

Study of the effect of *Trichoderma harzianum* on soybean charcoal rot agent *Macrophomina phaseolina*

1. Valiollah Babaeizad^{1*}: Professor, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Milad Habibi Daronkolaei²: Researcher, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Fakhtak Taliei³: Assistant Professor, Faculty of Agriculture and Natural resources, Gonbad Kavous University, Gonbad Kavous, Iran
3. Mohammad Ali. Barimani Varandi³: Researcher, Faculty of Crop Sciences, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3. Mahtab Yazdandost³: Graduate M.Sc., Department of Agronomy, Islamic Azad University, Gorgan Branch, Gorgan, Iran

*Corresponding Author's Email Address: babaeizad@yahoo.com

Article Type:

Original Research

Received: 07 October 2025

Revised: 13 November 2025

Accepted: 05 December 2025

How to Cite: Babaeizad, V., Habibi Daronkolaei, M., Taliei, F., Barimani Varandi, M. A., & Yazdandost, M. (2024). Study of the effect of *Trichoderma harzianum* on soybean charcoal rot agent *Macrophomina phaseolina*. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 60(4), 364-378.

DOI: 10.22034/IJPP.2025.2021871.500

Abstract:

Soybean charcoal rot, caused by *Macrophomina phaseolina*, is an economically important disease affecting various oilseed crops in northern regions, particularly in Golestan and Mazandaran provinces. This fungus can lead to seedling death, seedling blight, crown rot, stem rot, charcoal rot, and root rot under favorable conditions. The current study utilized a factorial design in a completely randomized setup with 3 replications and 2 factors. The first factor included *T. harzianum* and *M. phaseolina*, while the second factor involved different sampling times. Sampling was conducted at 24, 48, 72, and 96 hours post-pathogen inoculation to assess the activities of CAT, PPO, and GPX enzymes. Disease progression was evaluated 31 days after inoculation. The study found that the activity of CAT, PPO, and GPX enzymes in treated soybeans was higher during the initial hours compared to the control group. Additionally, the severity of *M. phaseolina* disease was lower in the *T. harzianum* treatment group than in the positive control. These findings contribute to a better understanding of the interactions between *T. harzianum* and the biological control of *M. phaseolina*, demonstrating its efficacy in disease management.

Keywords: Control, Disease severity, Enzyme activity



© 2024 the authors. Published by Maher Publishing Institute. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

Extended Abstract

Introduction

Plant diseases are one of the most crucial factors limiting crop yields worldwide (Zhang *et al.* 2016). One such disease is soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, which infects not only soybeans but also other economically significant crops like corn, sorghum, beans, cotton, sesame, sunflower, melon, tobacco, and safflower (Su *et al.* 2001; Purkayastha *et al.* 2006; Singh *et al.* 2008). One method for managing this disease is the use of chemicals, but due to the wide time window of host susceptibility, the long-term survival of the pathogen as a saprophyte in the soil, and the production of sclerotia, there is no effective chemical control method (Wrather *et al.* 1998; Mengistu *et al.* 2011). The extensive use of chemical pesticides has resulted in issues such as safety risks, environmental pollution, loss of biodiversity, and pathogen resistance (Rani *et al.* 2021). Therefore, there is a need for a more effective and environmentally friendly strategy to control plant diseases instead of chemical pesticides, and biological control with *Trichoderma* fungi is one such approach. *Trichoderma* species play a crucial role in the biological control of plant fungal pathogens. This control is achieved indirectly through competition for access to nutrients and growth space, which leads to changes in mechanisms and antibiosis, or directly through mechanisms such as mycoparasitism (Benitez *et al.* 2004). Therefore, this study aims to investigate the effect of *T. harzianum* treatment in controlling soybean charcoal rot disease, as well as to evaluate the activity of antioxidant enzymes and the extent of disease spread.

Methods and Materials

The present study was conducted using a factorial design in a completely randomized setup with 3 replications and 2 factors. The first factor consisted of *T. harzianum* and *M. phaseolina*, while the second factor was the sampling times after pathogen inoculation. The comparison of enzyme

means and disease development was carried out using LSD at the 0.01% significance level with SAS 9.1 statistical software. Graphs illustrating enzyme activity and disease development were created using Excel software.

First, the seeds of the Saman cultivar were disinfected. Then, they were germinated and transferred to pots with sterile soil before being moved to the greenhouse. After three weeks, the seedlings were sprayed with a suspension of *T. harzianum* spores (Yadav *et al.* 2019). After 48 hours, a five-millimeter piece was removed from the edge of a five-day-old *M. phaseolina* colony on PDA culture medium. This piece was then placed on the stem of three-week-old soybean plants after being wounded and secured with parafilm (Talapov *et al.* 2021).

Sampling was performed at 24, 48, 72, and 96 hours after treatment, and disease severity was assessed on day 30. To study enzymatic activity, leaf extract was first extracted, and the activities of CAT, PPO, and GPX enzymes were measured using a spectrophotometer.

Findings

The results of the analysis of variance showed that the effects of treatments on the rate of disease development were significant. In plants treated with *T. harzianum*, after infection with *M. phaseolina*, disease development was reduced by about 75% compared to control plants (positive control).

The results of the analysis of variance for enzyme activity showed that the activity of CAT and GPX enzymes was significant at the one percent level in all sources of change. However, the activity of PPO in the treatment-time was significant at the five percent level, but not in other sources.

The CAT enzyme activity in plants treated with *T. harzianum* increased up to 48 hours after, and decreased slightly at 72 hours, but then increased again at 96 hours. In contrast, the activity of this enzyme in control plants increased up to 72 hours and then decreased at 96 hours. However, at all hours examined, CAT enzyme activity in plants treated with *T. harzianum* was higher than in control plants after infection.

The CAT enzyme activity in plants treated with *T. harzianum* increased up to 48 hours after treatment, decreased slightly at 72 hours, but then increased again at 96 hours. In contrast, the activity of this enzyme in control plants increased up to 72 hours and then decreased at 96 hours. However, at all time points examined, CAT enzyme activity in plants treated with *T. harzianum* was higher than in control plants after infection.

The PPO enzyme activity increased in *T. harzianum*-treated plants at 24 and 48 hours after infection compared to control plants. However, at 72 and 96 hours, the level of activity of this enzyme in control plants was higher. The highest level of activity of this enzyme in *T. harzianum*-treated plants was 5.60 at 24 hours, while it was 5.67 at 96 hours in control plants.

The activity of the GPX enzyme in plants treated with *T. harzianum* increased at 24 and 48 hours, decreased at 72 hours, and then increased again at 96 hours, with the highest enzyme activity recorded at 11.01. In contrast, control plants showed a decrease in activity at 48 hours, but it increased at 72 and 96 hours, with the highest activity recorded at 96 hours at 8.55. When comparing the enzyme activity between treated and control plants, except at 72 hours, the enzyme activity in plants treated with *T. harzianum* was higher than in control plants at other times examined.

