می‌توان به‌عنوان نشانه‌ای از آسیب اکسیداتیو در نظر گرفت و از آن برای تعیین میزان آسیب وارده به غشا تحت تنش استفاده نمود. در این

رابطه، سنجش مالون دی آلدئید به‌عنوان معیاری برای بررسی میزان پراکسیدسیون لیپیدها در نظر گرفته می‌شود (Popham and Novacky 1990). قارچ‌ها و باکتری‌های محرک رشد با کاهش تنش‌های زنده و غیرزنده، آسیب اکسیداتیو (افزایش مالون دی آلدئید) را کاهش می‌دهند (Ahmad *et al*. 2015). آنزیم پراکسیداز از طریق تولید رادیکال آزاد و پراکسید هیدروژن و کاهش گونه‌های مختلف اکسیژن دفاع گیاه را افزایش می‌دهد (Souza *et al*. 2017). در این رابطه، مقاومت گیاهان لوبیا چشم‌بلبلی علیه *Uromyces vignae* Barclay (Mould *et al*. 2003)، مقاومت گیاهان باقلا علیه *Uromyces fabae* de Bary ex Cooke (Jakupovic *et al*. 2006)، مقاومت گیاهان پنبه علیه *Rhizoctonia solani* Kühn (Howell *et al*. 2000) و مقاومت گیاهان ذرت علیه *Aspergillus flavus* Link (Magbanua *et al*. 2007) با افزایش آنزیم پراکسیداز در ارتباط بوده است. با توجه به اهمیت گیاه دارویی ریحان و مصارف گسترده آن در صنایع غذایی، آرایشی، بهداشتی و عطرسازی، همچنین اهمیت استفاده از کودهای بیولوژیک در راستای کشاورزی پایدار، این پژوهش با هدف بررسی تاثیر دو گونه از قارچ *Trichoderma* بر افزایش رشد گیاه ریحان و کنترل بیماری مرگ گیاهچه انجام شد. همچنین با توجه به نقش افزایش توان سیستم اکسیداتیو و تحریک متابولیسم ترکیبات فنلی در کاهش تنش توسط آنتاگونیست‌های قارچی و باکتریایی، تجمع ترکیبات فنلی، فعالیت آنزیم پراکسیداز و کاهش مالون دی - آلدهید در سازوکار کاهش تنش ناشی از *R. solani* بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جدایه‌ی *R. solani*

جدایه‌ی بیماری‌زای *R. solani* و قارچ‌های آنتاگونیست *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride* از کلکسیون قارچ‌های گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد. منشا جدایه قارچ بیمارگر از گیاهان ریحان از مزارع ساری و قارچ‌های آنتاگونیست *T. harzianum* و *T. viride* از خاک زراعی پنبه از مزارع کردکوی بوده است. نگه‌داری قارچ‌های مذکور روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (Potato dextrose agar =PDA) و دمای ۷-۵ درجه سلسیوس بوده است.

تهیه زادمایه و خاک آلوده به *R. solani*

ابتدا ماسه و آرد ذرت به نسبت ۹ به ۱ مخلوط و به ازای ۱۰۰ گرم از مخلوط به‌دست آمده ۱۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد. سپس ظروف حاوی مخلوط فوق در اتوکلاو با دمای ۱۲۱ درجه‌ی سلسیوس و فشار یک اتمسفر به‌مدت ۲۰ دقیقه ضدعفونی شدند. بعد از خنک شدن، ۳ قطعه ۵ میلی‌متری از حاشیه پرگنه چهار روزه قارچ رشد داده شده روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار به مخلوط حاصل اضافه گردید و ظروف در دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۴ هفته نگه‌داری شدند. زادمایه به‌دست آمده با خاک سترون شده به نسبت ۱/۵ درصد وزنی مخلوط گردید (Bienkowski *et al*. 2010). برای گلدان‌های شاهد از مخلوط آرد ذرت و ماسه سترون فاقد عامل بیماری استفاده شد. تجزیه‌وتحلیل خاک مورد استفاده قبل از سترون در جدول ۱ آمده است.

تهیه سوسپانسیون اسپور گونه‌های *Trichoderma*

برای تهیه سوسپانسیون اسپور، دو گونه مختلف *Trichoderma* روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار کشت شدند و تشتک‌های پتری به مدت یک هفته در انکوباتور در شرایط تاریکی و دمای ۲±۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس اسپورهای قارچ‌های مورد مطالعه با اضافه نمودن ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به سطح پرگنه‌های رشد کرده جمع‌آوری شدند. به‌منظور جدا نمودن ترکیبات حل شده از محیط کشت، سوسپانسیون اسپور و ریسه دو بار با آب مقطر استریل به‌وسیله سانتریفیوژ و به‌مدت ۱۰ دقیقه در سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه شست‌وشو شد. پس از عبور سوسپانسیون از کاغذ صافی واتمن شماره یک به‌منظور حذف ریسه، غلظت مایه تلقیح توسط لام هماسیتومتر به میزان 1×10^{7} اسپور در هر میلی‌لیتر رسانده شد (Jahandideh Mahjen Abadi and Sepehri 2014).

