مجموعه مقالات
چهارمین همایش ملی کاربرد فناوری هسته‌ای در علوم کشاورزی و منابع طبیعی
(۲۹-۳۰ اردیبهشت، ۱۳۹٤، پژوهشکده کشاورزی هسته ای)
The 4th National Congress on Nuclear Technology Application in Agricultural & Natural Resource Sciences (19-20 May, 2015, Nuclear Agriculture Research School)

بررسی جهش های ناشی از پرتوتابی با اشعه گاما در ژن های کیتیناز و گلوکاناز *Trichoderma viride* با استفاده از نشانگر اختصاصی STS

رضا مرادی[۱]، سمیرا شهبازی*[۲]،حسین اهری مصطفوی[۲]، هادی فتح اللهی[۲]،حامد عسکری[۲]
۱. گروه بیوتکنولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه پیام نور کرج، ۲. گروه گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی، پژوهشکده کشاورزی هسته ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته ای، * مسئول مکاتبات: sshahbazi@nrcam.org

چکیده: تاثیر جهش زایی ناشی از دز ۲۵۰ گری اشعه گاما (در مرکز تحقیقات کشاورزی و پزشکی هسته‌ای- سازمان انرژی اتمی) بر کنیدیوم های قارچ *Trichoderma viride*بر فعالیت آنزیم های کیتیناز و گلوکاناز با نشانگر مولکولی STS در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت. در بین ۱۴ جدایه جهش یافته که بر اساس افزایش پتانسیل آنتاگونیستی آنها در کنترل *Rhizoctonia solani* انتخاب شده بودند، در اثر تکثیر ژن های کد کننده آنزیم های کیتیناز و گلوکاناز با آغازگرهای داخلی هر یک از آنها، در محدوده ۵۰۰ تا ۷۰۰ جفت باز تفاوت الگوی باندی بین جدایه های جهش یافته و شاهد مشاهده شد. آزمون کشت متقابل نشان داد که در بیش از ۹۳٪ جدایه های جهش یافته حاصل از پرتوتابی قدرت انتاگونیستی علیه *R. solani* در مقایسه با ایزوله والد افزایش یافته است که ممکن است ناشی از افزایش بیان آنزیم های تجزیه کننده دیواره سلولی قارچی باشد. داده های حاصل از بررسی با نشانگر مولکولی STS نیز نشان داد که موتاسیون القا شده در تعداد قابل توجهی از آنها ناشی از جهش در یکی از ژن های کد کننده آنزیم های کیتیناز و گلوکاناز بوده است. بر اساس نتایج این بررسی القای جهش با استفاده از پرتو گاما می تواند تکنیک موفق در ارتقای پتانسیل آنتاگونیستی تریکودرما باشد.

کلمات کلیدی : اشعه گاما، کنترل بیولوژیک، کیتیناز و گلوکاناز، *Trichoderma viride*، مارکر STS.

Investigation of mutation in Chitinase and Glucanase genes in gamma Radiated mutants of *Trichoderma viride* by STS marker

R. Moradi [1], S. Shahbazi*[2], H. Ahari Mostafavi[2], H. Askari[2], H. Fathollahi[2]
1. Biotechnology Department, Faculty of Agriculture, Payam e Noor University, P. O. Box 31578-36899, Tehran, Iran, 2 Plant Protection Department, Nuclear Agriculture Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute (NSTRI), Atomic Energy Organization of Iran (AEOI), Alborz, Iran. Corresponding author: sshahbazi@nrcam.org

Abstract: Effects of induced mutation via gamma irradiated with 250 Gry dose (in Nuclear Agriculture Research School-Nuclear Science and Technology Research Institute).on *Trichoderma viride* conidia on chitinase and glucanase activity by STS molecular marker have been evaluated in this study. Among 14 irradiated mutants which selected via improved antagonistic capability against *Rhizoctonia solani*, pcr amplified chitinase and glucanase mutated genes with their nested primers produced different sizes of amplified regions between 500- 700 bp, which showed polymorphism in compare with control (un-irradiated) isolate. Dual culture test showed that, more than 93% of mutated isolates have statistically more antagonistic capability against *R.solani* than its parent isolate maybe resulted of enhancement in fungal cell wall degrading enzymes production. STS analysis data proved that in considerable mutants induced mutation placed in chitinase and glucanase genes.According to these results, bio-control capability of *Trichoderma* could be improved through gamma radiation.