Discussion and Conclusion

Various biological stresses, including plant pathogenic fungal infections, induce oxidative stress in cells by stimulating the production and accumulation of reactive oxygen species (ROS). Among the important ROS, O_2^- and H_2O_2 are the most crucial and accumulate rapidly in the cell in response to stress induction. These molecules play a signaling role at low concentrations (Zhang *et al.* 2008), but excessive ROS concentrations lead to oxidative damage, cell death, lipid peroxidation, and destruction of cell membrane structure (Mittler 2002; Sharma *et al.* 2012). Therefore, rapid detoxification of ROS is essential to prevent oxidative damage. To modulate the ROS levels induced by biotic stress, plant cells have developed a complex and efficient

ROS scavenging system in which antioxidant enzyme systems such as CAT, PPO, and GPX play key roles (El-Beltagi *et al.* 2011; Li *et al.* 2015; Schlüter *et al.* 2022).

The present study showed that *T. harzianum* was able to induce defense responses in soybean plants against *M. phaseolina*. The data indicated a significant increase in CAT, PPO, and GPX activities in *T. harzianum* treatment compared to *M. phaseolina* infected control plants, which effectively reduced charcoal rot disease.

This research contributes to a better understanding of the interrelationships and provides theoretical foundations related to the use of *T. harzianum* in the biological control of *M. phaseolina*. However, due to the complexity of the underlying mechanisms, further studies on the induction of resistance to *M. phaseolina* by *T. harzianum* are necessary.

Conflict of Interest

There is no conflict of interest in conducting the present study.

Ethical Considerations

All ethical principles and standards were fully observed in the conduct of this research.

Acknowledgments

The authors would like to express their sincere gratitude to all those who contributed to the various stages of this study.

بررسی تاثیر قارچ *Trichoderma harzianum* بر عامل پوسیدگی زغالی سویا *Macrophomina phaseolina*

۱. ولی‌اله بابایی‌زاد^۱؛ استاد، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
 ۲. میلاد حبیبی درونکلایی^۱؛ پژوهشگر، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
 ۳. فاخرتک طلیعی^۱؛ استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
 ۴. محمدعلی بریمانی ورنندی^۱؛ پژوهشگر، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
 ۵. مهتاب یزدان دوست^۱؛ دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران
- *پست الکترونیک نویسنده مسئول: babaeizad@yahoo.com

نوع مقاله:

چکیده

پژوهشی اصیل

پوسیدگی زغالی سویا ناشی از *Macrophomina phaseolina*، یک بیماری مهم اقتصادی برای گیاهان دانه روغنی مختلف در مناطق شمالی، به ویژه در استان‌های گلستان و مازندران است. در شرایط مساعد، این قارچ باعث مرگ گیاهچه، سوختگی گیاهچه، پوسیدگی طوقه، پوسیدگی ساقه، پوسیدگی زغالی و پوسیدگی ریشه می‌شود. پژوهش حاضر بر اساس فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار و ۲ فاکتور که فاکتور اول شامل *Trichoderma harzianum* و *M. phaseolina* و فاکتور دوم زمان‌های نمونه برداری بود. پس از تلقیح بیمارگر، نمونه‌برداری در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت انجام و برای اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های CAT، PPO و GPX مورد استفاده قرار گرفت و میزان پیشرفت بیماری ۳۱ روز پس از تلقیح صورت گرفت. در این پژوهش، میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، PPO و GPX در سویاهای تیمار شده طی ساعات اولیه نسبت به شاهد بیشتر و میزان شدت بیماری قارچ *M. phaseolina* در تیمار *T. harzianum*، نسبت به کنترل مثبت کمتر بود. نتایج این تحقیق به بهبود درک روابط متقابل *T. harzianum* در کنترل زیستی *M. phaseolina* کمک کرده و نشان داد اثر خوبی در کنترل بیماری داشته است.

کلیدواژگان: شدت بیماری، فعالیت آنزیمی، کنترل

تاریخ دریافت: ۲۲ آبان ۱۴۰۴

تاریخ بازنگری: ۲۲ آبان ۱۴۰۴

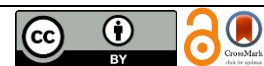
تاریخ پذیرش: ۱۴ آذر ۱۴۰۴

نحوه استناددهی: بابایی‌زاد، ولی‌اله، حبیبی درونکلایی، میلاد، طلیعی، فاخرتک، بریمانی ورنندی، محمدعلی، و یزدان دوست، مهتاب. (۱۴۰۳). بررسی تاثیر قارچ *Trichoderma harzianum* بر عامل پوسیدگی زغالی سویا *Macrophomina phaseolina*

بیماری‌های گیاهی، ۶۰(۴)، ۳۷۸-۳۶۴.

DOI:

10.22034/IJPP.2025.2021871.500



مجوز و حق نشر: © ۱۴۰۳ تمامی حقوق انتشار این مقاله متعلق به نویسنده است. انتشار این مقاله توسط انتشارات ماهر به صورت دسترسی آزاد مطابق با گواهی (CC BY 4.0) صورت گرفته است.

مقدمه

بیماری‌های گیاهی در سراسر جهان یکی از مهم‌ترین عواملی هستند که عملکرد محصولات کشاورزی را محدود می‌کنند (Zhang et al., 2016). یکی از این بیماری‌ها، پوسیدگی زغالی سویا ناشی از *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid است. در ایران، پوسیدگی زغالی یک بیماری مهم اقتصادی برای گیاهان دانه روغنی مختلف در مناطق شمالی، به ویژه در استان‌های گلستان و مازندران است (Bowen & Schapaugh, 1989; Rayatpanah et al., 2012; Todd, 1993). قارچ *M. phaseolina* علاوه بر سویا، گیاهانی با اهمیت اقتصادی مانند ذرت، سورگوم، لوبیا، پنبه، کنجد، آفتابگردان، خربزه، تنباکو و گلرنگ را نیز آلوده می‌کند (Purkayastha et al., 2006; Singh et al., 2008; Su et al., 2001). در شرایط مساعد، این قارچ باعث مرگ گیاهچه، سوختگی گیاهچه، پوسیدگی طوقه، پوسیدگی ساقه، پوسیدگی زغالی و پوسیدگی ریشه می‌شود (Babu et al., 2007). تنظیم زمان کاشت، رعایت تناوب زراعی، انتخاب تراکم مناسب برای کاشت و مدیریت صحیح آبیاری از جمله روش‌های مؤثر در کنترل بیماری پوسیدگی زغالی سویا به شمار می‌روند (Bowen & Schapaugh, 1989; Todd, 1993). مقاومت میزبانی نیز یک روش عملی برای مدیریت این بیماری مخرب می‌باشد. با این حال، ژنوتیپ‌های سویا با سطوح بالای مقاومت شناسایی نشده‌اند (Mengistu et al., 2007). یکی از روش‌های دیگر برای مدیریت این بیماری استفاده از مواد شیمیایی است اما به دلیل وسیع بودن پنجره زمانی حساسیت میزبان و بقاء بیمارگر بصورت ساپروفیتی در خاک برای مدت طولانی و تولید اسکروت روش کنترل شیمیایی مؤثری وجود ندارد (Mengistu et al., 2011; Wrather et al., 1998). همچنین استفاده گسترده از آفت‌کش‌های شیمیایی منجر به مشکلاتی از جمله خطرات ایمنی، آلودگی محیط زیست، کاهش تنوع زیستی و مقاومت پاتوژن‌ها شده است (Rani et al., 2021). از این رو، توسعه یک

استراتژی مؤثرتر و سازگارتر با محیط زیست به جای آفت‌کش‌های شیمیایی برای کنترل بیماری‌های گیاهی کاملاً عاقلانه است. کنترل بیولوژیکی، مانند استفاده از میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست، روشی مناسب برای محافظت از محصولات کشاورزی در برابر بیماری‌ها بدون عوارض جانبی مواد شیمیایی ارائه می‌دهد (Zhang et al., 2016).