کشت گیاه

بذرهای ریحان برای ۲ دقیقه در هیپوکلریت‌سدیم ۱ درصد ضدعفونی و شش بار با آب مقطر به‌خوبی شسته شدند (Faghih Abdollahi *et al*. 2015). به‌منظور پوشش بذرها با سوسپانسیون اسپور قارچ‌های آنتاگونیست، از هر گونه، سوسپانسیون به میزان $۱×۱۰^{۷}$ اسپور در هر میلی‌لیتر حاوی ۰/۵ درصد کربوکسی‌متیل سلولز تهیه شد. بذرها به تناوب چندین بار در سوسپانسیون مذکور قرار گرفتند و زیر هود لامینار خشک شدند (Mehrabi-Koushki *et al*. 2012). میانگین تعداد اسپور پوشش داده شده روی هر بذر $۶×۱۰^{۶}$ بوده است. برای تیمار شاهد، بذرها با محلول کربوکسی‌متیل سلولز ۰/۵ درصد پوشیده شدند. بذرها پس از کشت در گلدان‌های پلاستیکی با ابعاد ۱۵×۲۰ سانتی‌متر محتوی خاک مزرعه (جدول ۱)، در شرایط گلخانه با دمای روزانه ۲۴ تا ۲۷ و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند.

اندازه‌گیری صفات رشدی و ارزیابی بیماری

پس از ۴۰ روز از کاشت بذرها در گلدان، طول ساقه، ریشه، وزنِ خشک گیاه و درصد شاخص بیماری محاسبه گردید. به‌منظور محاسبه وزن خشک گیاه، بوته‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۷۲ درجه سلسیوس خشک شدند و وزن آن‌ها به‌وسیله ترازو با دقت یک‌هزارم اندازه‌گیری گردید. درجه‌بندی بوته‌ها از نظر مرگ گیاهچه بر اساس درصد تغییر رنگ ریشه و ساقه و مقیاس ۳- ۰ (۰= بدون آلودگی، ۱- زخم‌های سطحی روی ساقه، ۲- زخم‌های فرورفته روی ساقه و پژمردگی، ۳- مرگ کامل گیاهچه) صورت گرفت و شاخص بیماری بر اساس درصد ایجاد بیماری × میانگین درجه‌بندی بوته‌ها محاسبه شد (Mehrabi-Koushki *et al*. 2012).

اندازه‌گیری فنل کل

غلظت فنل کل در ۰/۱ گرم از بافت ریشه به‌روش مالسنیک و همکاران (Malencic *et al*. 2007) بر اساس تغییر رنگ عصاره‌ی فنلی توسط معرف فولین- سیوکالتو در معرض کربنات سدیم ۲۰٪ انجام شد. در این رابطه، پس از مخلوط شدن ۰/۱ تا ۰/۴ میلی‌لیتر از عصاره الکلی استخراج شده با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالتو، مقدار جذب نمونه‌ها پس از یک ساعت در طول موج ۷۲۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. برای تهیه منحنی استاندار از اسیدگالیک استفاده شد و فنل کل برحسب میلی‌گرم اسید گالیک در یک گرم ریشه به‌دست آمد.

سنجش مقدار کل پروتئین محلول

برای اندازه‌گیری پروتئین، ۰/۲ گرم از بافت ریشه مورد نظر در مجاورت نیتروژن مایع به‌تدریج ساییده شد و با ۰/۶ میلی‌لیتر بافر تریس همگن گردید. سپس نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۱۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. برای برآورد میزان پروتئینِ کل در عصاره‌ی بافت گیاه از معرف برادفورد استفاده گردید و میزان جذب در ۵۹۵ نانومتر (محدوده‌ی نور آبی) با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. رسم منحنی استاندارد با استفاده از سرم آلبومین گاوی و میزان پروتئین بر حسب میلی‌گرم در هر گرم بافت تر گیاه محاسبه گردید (Bradford 1976).

سنجش آنزیم پراکسیداز

برای سنجش مقدار آنزیم پراکسیداز ابتدا ۰/۵ گرم از بافت ریشه در هاون چینی در مجاورت نیتروژن مایع به‌تدریج ساییده شد و با ۱۵ میلی‌لیتر بافر فسفات (۷= pH، 0.05M) همگن گردید. سپس مخلوط حاصل به‌مدت ۱۵ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و سوسپانسیون رویی جهت بررسی میزان تغییر آنزیم پراکسیداز استفاده گردید. اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز با استفاده از H_2O_2 و فنیل‌دی‌آمین و تغییرات جذب نور در طول موج ۴۸۵ نانومتر به‌مدت ۳ دقیقه و هر ۱۵ ثانیه یک‌بار بوده است. مقدار فعالیت آنزیم بر حسب واحد آنزیم بر دقیقه بر میلی‌گرم پروتئین (Min/mg.protein) بیان شد (Archangi and Khodambashi 2014, Nakano *et al*. 1987).

سنجش مالون دی آالدئید

برای اندازه‌گیری میزان مالون دی آالدئید ۰/۲ گرم بافتِ تر ریشه در ۵ میلی‌لیتر از اسید تری‌کلرواستیک (TCA

(Trichloroacetic acid= ۱ درصد همگن شد. پس از سانتریفوژ به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه، به یک میلی‌لیتر از محلول رویی ۴ میلی‌لیتر از محلول محتوی TCA ۲۰ درصد و اسید تیوباربیتوریک (Thiobarbituric acid) ۰/۵ درصد اضافه گردید. نمونه‌ها پس از قرار گرفتن به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه سلسیوس و سرد شدن آن‌ها در آب یخ، به‌مدت ۵ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. در نهایت میزان جذب نمونه‌ها در دو طول موج ۵۳۲ و ۶۰۰ نانومتر خوانده شد و میزان مالون دی آالدئید برحسب نانومول در یک گرم بافت به‌دست آمد (Popham and Novacky 1990).

تجزیه‌وتحلیل آماری

این مطالعه با چهار تکرار در قالب آزمایش فاکتوریل بر پایه طرح کامل تصادفی انجام شد. فاکتورهای آزمایش شامل تیمار قارچ‌های آنتاگونیست و تیمار آلودگی (عدم مایه‌زنی و مایه‌زنی بیمارگر) بود. میانگین داده‌ها با بهره‌گیری از آزمون کمترین تفاوت معنی‌دار (LSD) و با در نظر گرفتن سطح اطمینان $P\leq$۰/۰۵ تجزیه واریانس یک عاملی (One way ANOVA) مورد بررسی قرار گرفتند. خوشه‌بندی داده‌ها نیز با استفاده از روش الحاق مجاور بر اساس کل داده‌ها انجام شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار R 3.3.1 انجام شد و ترسیم شکل‌ها توسط نرم‌افزار Excell 2007 صورت گرفت.