Keywords: Gamma radiation, Biological control, chitinase, glucanase, *Trichoderma viride*, STS marker.

مقدمه

امروزه مشکلات فراوانی از کاربرد وسیع سموم شیمیایی در کشاورزی بروز کرده است. باقیمانده سموم در محصولات کشاورزی و فرآورده های آنها از یک سو و آلودگی های زیست محیطی منجر به افزایش بروز بیماری های مختلف از جمله انواع سرطان ها در انسان شده است [۱]. گونه های قارچ تریکودرما از جمله عوامل امید بخشی هستند که علیه دامنه وسیعی از پاتوژن های گیاهی فعالیت می کنند و این توانایی، امکان استفاده از تریکودرما را در گسترش راهبردهای کنترل بیولوژیک فراهم می کند. جنس تریکودرما *Trichoderma spp* مرحله غیرجنسی آسکومیست های جنس *Hypocrea spp*. می‌باشند که به عنوان عامل کنترل بیولوژیک بر علیه دامنه بسیار وسیعی از سایر ارگانیسم های بیمارگر مانند قارچ ها(اعم از هوازاد و خاکزاد)، باکتری ها، پروتوزوآها، نماتدها و حتی ویروس‌ها شناخته می‌شود[۲]. قدرت زنده مانی مناسب و بالای تریکودرما به دلیل طبیعت خاکزاد آن و قدرت رقابت بالایی که در شرایط خاک با سایر ارگانیسم ها دارد و آسانی کاربرد تریکودرما در خاک از مزیت های دیگری است که باعث شده است در بین عوامل کنترل بیولوژیک توجه ویژه ای به قارچ *T.harzianum* معطوف گردد[۳].دیواره سلولی قارچی نخستین سدی است که در برابر آنزیم های هیدرولازی (کیتیناز ، گلوکاناز) عامل کنترل بیولوژیک مقاومت می کند و دوجزء عمده این دیواره کیتین و گلوکان می باشد. لذا به نظر می رسد با ارتقای فعالیت دو آنزیم کیتیناز و گلوکاناز می توان به افزایش پتانسیل مایکوپارازیتی تریکودرما کمک نمود و جدایه هایی با قابلیت رقابت مناسب با سموم مرسوم کشاورزی ارائه کرد. پرتو گاما به طور تصادفی و پراکنده مکان های مختلفی از ژنوم قارچ را هدف قرار می دهد که موجب تغییر ساختمان شیمیایی مولکول های ماده وراثتی ان می شود و نتیجه آن گاهی شکستن کروموزوم و گاهی جهش ژن دراثر تغییر ترادف بازهای آلی آن و یا ترتیب مجدد این بازهای آلی است [۴]. استفاده از جدایه های اصلاح شده با جهش بدلیل استقرار آسان تر تریکودرما در کاربردهای مزرعه ای و محفوظ بودن از عوامل نامساعد محیطی نسبت به جدایه های تولید شده با روش های دیگر از قبیل امتزاج پروتوپلاسمی و یا تراریخت در اولویت قرار دارد[۵]. سابقه مطالعاتی نشان می دهد ایجاد جهش با استفاده از پرتو گاما می تواند در افزایش پتانسیل آنتاگونیستی و دست یابی به منابع ژنتیکی جدید از عوامل بیوکنترل موثر و کارا کمک کند[۶]. در گونه *T.virens* ایجاد موتاسیون با استفاده از اشعه