گونه‌های *Trichoderma spp.* به عنوان عوامل کنترل زیستی بالقوه و قارچ‌های محرک رشد برای بسیاری از گیاهان زراعی در نظر گرفته می‌شوند (Savazzini et al., 2009; Verma et al., 2007). جنس *Trichoderma* شامل انواع متعددی از گونه‌های قارچی است که به سبب خاصیت آنتاگونیستی خود مورد توجه قرار گرفته‌اند. این خاصیت از طریق فعال‌سازی مکانیسم‌های گوناگونی به وقوع می‌پیوندد (Benítez et al., 2004). گونه‌های *Trichoderma* در کنترل زیستی پاتوژن‌های قارچی گیاهی نقش مهمی ایفا می‌کنند؛ این کنترل به صورت غیرمستقیم از طریق رقابت برای دسترسی به مواد غذایی و فضای رشد، که موجب تغییر در مکانیسم‌ها و آنتی‌بیوز می‌شود، یا به صورت مستقیم از طریق مکانیسم‌هایی نظیر میکوپارازیتسم حاصل می‌شود (Benítez et al., 2004). نشان داده شده است گونه‌های *Trichoderma* به عنوان قارچ‌کش‌های زیستی می‌توانند رشد بسیاری از قارچ‌های خاکزی، مانند *Fusarium solani*، *Sclerotinia sclerotiorum*، *Rhizoctonia solani* و اوومیست *Pythium ultimum* را مهار کنند (Anees et al., 2010; Erazo et al., 2021; Hewedy et al., 2020; Samuelian, 2016; Zhang et al., 2016). گونه‌های مختلف *Trichoderma*، تغییرات سلولی و مولکولی را در گیاهان القا می‌کنند که مقاومت در برابر انواع تنش‌های زیستی و غیرزیستی را افزایش می‌دهد (Brotman et al., 2013). در پژوهشی نشان داده شد که در گیاهان گوجه‌فرنگی پیش تیمار شده با *T. harzianum* تحت بیماری *R. solani* میزان فعالیت آسکوربات پراکسیداز (APX)، گایاکول پراکسیداز

گرانول و پوشش بذر از این سویه‌ها تهیه و به‌طور جداگانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. فرمولاسیون پودری بیشترین موفقیت را در کاهش بیماری نشان داد، در حالی که فرمولاسیون گرانولی تأثیر قابل توجهی بر افزایش رشد و عملکرد گیاه داشت. همچنین، بیوفرمولاسیون پوشش بذر بهترین نتایج را در بهبود جوانه‌زنی و شاخص ویگور ارائه نمود. استفاده از این بیوفرمولاسیون‌ها منجر به افزایش شاخص‌های رشد سویا نسبت به نمونه شاهد و تیمارهای شیمیایی شد. بیشترین افزایش عملکرد در شرایط حضور عامل بیماری‌زا با استفاده از بیوفرمولاسیون پوشش بذر تهیه شده از جدایه منتخب مشاهده گردید (Goharзад et al., 2019).

این پژوهش به بررسی اثر تیمار *T. harzianum* در کنترل بیماری پوسیدگی زغالی سویا می‌پردازد و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و میزان گسترش بیماری را مورد ارزیابی قرار می‌دهد.

مواد و روش

تیمار آزمایشی: پژوهش حاضر بر اساس فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در ۳ تکرار و ۲ فاکتور که فاکتور اول شامل *T. harzianum* و *M. phaseolina* و فاکتور دوم زمان‌های نمونه برداری شامل ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت پس از تلقیح بیمارگر بود، انجام شد. میزان توسعه بیماری با استفاده از نرم افزار Image J سنجش و نتایج مقایسه میانگین آنزیم‌ها و توسعه بیماری بر اساس LSD در سطح ۰/۰۱ درصد توسط نرم افزار آماری SAS 9.1 انجام گرفت. نمودارهای میزان فعالیت آنزیم‌ها و میزان توسعه بیماری با استفاده از نرم افزار Excel ترسیم گردید.

تولید گیاهچه: ابتدا بذر رقم سامان تهیه و ضدعفونی گردیدند سپس برای جوانه زنی، بذور بر روی کاغذ صافی مرطوب در پتری‌دیش‌های استریل قرار

سوپراکسید دیسموتاز (SOD) و کاتالاز (CAT) در مراحل اولیه پس از آلودگی افزایش یافت (Youssef et al., 2016). در مطالعه‌ای، پتانسیل کنترل زیستی *T. harzianum* علیه *S. sclerotiorum* در سویا بررسی شد. نتایج نشان داد که فعالیت آنزیم‌های SOD، POX و CAT و بیان ژن‌های دفاعی *PR1*، *PR2* و *PR3* در گیاهان پیش تیمار شده با *T. harzianum* افزایش پیدا کرده است (Zhang et al., 2016). در یک پژوهش، اثر بازدارندگی *T. harzianum* روی *M. phaseolina* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که *T. harzianum* باعث کاهش ۵۵/۳ درصدی در میزان پیشروی، استقرار و اسپورزایی بیمارگر و تولید میکروسکلروت را کاهش دهد. در شرایط گلخانه‌ای، استفاده از این آنتاگونیست باعث افزایش وزن خشک و تر ریشه به ترتیب ۵۷/۵ درصد و ۵۳/۶ درصد و افزایش وزن خشک و تر اندام‌های هوایی به میزان ۲۲/۹ درصد و ۱۱/۸ درصد در مقایسه با نمونه شاهد گردید. علاوه بر این، پوشش میکروسکلروتی روی سطح ریشه و ساقه در مقایسه با شاهد ۶۲/۵ درصد کاهش یافت (Vasebi et al., 2012). در تحقیقی، تأثیر دو جدایه از گونه‌های *T. harzianum* و *T. atroviride* در کنترل *M. phaseolina* و القای مقاومت گیاه سویا نسبت به این بیمارگر در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. نتایج نشان داد که در تیمارهای آلوده‌سازی خاک با بیمارگر، جدایه *T. harzianum* توانست میزان بیماری را در خاک‌های سترون و غیراسترون به ترتیب ۶۲ و ۶۵ درصد کاهش دهد. جدایه *T. atroviride* نیز بیماری را در خاک‌های مذکور به ترتیب ۵۹ و ۶۲ درصد کاهش داد. ترکیب دو جدایه باعث کاهش بیماری به میزان ۶۷ و ۷۰ درصد شد (Kia & Rahnama, 2016). مطالعه‌ای برای کنترل پوسیدگی زغالی سویا با استفاده از گونه والد *T. koningii* NAS-K1 و جدایه جهش یافته منتخب NAS-K1M25 در شرایط گلخانه‌ای انجام شد. نتایج نشان داد کاربرد این سویه‌ها باعث افزایش اثربخشی کنترل بیولوژیکی بیماری گردید. بیوفرمولاسیون‌های مختلف شامل پودر،

استفاده از دستگاه ورتکس به خوبی مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس با دور rpm ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ و فاز بالایی به عنوان عصاره جدا و به ویال جدیدی انتقال و سپس برای نگهداری به فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند (Bradford, 1976).