جدول ۱. ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاک

Table 1. Physical and chemical characteristics of soil

Soil texture	Nitrogen	Phosphate	Potash	pH	EC (ds/m)
	ppm				
Loamy-Clay	11.5	14.7	275	7.55	1.24

نتایج

نتایج حاصل از تجزیه‌وتحلیل داده‌ها نشان داد که تیمار بذرها با دو گونه *Trichoderma* بر طول بوته، وزن خشک قسمت‌های هوایی، وزن خشک ریشه، شاخص بیماری مرگ گیاهچه، فعالیت پراکسیداز، فنلِ کل و مالون دی آالدئید معنی‌دار بود، اما قطر ساقه در تیمارهای مختلف فاقد اختلاف معنی‌دار بوده است ($P\leq0.05$، جدول ۲). طول بوته تنها در بذرهای کشت شده در خاک آلوده به قارچ بیمارگر کاهش داشت و در رابطه با تیمارهای دیگر (شاهد غیرآلوده به قارچ بیمارگر و بذرمال‌های انجام شده توسط قارچ‌های آنتاگونیست) فاقد اختلاف معنی‌دار بود ($P\leq0.05$، جدول ۳). بیماری مرگ گیاهچه بر وزن خشک بوته تاثیر منفی داشته است و ارتباط دو متغیر به‌صورت مدل رگرسیونی $Y=0.0004209x^2-0.002X+5.09$ با ضریب تبیین ۰/۷۹۲ ($P\leq0.01$) به‌دست آمد (شکل۱). از نظر وزن خشک بوته میانگین داده‌ها به ترتیب در سه گروه تیمار بذر توسط *T. harzianum*، بذرهای کشت شده در خاک شاهد غیرآلوده به قارچ بیمارگر و بذرهای تیمار شده توسط *T. viridae* و بذرهای کشت شده در خاکآلوده به قارچ بیمارگر قرار گرفتند (جدول ۳). قارچ‌های آنتاگونیست بر وزن خشک ریشه تاثیر مثبتی داشتند و باعث افزایش وزن خشک ریشه می‌شدند ($P\leq0.05$، جدول ۳). دو گونه *Trichoderma* شاخص بیماری مرگ گیاهچه را در گیاهان ریحان کاهش می‌دادند، به‌طوری که میزان بیماری از ۷۱/۲۵ درصد در گیاهان شاهد آلوده به ۸/۷۵ الی ۱۵/۷۵ درصد در گیاهان تیمار شده با قارچ آنتاگونیست کاهش می‌یافت. حفاظت گیاه علیه بیماری مرگ گیاهچه در رابطه باجدایه‌های گونه *T. harzianum* بیشتر از جدایه‌های گونه *T. viride* بوده است ($P\leq0.01$، شکل ۲). دو گونه *Trichoderma* و *R. solani* هر یک به‌تنهایی در افزایش فعالیت پراکسیداز و فنل کل گیاه موثر بودند و بیشترین فعالیت پراکسیداز و سطح فنل کل در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* مشاهده شد. با توجه به تاثیر مثبت فنل کل بر شاخص بیماری مرگ گیاهچه، مدل رگرسیونی $Y=-10*e^{-5}x^2-0.004X+704$ با ضریب تبیین ۰/۷۳۵ ($P\leq0.01$) به‌دست آمد (شکل ۳). نتایج جدول ۳ نشان می‌دهد که فعالیت آنزیم پراکسیداز در تمامی تیمارها نسبت به تیمار شاهد (بدون قارچ بیمارگر) افزایش داشته است. در

این رابطه، ارتباط بین فعالیت آنزیم پراکسیداز و شاخص بیماری به‌صورت مدل رگرسیونی $Y=-10*e^{-7}x^{2}-2*e^{-5}x+0.006$ با ضریب تبیین ۰/۷۷۱ ($P\leq0.01$) محاسبه گردید (شکل ۳). تاثیر قارچ‌های آنتاگونیست و جدایه‌های آن‌ها بر فعالیت پراکسیداز و فنل کل متفاوت بوده است (جدول ۳). نتایج مربوط به تاثیر دو گونه *Trichoderma* و *R. solani* بر تغییر مالون دی آلدئید نشان داد که میزان مالون دی آلدئید تنها در تیمار قارچ بیمارگر به‌تنهایی افزایش داشته است. در این رابطه، تاثیر دو گونه *Trichoderma* بر عدم افزایش مالون دی آلدئید فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ($P\leq0.01$، جدول ۳). دندروگرام ترسیم شده برای کارایی گونه‌ها و جدایه‌های *Trichoderma* نشان داد که جدایه‌های ۱ و ۲ از *T. harzianum* در یک گروه و جدایه ۳ از *T. harzianum* و جدایه‌های *T. viride* در گروه دیگر قرار می‌گیرند.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس برای تاثیر *Rhizoctonia solani* بر صفات رشدی و بیوشیمیایی گیاه ریحان در حضور یا فقدان *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride*.

Table 2. The results of variance analysis for influence of *Rhizoctonia solani* on growth and biochemical parameters of basil plant in presence and absence of *Trichoderma harzianum and Trichoderma viride*.

Source of variation	Mean of Squares								
	df	Shoot height	Stem diameter	Shoot dry weight	Root dry weight	Phenol	Peroxidase	Malondialdehyde	Disease Index
Treatment	13	44.84^{*a}	0.632^{ns}	1.1845*	0.05342*	0.0297*	$1.65\times10^{-6**}$	1.044*	1409.7*
Residuals	42	13.96	0.0662	0.1163	0.01708	0.0025	9.9×10^{-8}	0.1107	5.6
c.v.	-	10.60	11.73	8.53	9.52	8.39	5.97	10.57	19.66

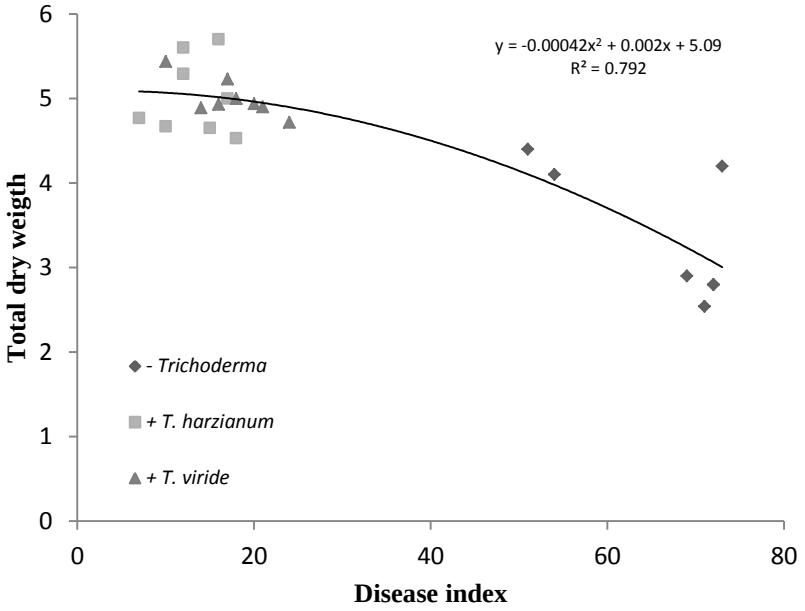
a** = probability level $p\leq0.01$, *= probability level $p\leq0.05$, ns= not significant

جدول ۳. مقایسه میانگین صفات رشدی و برخی از ویژگی‌های بیوشیمیایی گیاه ریحان برای تاثیر *Rhizoctoni solani* در حضور یا فقدان *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride*.

Table 3. Means comparisons of growth and biochemical parameters in basil plant for influence of *Rhizoctonia solani* in presence and absence of *Trichoderma harzianum and Trichoderma viride*.

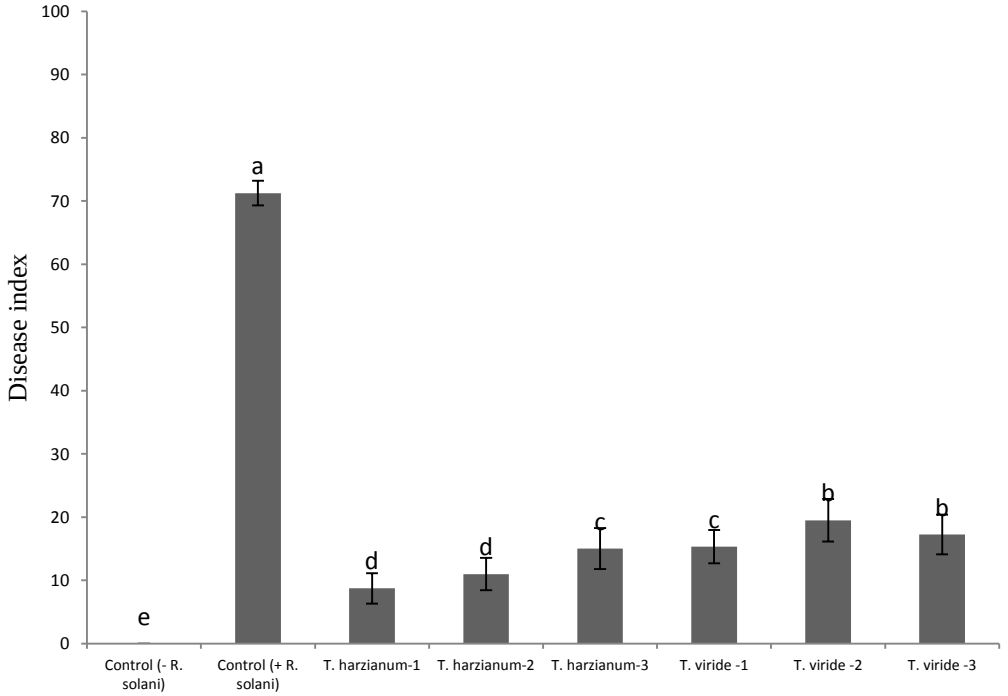
Treatment	Shoot height (cm)	Shoot dry weight (g/plant)	Root dry weight (g/plant)	Phenol (mg / g^{-1} FW)	Peroxidase (enzyme unit mg^{-1} protein)	Malondialdehyde (nmol g^{-1} FW)
Control						
- *R. solani*	37.22 a*	3.30 c	1.280 b	0.375 e	0.00427 e	2.80 b
+ *R. solani*	2475 b	2.00 d	1.025 c	0.462 d	0.00542 d	4.17 a
T. harzianum-1						
- *R. solani*	37.55 a	4.53 a	1.410 ab	0.702 a	0.0065 ab	3.02 b
+ *R. solani*	37.75 a	4.75 a	1.450 ab	0.695 a	0.0067 a	2.80 b
T. harzianum-2						
- *R. solani*	37.50 a	4.36 a	1.400 ab	0.711 a	0.0064 ab	3.02 b
+ *R. solani*	37.30 a	4.41 a	1.510 a	0.692 a	0.0067 a	2.80 b
T. harzianum-3						
- *R. solani*	33.55 a	3.64 bc	1.427 ab	0.615 b	0.00605 c	3.02 b
+ *R. solani*	34.75 a	3.38 bc	1.483 a	0.595 bc	0.00615 bc	2.80 b
T. viride -1						
- *R. solani*	35.75 a	3.61 bc	1.410 ab	0.617 b	0.00611 bc	3.05 b
+ *R. solani*	36.87 a	3.60 bc	1.362 ab	0.605 bc	0.00630 abc	2.92 b
T. viride -2						
- *R. solani*	34.75 a	3.62 bc	1.400 ab	0.535 cd	0.00615 bc	3.05 b
+ *R. solani*	36.00 a	3.38 bc	1.380 ab	0.595 bc	0.00635 abc	2.92 b
T. viride -3						
- *R. solani*	34.33 a	3.68 bc	1.372 ab	0.605 bc	0.00612 bc	3.05 b
+ *R. solani*	36.00 a	3.51 bc	1.382 ab	0.593 b	0.00635 abc	2.92 b