سنجش فعالیت آنزیم CAT: به ۲۵ میکرولیتر عصاره برگ، ۳ میلی‌لیتر بافر فسفات (۵۰ میلی مولار) حاوی H_2O_2 (۵ میلی مولار) اضافه سپس چند بار محلول را به آرامی invert کرده و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ۲۴۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد (Hugo & Lester, 1984).

اندازه‌گیری آنزیم PPO: مقدار ۱۰۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی با ۲ میلی-لیتر از بافر فسفات (۵۰ میلی مولار) و ۵۰۰ میکرولیتر کاتکول (۰/۰۵ مولار) مخلوط و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ۴۲۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت شد (Liu et al., 2005).

اندازه‌گیری آنزیم گایاکول پراکسیداز (GPX): ۲۷۰۰ میکرولیتر بافر فسفات پتاسیم ۵۰ میلی مولار با ۱۰۰ میکرولیتر H_2O_2 یک درصد و ۱۰۰ میکرولیتر گایاکول ۲ درصد با ۱۰۰ میکرولیتر عصاره مخلوط شده و تغییرات جذب آن‌ها در طول موج ۴۷۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد (Farsari & Moghaddam, 2018).

نتایج

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۱ نشان داد که اثرات تیمارها در میزان توسعه بیماری معنی‌دار بود.

گرفتند. پس از ۷۲ ساعت، بذور جوانه‌زده به گلدان‌هایی با خاک استریل منتقل و گلدان‌ها به گلخانه منتقل شدند.

تیمار گیاهچه‌ها با *T. harzianum*: قارچ *T. harzianum* در محیط PDA کشت داده و در دمای ۲۸ درجه سلسیوس انکوبه شد پس از رشد کافی با خراش دادن محیط اسپورها جمع‌آوری و در آب و توئین ۲۰ با استفاده از ورتکس مخلوط شد. سپس سوسپانسیون اسپور (5×10^5 اسپور در میلی لیتر) به دست آمده بر روی بوته‌ها (۳ هفته‌ای)، ۴۸ ساعت قبل از تلقیح بیمارگر اسپری شدند (Yadav et al., 2019).

تلقیح عامل بیماری به گیاه: گیاهان با استفاده از دیسک قارچی، یک قطعه پنج میلی متری از حاشیه‌ی پرگنه پنج روزه‌ی قارچ روی محیط کشت PDA برداشته شده و پس از ایجاد زخم روی ساقه گیاهان سه هفته‌ای سویا قرار داده شد و با پارافیلیم نگهداری گردید (Talapov et al., 2021).

نمونه‌برداری: نمونه‌گیری برای هر تیمار، هر تکرار و هر زمان از گلدان‌های مستقل و با استفاده از قیچی، از سه برگ انتهایی به ترتیب در بازه‌های زمانی ۲۴، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت بعد از تیمار انجام گرفت. نمونه برداری در بازه زمانی ساعت ۱۲-۱۰ روز انجام گرفت. نمونه‌های برگ‌ی پس از انتقال به لوله‌های فالتون به سرعت در نیتروژن مایع فرو برده و سپس به فریزر با دمای ۸۰- درجه سلسیوس منتقل شدند.

ارزیابی شدت بیماری: بعد از تلقیح، به مدت ۳۰ روز بازدیدهای مرتب انجام و علائم در روز سی‌ام بررسی و عکس برداری شد. شدت بیماری بر اساس میزان نکروز شدن بافت بود که به وسیله نرم افزار ImageJ اندازه گیری شد.

مطالعه فعالیت آنزیمی

استخراج عصاره برگ: ابتدا نمونه‌ها در ازت مایع پودر، سپس ۰/۱ گرم بافت پودر شده با ۱/۸ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مولار (pH ۶/۸) با

جدول ۱- تجزیه واریانس اثر قارچ *T. harzianum* در توسعه بیماری در گیاه سویا در پاسخ به قارچ *M. phaseolina*

Table 1. ANOVA analysis of the *T. harzianum* effect on disease development in soybean plants in against to *M. phaseolina*

Sources of variation	DF	Mean Square
Treatment	1	2.46**
Error	4	0.02

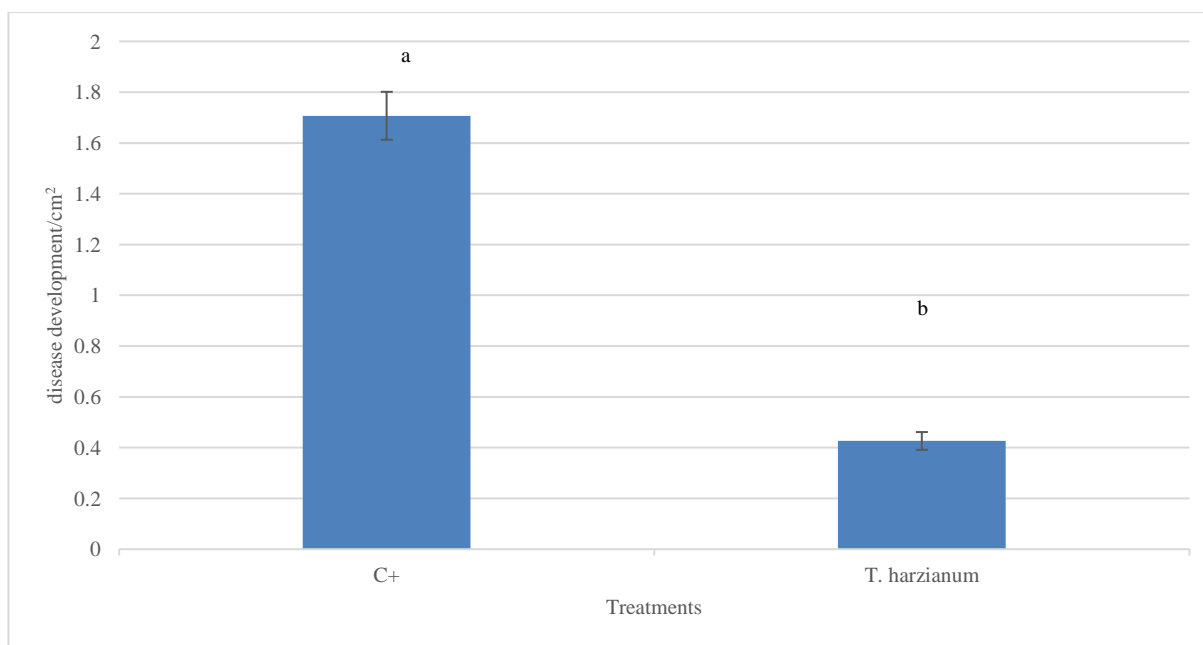
** معنی داری در سطح ۱٪

** P < 0.01

در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum*، پس از آلودگی توسط *M.*

phaseolina، توسعه بیماری نسبت به گیاهان شاهد (کنترل مثبت) حدود

۷۵ درصد کاهش یافت (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱- میزان توسعه بیماری در گیاهان شاهد و تیمار شده با *Trichoderma harzianum* پس از آلودگی با *Macrophomina phaseolina* بر

اساس آزمون LSD

Fig 1. Disease was compared between control plants treated with *Trichoderma harzianum* after being infected with *Macrophomina phaseolina* based on LSD test



شکل ۲- مقایسه شدت بیماری پوسیدگی زغالی در گیاهان شاهد و تیمار شده با *Trichoderma harzianum*

Fig 2. The severity of sheath blight disease in control and treatment by *Trichoderma harzianum* plant compared

میزان فعالیت PPO در تیمار-زمان در سطح پنج درصد معنی دار ولی در منابع

میزان فعالیت آنزیم‌های CAT، PPO و GPX

دیگر غیر معنی دار بود.