* Columns related to three cultivars that have common words are not significant (test LSD, $p\leq0.05$).



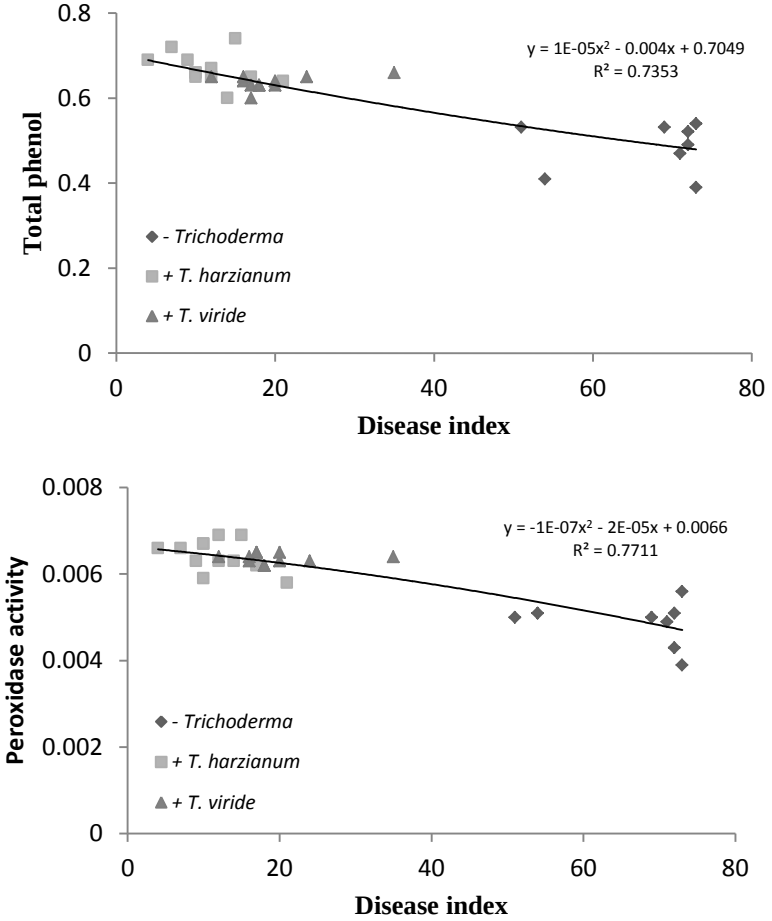
شکل ۱. مدل رگرسیونی برازش داده شده برای توصیف ارتباط بین وزن خشک بوته (گرم) با شاخص بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *Rhizoctonia solani* در گیاهان ریحان در حضور یا فقدان *Trichoderma harzianum* و*Trichoderma viride*.

Fig 1. Reggression model for relationship between total dry weigth of basil plants and disease index caused by *Rhizoctonia solani* in presence and absence of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride*.



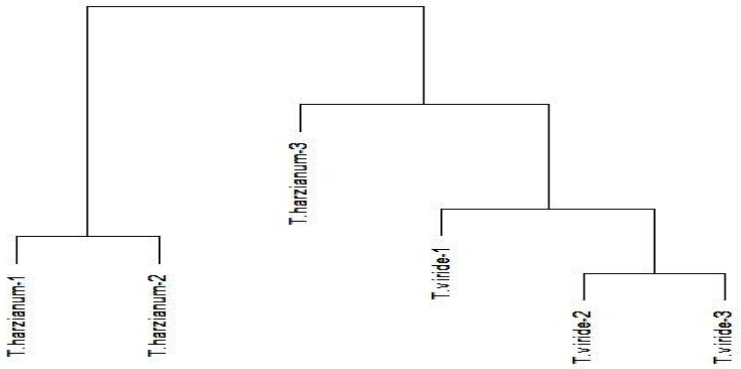
شکل ۲. مقایسه میانگین شاخص بیماری گیاه ریحان ناشی از *Rhizoctoni solani* در حضور جدایه‌های *Trichoderma harzianum* و*Trichoderma viride*.

Fig 2. Means comparisons of disease index in basil plant caused by *Rhizoctonia solani* in presence of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride* isolates.



شکل ۳. مدل رگرسیونی برای توصیف ارتباط بین تغییرات فنل کل ریشه (میلی‌گرم بر گرم بافتِ تر، بالا) و پراکسیداز (واحد آنزیم بر میلی‌گرم پروتئین، پایین) با شاخص بیماری مرگ گیاهچه ناشی از *Rhizoctonia solani* در گیاهان ریحان در حضور یا فقدان *Trichoderma harzianum* و *Trichoderma viride*.

Fig 3. Reggression model for relationship between total phenol (mg g-1 root FW, up) and peroxidase (enzyme unit mg^{-1} protein, down) of basil plants and disease index caused by *Rhizoctonia solani* in presence and absence of *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma viride*.



شکل ۴. دندروگرام ترسیم شده برای کارایی گونه‌ها و جدایه‌های *Trichoderma* بر گیاه ریحان در حضور یا فقدان *Rhizoctonia solani*.

Fig 4. Dendrogram showing differences in efficiency of *Trichoderma* species and isolates on basil plants in presence and absence of *Rhizoctonia solani*.

بحث

ریحان همانند سایر گیاهان تیره نعناع منبع ترکیبات حلقوی و اسانس است که عملکرد ضدانگلی، ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اُکسیدانی دارند. این ترکیبات باعث ایجاد رنگ، طعم و ویژگی‌های فیزیولوژیک خاصی در گیاهان می‌شوند و از گیاه در برابر تنش‌های زیستی و غیرزیستی محافظت می‌نمایند (Reuveni *et al*. 2002). تولید متابولیت‌های ثانویه اگرچه تحت کنترل ژنتیکی است، اما عوامل محیطی، به‌ویژه شرایط تنش‌زا نقش عمده‌ای در کمیت و کیفیت این مواد به‌عهده دارند (Harmosa *et al*. 2012). بیشتر گونه‌های *Trichoderma* همزیست‌های گیاهی سودمندی هستند که امکان حضور آن‌ها در همه جا وجود دارد. رشد این قارچ‌ها سریع است و از آن‌ها به‌عنوان یک اصلاح‌گر متابولیسم گیاه در بخش کشاورزی استفاده می‌شود (Amini *et al*. 2014). نقش اصلی این قارچ‌ها در کانی کردن مواد آلی و تولید کمپوست می‌باشد، به‌گونه‌ای که جذب مواد غذایی و رشد را در گیاهان افزایش می‌دهند (Rudresh *et al*. 2005). در این رابطه، تیمار *Trichoderma atroviride* با افزایش رشد ریشه و ساقه بوته‌های گوجه‌فرنگی همراه بوده است (Gravel *et al*. 2007). گونه *T. viride* نیز رشد ریشه و اندام‌های هوایی را در نخود افزایش می‌داد (Dubey *et al*. 2006). در این بررسی گونه‌های *Trichoderma* مورد آزمایش رشد ریشه و اندام‌های هوایی ریحان را افزایش می‌دادند، اگرچه میزان تاثیر دو گونه *T. harzianum* و *T. viride* بر رشد گیاه ریحان متفاوت بوده است (جدول ۳). بیمارگرهای گیاهی نه‌تنها رشد و نمو گیاهان را کاهش می‌دهند، بلکه موجب تغییر در مسیر برخی از فرآیندهای متابولیسمی نیز می‌گردند (Okorski *et al*. 2014). تغییرات بیوشیمیایی در سلول‌ها با ممانعت از پیشرفت آلودگی، مقاومت گیاه را در مقابل تنش افزایش می‌دهند (Van Loon *et al*. 2006). در این رابطه، گونه‌های مختلف *Trichoderma* به‌عنوان محرک تغییرات بیوشیمیایی در سلول عمل می‌کنند (Gaderer *et al*. 2015). از جمله مهم‌ترین سازوکارهای کنترل‌زیستی توسط گونه‌های مختلف *Trichoderma* تحریک سیستم دفاعی گیاه با تغییر در میزان هورمون‌های گیاه میزبان، سنتز و ترشح ترکیبات فنلی داخل و خارج سلول و سنتز پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی است که مقاومت سیستمیک میزبان را منجر می‌شود (Amini *et al*. 2014, Anjum *et al*. 2012, Mastouri *et al*. 2010). تجمع و اکسید ترکیبات فنلی به‌عنوان یکی از سازوکارهای مهم مقاومت گیاه به‌ویژه در ضمن آلودگی‌های قارچی پیشنهاد شده است. این ترکیبات نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، فرونشانی اکسیژن‌های فعال و یا پراکسیدازهای تجزیه کننده دارند (Taheri and Tarighi 2011). از طرفی، به‌نظر می‌رسد که گیاه در زمان تنش‌های محیطی ناشی از عوامل غیرزنده، به‌علت تضعیف سیستم ایمنی، ترکیبات فنلی را افزایش می‌دهد تا بتواند واکنش‌های دفاعی مناسبی را در برابر حمله بیمارگرها در پیش گیرد (Sareena *et al*. 2006). نتایج این تحقیق نیز نشان داد که میزان ترکیبات فنلی در گیاهان آلوده به *R. solani* نسبت به گیاهان غیرآلوه بیشتر بوده است (جدول ۳). همچنین نتایج این آزمایش نشان می‌دهد که *T. harzianum* و *T. viride* تجمع ترکیبات فنله را در گیاه موجب می‌شوند که برآیند آن‌ها مقاومت به بیماری مرگ گیاهچه بوده است (جدول ۳). این تغییرات بیان‌کننده عکس‌العمل گیاه در مقابل حمله بیمارگر است که با نتایج تحقیقات چاندرا و همکاران (Chandra *et al*. 2007) و ال-سهیل‌بانی و همکاران (Al-Sohaibani *et al*. 2011) در رابطه با تاثیر اسید سالیسیلیک بر افزایش ترکیبات فنلی در گیاهان لوبیای چشم‌بلبلی و ریحان و کاهش آلودگی گیاه توسط *R. solani* پشتیبانی می‌شود.