نتایج تجزیه واریانس در جدول ۲ نشان داد که میزان فعالیت آنزیم‌های

CAT و GPX در تمامی منابع تغییرات در سطح یک درصد معنی دار بوده ولی

جدول ۲- تجزیه واریانس فعالیت‌های آنزیمی دفاعی گیاه سویا در پاسخ به قارچ *M. phaseolina*

Table 2. Analysis of variance for activity of defense enzymes of soybean plant in response to *M. phaseolina*

Mean Square				Sources of variation
GPX	PPO	CAT	DF	
7.805**	0.052 ^{ns}	1.168**	1	Treatment
14.739**	0.504 ^{ns}	1.143**	3	Time
17.925**	0.702*	0.543**	3	Time×Time
0.024	0.211	0.007	14	error

ns: عدم معنی داری، *: معنی داری در سطح پنج درصد **: معنی داری در سطح یک درصد

ns: not significant, *: $P < 0.05$ and **: $P < 0.01$

CAT در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* نسبت به گیاهان شاهد پس از

فعالیت آنزیم CAT در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* تا ۴۸ ساعت

آلودگی سطح بالاتری داشته است (شکل ۳).

پس از آلودگی روند افزایشی داشته و در ساعت ۷۲ کمی کاهش یافته است،

فعالیت آنزیم PPO در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* طی ۲۴ و

اما دوباره در ساعت ۹۶ افزایش نشان داده است. در مقابل، فعالیت این آنزیم

۴۸ ساعت پس از آلودگی نسبت به گیاهان شاهد افزایش نشان داد، اما در

در گیاهان شاهد تا ساعت ۷۲ افزایش یافته و سپس در ساعت ۹۶ کاهش را

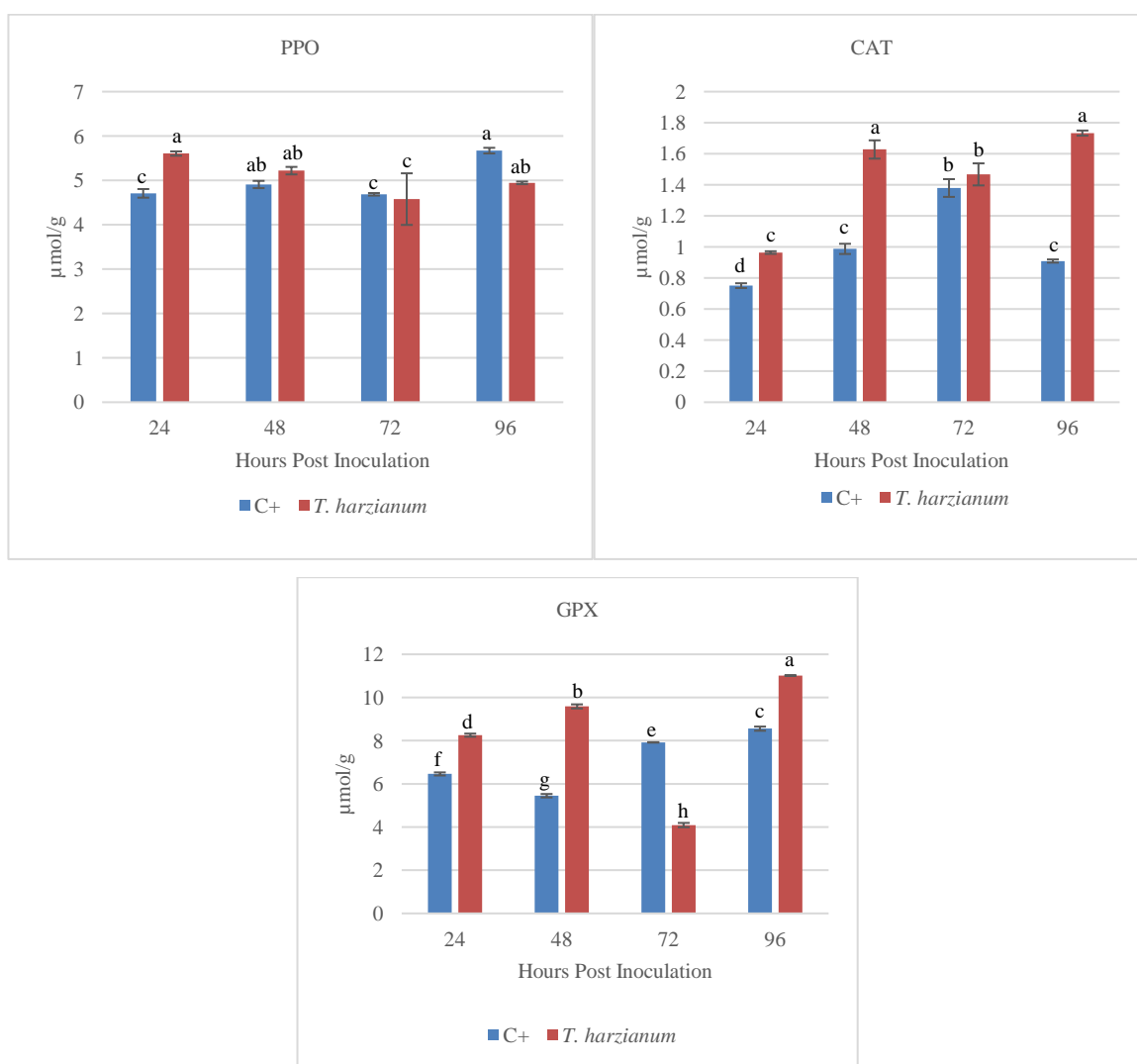
ساعات ۷۲ و ۹۶، سطح فعالیت این آنزیم در گیاهان شاهد بیشتر شد. بالاترین

تجربه کرده است. با این حال، در تمام ساعات بررسی شده، فعالیت آنزیم

بابایزاد و همکاران: بررسی تاثیر قارچ *Trichoderma harzianum* بر عامل پوسیدگی زغالی سویا...