در بین پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی، پراکسیدازها در فعال شدن سیستم دفاع گیاه نقش فعال‌کننده‌ای دارند و باعث محدود کردن گسترش بیمارگر در داخل گیاه می‌شوند (Djonovic *et al*. 2006). هاول و همکاران (Howell *et al*. 2000) نشان دادند که تیمار بذر پنبه با قارچ *T. virens* القای آنزیم پراکسیداز را به‌همراه دارد و از پیشروی قارچ *R. solani* جلوگیری می‌کند. مرتضی‌نیا و همکاران (Mortezania *et al*. 2010) در تحقیقاتی نشان دادند که القای مقاومت

گیاهچه‌های خیار با *T. harzianum* Bi قبل و بعد از مایه‌زنی با *Pythium aphanidermatum* در ارتباط با حداکثر فعالیت آنزیم پراکسیداز است. به‌طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که در تیمارهای قارچ‌های آنتاگونیست گیاهچه‌ها میزان پراکسیداز بالاتری نسبت به تیمارهای آلوده به *R. solani* به‌تنهایی داشتند و از نظر ظاهری نیز از سلامت بیشتری برخوردار بودند (جدول ۳). تولید گونه‌های فعال اکسیژن در گیاهان تحت تنش‌های زنده و غیرزنده با تجزیه چربی‌های غشای سلولی و تولید مالون دی آلدئید همراه است (Saleem *et al*. 2011). بنابراین، سنجش مالون دی - آلدئید به‌عنوان یک معیار مناسب برای تعیین میزان آسیب وارده به غشا در گیاهان تحت تنش در نظر گرفته می‌شود (Ashraf *et al*. 2010). در این بررسی نیز آلودگی گیاه ریحان به *R. solani* با افزایش مالون دی - آلدئید همراه بوده است (جدول ۳). این نتایج با گزارش-های دیگر در گیاهان برنج (Sareena *et al*. 2006) آلوده به *R. solani* و خیار آلوده به *Pythium aphanidermatum* (Mortezania *et al*. 2010) پشتیبانی می‌شود. قارچ‌ها و باکتری‌های محرک رشد با کاهش تنش‌های زیستی و غیرزیستی، از آسیب اکسیداتیو و تغییر مالون دی آلدئید جلوگیری می‌کنند (Gusian *et al*. 2015). در این بررسی نیز قارچ‌های *T. harzianum* و *T. virens* با کاهش آلودگی، از افزایش مالون دی آلدئید ممانعت می‌کردند (جدول ۳).

نتایج کلی این آزمایش نشان می‌دهد که قارچ تریکودرما در القای مقاومت گیاه ریحان موثر بوده است و می‌تواند به‌عنوان یک رهیافت بیوتکنولوژیک برای بهبود رشد و مقاومت به تنش ناشی از *R. solani* پیشنهاد شود. اگرچه پاسخ‌های متفاوت گیاه به تنش در حضور جدایه‌های مختلف *T. harzianum* و *T. virens* نشان می‌دهد که تغییرات فیزیولوژیک گیاه و تغییر واکنش به *R. solani* به گونه و جدایه آنتاگونیست مورد استفاده بستگی دارد.

REFERENCES

Ahmad P, Ozturk M, Sharma S, Gucel S (2014) Effect of sodium carbonate-induced salinity-alkalinity on some key smoprotectants, protein profile, antioxidant enzymes, and lipid peroxidation in two mulberry (*Morus alba* l.) cultivars. Journal of Plant Interaction 9 (1): 460-467.

Al-Sohaibani SA, Mahmoud MA, Al-Othman MR, Ragab MM, Saber MM, Abd El- Aziz ARM (2011) Influence of some biotic and abiotic inducers on root rot disease incidence of sweet basil. African Journal of Microbiology Research 5 (22): 3628-3639.

Amini Y, Mohammadi A, Zafari D (2014) *Trichoderma* species associated with medicinal plants. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research 2 (9): 2566-2568.

Anjum T, Fatima S, Amjad S (2012) Physiological changes in wheat during development of loose smut. *Tropical Plant Pathology* 37 (2): 102-107.

Archangi A, Khodambashi M (2014) Effects of salinity stress on morphological characteristics, essential oil content and ion accumulation in basil (*Ocimum basilicum*) plant under hydroponic conditions. Jounal of *Science* and *Technology* of Greenhouse Culture 5 (1): 125-138 (In Persian).

Bienkowski D, Stewart A, Falloon RE, Braithwaite M, Loguerci LL (2010) A disease assay for *Rhizoctonia solani* on potato (*Solanum tuberosum*). New Zealand Plant Protection 63 (1): 133-137.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 (1-2):248-254.

Chandra A, Saxena R, Dubey A, Saxena P (2007) Changes in phenylalanine ammonia lyase activity and isozyme patterns of polyphenol oxidase and peroxidase by salicylic acid leading to enhanced resistance in cowpea against *Rhizoctonia solani*. Acta Physiologiae Plantarum 29 (4): 361-367.

Chenni M, El Abed D, Rakotomanomana N, Fernandez X, Chemat F (2016) Comparative study of essential oils extracted from Egyptian basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) using hydro-distillation and solvent-free microwave extraction. Molecules 21 (1): 113-129.

Darzi MT, Ghalavand A, Rejali F (2009) The effects of biofertilizers application on N, P, K assimilation and seed yield in fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants 25 (1): 1-19 (In Persian).

Debona D, Rodrigues F, Rios JA, Nascimento, KJT (2012) Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. Phytopathology 102 (12): 1121-1129.

Djonovic S, Pozo MJ, Dangott LJ, Howell CR, Kenerley CM (2006) Sm1, a proteinaceous elicitor secreted by the biocontrol fungus *Trichoderma virens* induces plant defense responses and systemic

resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19 (8): 838-853.

Dubey SC, Suresh M, Singh B (2006) Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*, for integrated management of chickpea wilts. *Biological control* 40 (1): 118-127.

Faghih Abdollahi L, Pirdashti H, Yaghoubian Y, Alavi SM (2015) Effect of *Piriformospora indica* and *Trichoderma tomentosum* fungi on basil (*Ocimum basilicum* L.) growth under copper nitrate levels. Journal of Soil Management and Sustainable Production 5 (1): 113-127.

Gaderer R, Lamdan NL, Seidl-Seiboth V (2015) Sm2, a paralog of the *Trichoderma cerato-platanin* elicitor Sm1, is also highly important for plant protection conferred by the fungal-root interaction of Trichoderma with maize. *BMC Microbiology* 15(2): doi:10.1186/s12866-014-0333-0.

Garibaldi A, Gullino ML, Minuto G (1997) Diseases of basil and their management. Plant Disease 81 (1): 124-132.

Gogoi R, Singh DV, Srivastava KD (2001) Phenols as a biochemical basis of resistance in wheat against Karnal bunt. Plant Pathology 50 (4): 470-476.

Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ (2007) Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology* and *Biochemistry* 39 (8): 1968-1977.

Gusian YS, Singh, US, Sharma AK (2015) Bacterial mediated amelioration of drought stress in drought tolerant and susceptible cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). African Journal of Biotechnology 14 (9): 764-773.

Harmosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E (2012) Plant beneficial effects of *Trichoderma* and its genes. Microbiology 158 (1): 17-25.

Howell CR, Hanson LE, Stipanovic RD, Puckhaber LS (2000) Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology 90 (3): 248-252.

Jahandideh Mahjen Abadi V, Sepehri M (2014) Effect of *Piriformospora indica* fungus inoculation on uptakand transportation of some nutrients in two wheat cultivar. Journal of Soil Management and Sustainable Production 4 (3): 155-173.

Jakupovic M, Heintz M, Reichmann P, Mendgen K, Hahn M (2006) Microarray analysis of expressed sequence tags from haustoria of the rust fungus *Uromyces fabae*. Fungal Genetics and Biology 43 (1): 8-19

Khaledi M, and Taheri P (2016) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* against soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina.* Journal of Plant Protection Research 56 (1): 21-31.

Koochaki A, Nassiri Mahalat M, Najafi F (2004) The agrobiodiversity of medicinal and aromatic plants in Iran. Iran Journal of Field Crops Research 2 (2): 208-216 (In Persian).

Magbanua ZV, De Moraes CM, Brooks TD, Williams WP, Luthe DS (2007) Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus?* Molecular Plant-Microbe Interactions 20 (6): 697-706.

Malencic D, Popovic M, Miladinovic J (2007) Phenolic content and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) seeds. Molecules 12 (3): 576-581.

Mastouri F, Bjorkman T, Harman GE (2010) Seed treatment with *Trichoderma harzianum* alleviates biotic, abiotic, and physiological stresses in germinating seeds and seedlings. Phytopathology 100 (11): 1213-1221.

Mehrabi-Koushki M, Rouhani H, Mahdikhani-Moghaddam E (2012) Differential display of abundantly expressed genes of *Trichoderma harzianum* during colonization of tomato-germinating seeds and roots. Current Microbiology 65 (5): 524-533.

Mortezania H, Rouhani H, Sahebani N (2010) Study of peroxidase enzyme activity induced by *Trichoderma harzianum* Bi in cucumber seedling and its effect in the control of root and foot rot caused by *Pythium aphanidermatum.* Journal of Plant Protection 24 (3): 258-268 (In Persian).

Mould MJR, Xu T, Barbara M, Iscove NN, Heath MC (2003) cDNAs generated fromindividual epidermal cells reveal that differential gene expression predicting subsequent resistance or susceptibility to rust fungal infection occurs prior to the fungus entering the cell lumen. Molecular Plant Microbe Interactions 16 (9): 835-845.

Nakano Y, Asada K (1987) Purification of ascorbate peroxidase in spinach chloroplast: in inactivation in ascorbate-depleted medium and reactivation by monodehydroascorbate radical. Journal of Plant Cell Physiology 28 (1): 131-140.

Okorski A, Oszako T, Nowakowska JA, Lkowska AP (2014) The possibilities of biologically protecting plants against diseases in nurseries, with special consideration of Oomycetes and *Fusarium* fungi. Forest Research Papers 75 (3): 301-321

Popham PL, Novacky A (1990) Use of dimethylsulfoxide to detect hydroxyl radical during bacteria-induced

hypersensitive reaction. Plant Physiology 96 (4): 1157-1160.

Reuveni R, Raviv M, Krasnovsky A, Freiman L, Medina S, Bar A, Orion D (2002) Compost induces protection against *Fusarium oxysporum* in sweet basil. Crop Protection 21 (7): 583-587.

Rudresh DL, Shivaprakash MK, Prasad RD (2005) Effect of combined application of rhizobium, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). *Applied Soil Ecology* 28 (2): 139-146.

Sajjadi SE (2006) Analysis of the essential oils of cultivated basil (*Ocimum basilicum* L.) from Iran. Journal of Pharmaceutical Sciences 14 (3): 128-130.

Sareena S, Poovannan K, Kumar KK (2006) Biochemical responses in transgenic rice plants expressing a defence gene deployed against the sheath blight pathogen, *Rhizoctonia solani*. Current Science 91 (11): 1529-1532.

Shahbazi H, Aminian H, Sahebani, N, Halterman D (2010) Biochemical evaluation of resistance responses of potato to different isolated of *Alternaria solani*. Journal of phytopathology 100 (5): 454-459.

Taheri P, Tarighi S (2011) A survey on basal resistance and riboflavin-induced defense responses of sugar beet against *Rhizoctonia solani*. Journal of Plant Physiology 168 (10): 1114-1122.

Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology 44 (1): 135-162.