۴۸ کاهش فعالیت داشتند، اما در ساعات ۷۲ و ۹۶ روند افزایشی پیدا کردند و بیشترین میزان فعالیت آنها نیز در ساعت ۹۶ به مقدار ۸/۵۵ ثبت شد. در مقایسه فعالیت این آنزیم میان گیاهان تیمار شده و شاهد، به جز در ساعت ۷۲، در سایر ساعات بررسی شده میزان فعالیت آنزیم در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* بالاتر از گیاهان شاهد بود (شکل ۳).

میزان فعالیت این آنزیم در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* در ساعت ۲۴ برابر با ۵/۶۰ و در گیاهان شاهد در ساعت ۹۶ برابر با ۵/۶۷ بود (شکل ۳). فعالیت آنزیم GPX در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* در ساعات ۲۴ و ۴۸ افزایش یافت، اما در ساعت ۷۲ با کاهش مواجه شد و سپس در ساعت ۹۶ مجدداً افزایش پیدا کرد، به طوری که بیشترین میزان فعالیت آنزیم در این ساعت به مقدار ۱۱/۰۱ مشاهده شد. در مقابل، گیاهان شاهد در ساعت



شکل ۳- مقایسه میانگین تغییرات سطوح فعالیت آنزیم های CAT، PPO و GPX در بازه های زمانی مختلف توسط تیمار *Trichoderma*

harzianum در مقایسه با تیمار کنترل مثبت (C+). ستون ها با حروف یکسان تفاوت معنی داری با هم ندارند.

Fig 3. Shows a comparison of the average changes in activity levels of CAT, PPO and GPX enzymes in different time periods following treatment with *Trichoderma harzianum* When compared to the C+, columns with the same letters are not significantly different.

بحث

تجمع پیدا می‌کنند. این مولکول‌ها در غلظت‌های پایین نقش سیگنال‌دهی دارند (Zhang et al., 2008)، اما افزایش بیش از حد غلظت ROS منجر به آسیب‌های اکسیداتیو، مرگ سلولی، پراکسیداسیون لیپیدها و تخریب ساختار غشای سلولی می‌شود (Mittler, 2002; Sharma et al., 2012). بنابراین سم‌زدایی سریع ROS برای جلوگیری از آسیب اکسیداتیو ضروری است. به منظور تعدیل سطح ROS ناشی از استرس زیستی، سلول‌های گیاهی یک سیستم جمع‌آوری ROS پیچیده و کارآمد ایجاد کرده‌اند که در آن سیستم آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند CAT، PPO و GPX نقش کلیدی ایفا می‌کنند (El-Beltagi et al., 2011; Li et al., 2015; Schlüter et al., 2022). مطالعه حاضر نشان داد که *T. harzianum* قادر به القای پاسخ‌های دفاعی در گیاهان سویا علیه *M. phaseolina* بودند. داده‌های حاضر افزایش قابل توجهی در فعالیت CAT، PPO و GPX در تیمار *T. harzianum* در مقایسه با گیاهان کنترل بیمار آلوده به *M. phaseolina* نشان داد.

کاتالاز یک آنزیم مهم درون‌سلولی حاوی آهن است (Johnson & Hug, 2019). این آنزیم که به خانواده اکسیدوردوکتازها تعلق دارد (Foyer & Noctor, 2016)، در حفظ تعادل هموستاز ردوکس نقش دارد (Chen, 2020). وظیفه اصلی آن حذف پراکسید هیدروژن از طریق تجزیه آن به آب و اکسیژن است که باعث محافظت از سلول‌ها می‌شود (Ighodaro & Akinloye, 2018). این آنزیم در فرایندهای مختلفی مانند زنجیره انتقال الکترون، تنفس نوری و اکسیداسیون اسیدهای چرب نیز مشارکت دارد (Wang et al., 2015). در این پژوهش مشخص شد که سطح فعالیت آنزیم CAT در تمام بازه‌های زمانی بررسی‌شده در گیاهانی که با *T. harzianum* تیمار شده بودند، به‌طور قابل توجهی بالاتر از گیاهان کنترل مثبت بود. به‌عبارت دیگر، *T. harzianum* موفق به تحریک فعالیت CAT در گیاه سویا شده است، که این امر منجر به افزایش فرایند سم‌زدایی پراکسید هیدروژن و در نتیجه محافظت سلول‌های سویا در برابر *M. phaseolina* شده است. نتایج

کنترل بیولوژیکی بهترین روش جایگزین برای کنترل بیماری‌های گیاهی است. در میان عوامل کنترل زیستی قارچی، اهمیت *Trichoderma* به دلیل توانایی بالای آن در کنترل طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زای قارچی از جمله *R. solani*, *Pythium spp.*, *Fusarium spp.*, *Botrytis cinerea* و *S. sclerotiorum* و *S. rolfsii* بسیار قابل توجه است (Sharma et al., 2012). تا به امروز، قارچ‌های جنس *Trichoderma* به‌طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته‌اند و از جمله شناخته‌شده‌ترین عوامل کنترل بیولوژیکی در حوزه کشاورزی محسوب می‌شوند (Woo et al., 2014). در این پژوهش، قابلیت کنترل زیستی *T. harzianum* در مقابله با *M. phaseolina* عامل بیماری پوسیدگی زغالی سویا، از طریق آزمایش‌های گلخانه‌ای ارزیابی شد. علاوه بر این، تأثیر *T. harzianum* بر فعالیت CAT، PPO و GPX در گیاه سویا مورد مطالعه قرار گرفت.

ارزیابی تعامل بین گیاه سویا، جدایه‌های *M. phaseolina* و *T. harzianum* نشان داد که *T. harzianum* نقش مؤثری در کاهش بیماری پوسیدگی زغالی داشت. بر اساس نتایج مشابه، تیمار *T. harzianum* در کنترل بیماری *Zymoseptoria tritici* در گندم در شرایط گلخانه‌ای موفقیت‌آمیز بوده است (Khavasi et al., 2023). همچنین مطالعات انجام‌شده در ماش در شرایط گلدانی نشان داد که این قارچ توانسته شدت بیماری *M. phaseolina* را کاهش داده و عملکرد را تا ۳۱ درصد افزایش دهد (Shahid & Khan, 2016).

تنش‌های زیستی مختلف، از جمله آلودگی‌های ناشی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی، با تحریک تولید و تجمع گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)، تنش اکسیداتیو را در سلول‌ها ایجاد می‌کنند. از میان ROS‌های مهم، O_2 و H_2O_2 بیشترین اهمیت را دارند و در واکنش به القای تنش به سرعت در سلول

فعالیت GPX را در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* نسبت به گیاهان کنترل پس از آلوده شدن به پاتوژن نشان داد که نشان‌دهنده القای سیستم دفاعی گیاه است و به وضوح تأثیر *T. harzianum* را نشان می‌دهد. افزایش فعالیت GPX در گیاهان آفتابگردان تیمار شده با تریکودرما علیه *R. solani* قبلاً توسط Singh و همکاران (۲۰۱۱) گزارش شده بود (Singh et al., 2011). نشان داده شد در گیاهان گوجه‌فرنگی پیش تیمار شده با *T. harzianum* پس از آلودگی به *R. solani* میزان فعالیت APX، GPX، SOD و CAT افزایش یافت (Youssef et al. 2016). در تحقیقی، تأثیر *T. harzianum* در کنترل *M. phaseolina* و القای مقاومت گیاه سویا نسبت به این بیمارگر در شرایط گلخانه‌ای بررسی شد. نتایج نشان داد که *T. harzianum* توانست میزان بیماری را در خاک‌های سترون و غیراسترون به ترتیب ۶۲ و ۶۵ درصد کاهش دهد (Kia & Rahnama, 2016).

این تحقیق به بهبود درک روابط متقابل و ارائه مبانی نظری مرتبط با کاربرد *T. harzianum* در کنترل زیستی *M. phaseolina* کمک می‌کند. با این حال، به دلیل پیچیدگی مکانیسم‌های پایه، مطالعات بیشتری پیرامون القای مقاومت در برابر *M. phaseolina* توسط *T. harzianum* ضروری است.

تعارض منافع

در انجام مطالعه حاضر، هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

موازین اخلاقی

در انجام این پژوهش تمامی موازین و اصول اخلاقی رعایت گردیده است.

تشکر و قدردانی

از تمامی کسانی که در طی مراحل این پژوهش یاری رساندند تشکر و قدردانی می‌گردد.

مشابهی نیز در بررسی فعالیت CAT در سویاهای پیش‌تیمار شده با *T. harzianum* در مقابله با *S. sclerotiorum* مشاهده شد (Zhang et al., 2016).

PPO به عنوان یک کاتالیزور نقش مهمی در اکسیداسیون وابسته به اکسیژن فنول‌ها به کینون‌ها ایفا می‌کند (Li & Steffens, 2002) که این فرآیند در تشکیل لیگنین و سوبرین در سلول‌های گیاهی نقش دارد (Naserinasab et al., 2012). همچنین PPO با ایجاد پیوندهای عرضی در هیدروکسی پرولین دیواره سلولی، استحکام آن را در برابر عوامل بیماری‌زا افزایش می‌دهد (Malek Ziarati et al., 2012). نشان داده شده است که بیان بیش از حد PPO در گیاهان گوجه‌فرنگی تراریخته می‌تواند منجر به افزایش مقاومت در برابر بیماری شود (Li & Steffens, 2002). در این پژوهش میزان فعالیت آنزیم PPO در ساعت ۲۴ در گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان کنترل پس از آلودگی افزایش معنی‌دار داشت که نشان می‌دهد *T. harzianum* با افزایش فعالیت پلی‌فنول‌اکسیداز باعث لیگنینی شدن دیواره مانع ورود بیمارگر و افزایش کینون فضا را برای بیمارگر سمی می‌کند که مانع گسترش بیماری می‌شود. در یک پژوهش، اثر بازدارندگی *T. harzianum* روی *M. phaseolina* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که *T. harzianum* باعث کاهش ۵۵/۳ درصدی در میزان پیشروی، استقرار و اسپورزایی بیمارگر و تولید میکروسکلروت گردید (Vasebi et al., 2012). در پژوهشی دیگر نشان داده شد که *T. harzianum* باعث افزایش فعالیت آنزیم PPO در پس از آلودگی *M. phaseolina* می‌شود (Singh & Singh, 2014).

یکی از آنزیم‌های مهم پراکسیداز، GPX محسوب می‌شود که وظایف کلیدی در فرآیندهای بیوستزی از جمله تشکیل لیگنین در دیواره سلولی، بیوستز اتیلن و القای سیستم دفاعی در برابر تنش‌های غیرزیستی و زیستی بر عهده دارد (Asada, 1999; Gill & Tuteja, 2010). نتایج ما افزایش

References

- Anees, M., Tronsmo, A., Edel-Hermann, V., Hjeljord, L. G., Héraud, C., & Steinberg, C. (2010). Characterization of field isolates of *Trichoderma* antagonistic against *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, 114(9), 691-701. [Link]
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Biology*, 50(1), 601-639. [Link]
- Babu, B. K., Saxena, A. K., Srivastava, A. K., & Arora, D. K. (2007). Identification and detection of *Macrophomina phaseolina* by using species-specific oligonucleotide primers and probe. *Mycologia*, 99(6), 797-803. [Link]
- Benítez, T., Rincón, A. M., Limón, M. C., & Codon, A. C. (2004). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, 7(4), 249-260.
- Bowen, C. R., & Schapaugh, J. W. T. (1989). Relationships among charcoal rot infection, yield, and stability estimates in soybean blends. *Crop Science*, 29(1), 42-46. [Link]
- Bradford, M. M. (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), 248-254. [Link]
- Brotman, Y., Landau, U., Cuadros-Inostroza, A., Takayuki, T., Fernie, A. R., Chet, I., Viterbo, A., & Willmitzer, L. (2013). *Trichoderma*-plant root colonization: escaping early plant defense responses and activation of the antioxidant machinery for saline stress tolerance. *PLoS Pathogens*, 9(3), e1003221. [Link]
- Chen, C. H. (2020). *Xenobiotic metabolic enzymes: bioactivation and antioxidant defense*. Cham, Switzerland: Springer. [Link]
- El-Beltagi, H. S., Mohamed, A. A., & Mekki, B. E. D. B. (2011). Differences in some constituents, enzymes activity and electrophoretic characterization of different rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars. *Annals of Oradea University, Biology Fascicle*, 18(1).
- Erazo, J. G., Palacios, S. A., Pastor, N., Giordano, F. D., Rovera, M., Reynoso, M. M., Venisse, J. S., & Torres, A. M. (2021). Biocontrol mechanisms of *Trichoderma harzianum* ITEM 3636 against peanut brown root rot caused by *Fusarium solani* RC 386. *Biological Control*, 164, 104774. [Link]
- Farsari, S., & Moghaddam, M. (2018). The interaction effect of salinity stress and superabsorbent polymer on antioxidant enzyme activities of basil. *Journal of Cell & Tissue*, 9(3), 90-106. [Link]
- Foyer, C. H., & Noctor, G. (2016). Stress-triggered redox signalling: what's in pROspect? *Plant, Cell & Environment*, 39(5), 951-964. [Link]
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930. [Link]
- Goharad, F., Tajick Ghanbary, M. A., & Shahbazi, S. (2019). Efficiency of biological fungicide prepared from mutant *Trichoderma* isolates on control of soybean charcoal rot disease. *Journal of Applied Entomology and Phytopathology*, 87(2), 209-226. [Link]
- Hewedy, O. A., Abdel Lateif, K. S., Seleiman, M. F., Shami, A., Albarakaty, F. M., & El-Meihy, R. (2020). Phylogenetic diversity of *Trichoderma* strains and their antagonistic potential against soil-borne pathogens under stress conditions. *Biology*, 9(8), 189. [Link]
- Hugo, A., & Lester, P. (1984). Catalase in vitro. *Journal Methods Enzymol*, 105, 121-126. [Link]
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287-293. [Link]
- Johnson, L. A., & Hug, L. A. (2019). Distribution of reactive oxygen species defense mechanisms across domain bacteria. *Free Radical Biology and Medicine*, 140, 93-102. [Link]
- Khavasi, H., Mirzadi Gohari, A., Fotouhifar, K., Nikkhal, M., Farzaneh, M., & Naeimi, S. (2023). Biocontrol of *Septoria tritici* blotch disease of wheat using *Trichoderma* isolates. *Journal of Applied Research in Plant Protection*, 13(3), 269-284. [Link]
- 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. [Link]
- Li, L., & Steffens, J. C. (2002). Overexpression of polyphenol oxidase in transgenic tomato plants results in enhanced bacterial disease resistance. *Planta*, 215(2), 239-247. [Link]
- Li, Y., Gu, Y., Li, J., Xu, M., Wei, Q., & Wang, Y. (2015). Biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* LJ02 induces systemic resistance against cucurbits powdery mildew. *Frontiers in Microbiology*, 6, 883. [Link]
- Liu, H., Jiang, W., Bi, Y., & Luo, Y. (2005). Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. *Postharvest Biology and Technology*, 35(3), 263-269. [Link]

- Malek Ziarati, H., Sahebani, N., & Etebarian, H. R. (2012). Biological Control and Systemic Induction of Peroxidase and Polyphenoloxidase by *Trichoderma harzianum* in Tomato Plants Infected with Nematode *Meloidogyne javanica*. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 1(1), 61-72. [Link]
- Mengistu, A., Ray, J. D., Smith, J. R., & Paris, R. L. (2007). Charcoal rot disease assessment of soybean genotypes using a colony-forming unit index. *Crop Science*, 47(6), 2453-2461. [Link]
- Mengistu, A., Smith, J. R., Ray, J. D., & Bellaloui, N. (2011). Seasonal progress of charcoal rot and its impact on soybean productivity. *Plant Disease*, 95(9), 1159-1166. [Link]
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410. [Link]
- Naserinasab, F., Sahebani, N., & Etebarian, H. R. (2012). Study of the combined effect of salicylic acid and the fungus *Trichoderma harzianum* BI on the resistance of tomato plants against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Plant Protection*, 25(4), 417-425.
- Purkayastha, S., Kaur, B., Dilbaghi, N., & Chaudhury, A. (2006). Characterization of *Macrophomina phaseolina*, the charcoal rot pathogen of cluster bean, using conventional techniques and PCR-based molecular markers. *Plant Pathology*, 55(1), 106-116. [Link]
- Rani, L., Thapa, K., Kanojia, N., Sharma, N., Singh, S., Grewal, A. S., Srivastav, A. L., & Kaushal, J. (2021). An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, 283, 124657. [Link]
- Rayatpanah, S., Nanagulyan, S. G., Alav, S. V., Razavi, M., & Ghanbari-Malidarreh, A. (2012). Pathogenic and genetic diversity among Iranian isolates of *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Phytopathology*, 160(1), 1-8. [Link]
- Samuelian, S. (2016). Potential of *Trichoderma harzianum* for control of banana leaf fungal pathogens when applied with a food source and an organic adjuvant. *3 Biotech*, 6(1), 8. [Link]
- Savazzini, F., Longa, C. M. O., & Pertot, I. (2009). Impact of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 on soil microbial communities of a vineyard in northern Italy. *Soil Biology and Biochemistry*, 41(7), 1457-1465. [Link]
- Schlüter, U., Bouvier, J. W., Guerreiro, R., Malisic, M., Kontny, C., Westhoff, P., Stich, B., & Weber, A. P. (2022). Brassicaceae display diverse photorespiratory carbon recapturing mechanisms. *bioRxiv*, 2022-2012. [Link]
- Shahid, S., & Khan, M. R. (2016). Biological control of root-rot on mungbean plants incited by *Macrophomina phaseolina* through microbial antagonists. *Plant Pathology Journal*, 15(2), 27. [Link]
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., & Pesarakli, M. (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 217037. [Link]
- Singh, B. N., Singh, A., Singh, S. P., & Singh, H. B. (2011). *Trichoderma harzianum*-mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. *European Journal of Plant Pathology*, 131(1), 121-134. [Link]
- Singh, N., Pandey, P., Dubey, R. C., & Maheshwari, D. K. (2008). Biological control of root rot fungus *Macrophomina phaseolina* and growth enhancement of *Pinus roxburghii* (Sarg.) by rhizosphere competent *Bacillus subtilis* BN1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(9), 1669-1679. [Link]
- Singh, S. P., & Singh, H. B. (2014). Effect of mixture of *Trichoderma* isolates on biochemical parameters in leaf of *Macrophomina phaseolina* infected brinjal. *Journal of Environmental Biology*, 35(5), 871.
- Su, G., Suh, S. O., Schneider, R. W., & Russin, J. S. (2001). Host specialization in the charcoal rot fungus, *Macrophomina phaseolina*. *Phytopathology*, 91(2), 120-126. [Link]
- Talapov, T., Yuceer, S., Dedecan, O., Demirel, O., & Can, C. (2021). Comparison of *Macrophomina phaseolina* inoculation techniques for screening sunflower and soybean germplasm in a controlled environment. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 43(6), 859-870. [Link]
- Todd, T. C. (1993). Soybean planting date and maturity effects on *Heterodera glycines* and *Macrophomina phaseolina* in southeastern Kansas. *Journal of Nematology*, 25(4S), 731.
- Vasebi, Y., Alizadeh, A., & Safaie, N. (2012). Biological Control of Soybean Charcoal Rot Caused by *Macrophomina Phaseolina* Using *Trichoderma harzianum*. *Journal of Agricultural Science and Sustainable Production*, 22(1), 41-54. [Link]
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Sahai, V., Prévost, D., Valéro, J. R., & Surampalli, R. Y. (2007). Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6-7), 764-771. [Link]
- Wang, X., Li, S., Liu, Y., & Ma, C. (2015). Redox regulated peroxisome homeostasis. *Redox Biology*, 4, 104-108. [Link]
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G., & Lorito, M. (2014). *Trichoderma*-based products and their widespread use in agriculture. *Open Mycology Journal*, 8(1), 71-126. [Link]
- Wrather, J. A., Kendig, S. R., & Tyler, D. D. (1998). Tillage effects on *Macrophomina phaseolina* population density and soybean yield. *Plant Disease*, 82(2), 247-250. [Link]

- Yadav, A. K., Kumari, A., & Anwar, A. (2019). Management of sheath blight of rice (*Oryza sativa*) under in-vitro condition with indigenous *Trichoderma* spp. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8(6), 1763-1771.
- Youssef, S. A., Tartoura, K. A., & Abdelraouf, G. A. (2016). Evaluation of *Trichoderma harzianum* and *Serratia proteamaculans* effect on disease suppression, stimulation of ROS-scavenging enzymes and improving tomato growth infected by *Rhizoctonia solani*. *Biological Control*, 100, 79-86. [[Link](#)]
- Zhang, F., Ge, H., Zhang, F., Guo, N., Wang, Y., Chen, L., Ji, X., & Li, C. (2016). Biocontrol potential of *Trichoderma harzianum* isolate T-aloe against *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean. *Plant Physiology and Biochemistry*, 100, 64-74. [[Link](#)]
- Zhang, X., Wollenweber, B., Jiang, D., Liu, F., & Zhao, J. (2008). Water deficits and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing ABP9, a bZIP transcription factor. *Journal of Experimental Botany*, 59(4), 839-848. [[Link](#)]