گاما به افزایش قدرت رشد و رقابت و اسپورزایی قارچ همزمان با افزایش بیان ژن های مرتبط با افزایش مقاومت به *Rhizoctonia solani* همراه بوده است [۷]. کارایی جدایه های جهش یافته *T.harzianum* با استفاده از اشعه گاما نیز در کنترل *Sclerotium cepivorum* , *S. rolfsii* افزایش چشمگیری یافته است [۸ و۹]. دراین مطالعه برآن هستیم تا با استفاده از نشانگر اختصاصی STS[۱] ، ارتباط بین وقوع احتمالی جهش در ژن های کیتیناز[۲] و گلوکاناز[۳] و افزایش تولید متابولیت های آنزیمی موثر در مایکوپارازیتیسم[۴] درقارچ تریکودرمای جهش یافته دراثر کاربرد پرتو گاما را بررسی کنیم. لازم به ذکر است معیار ما برای انتخاب جدایه های جهش یافته پس از پرتوتابی قدرت انتاگونیستی در برابر قارچ *Rhizoctonia solani* بوده است که مطالعات بعدی با استفاده از اغازگرهای اختصاصی طراحی شده بر اساس توالی ژن ها کیتیناز و گلوکاناز تریکودرما بر جدایه های جهش یافته منتخب انجام شده است.

مواد و روش ها

نمونه برداری، جداسازی و شناسایی قارچ های مورد مطالعه

برای جداسازی قارچ تریکودرما از خاک ناحیه ریزوسفر گیاهان چغندرقندی که بدون استفاده از سموم شیمیایی در مقایسه با سایر گیاهان شدت بیماری کمتری در آنها مشاهده شده بود نمونه برداری انجام و سوسپانسیون این نمونه های خاک را برروی محیط کشت PDA انتقال داده شدند. کلنی های حاصل را بعد از تهیه کشت تک اسپور (به منظور خالص سازی) با استفاده از کلید شناسایی قارچ های ناقص و براساس خصوصیات مورفولوژیکی فیالید ها و فیالوسپورها و انتوژنز کنیدیوم‌ها مورد شناسایی قرار گرفتند. نمونه برداری از قارچ بیمارگر بطور تصادفی از مزارع چغندرقند آلوده با علائم پوسیدگی طوقه و ریشه، مرگ گیاهچه، ضعف و زردی عمومی، جمع آوری شدند. جداسازی به روش طعمه گذاری [۱۰] انجام و تعیین

[۱] Sequence tagged site

[۲] Chitinase

[۳] Glucanase

[٤] Mychoparasitism

گروه آناستاموزی کلنی های قارچ پس از شناسایی گونه توسط موسسه تحقیقات چغندر قند کشور انجام شد.

آزمون دزیابی به منظور القای موتاسیون در قارچ تریکودرما

بعد از شناسایی و خالص سازی جدایه ها بروی محیط PDA، از کشت‌های هفت روزه، سوسپانسیون اسپور تهیه و شمارش اسپور با استفاده از لام همی سایتومتر انجام شد. تعداد ۷۰۰ اسپور در معرض تابش اشعه گاما با هفت دامنه دز ۰، ۵۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰، ۳۰۰، ۳۵۰، ۴۰۰، ۴۵۰ ۲۵۰۰ گری (هریک سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی) با استفاده از دستگاه گاماسل با چشمه کبالت ۶۰ – اکتیویته ۲۵۰۰ کوری و نرخ دز ۰/۲۳ گری در ثانیه مستقر در سازمان انرژی اتمی ایران قرارگرفت. سپس اسپور های پرتو دیده برای کشت و محاسبه درصد زنده مانی و رشد ریسه بر روی محیط PDA کشت و در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

بررسی قدرت آنتاگونیستی جدایه های جهش یافته تریکودرما

برای انتخاب از بین ۹۶ جدایه جهش یافته حاصل از معیار قدرت آنتاگونیستی جدایه جهش یافته و شاهد (جدایه مادری) در کشت متقابل (کشت تک کلنی هر یک از جدایه های تریکودرمای جهش یافته با تک کلنی قارچ بیمارگر *R.solani*) استفاده گردید. از آنجایی که این بیمارگر فاقد اسپور می باشد نتایج حاصله می تواند معیار قابل قبولی از قدرت آنتاگونیستی هر یک از جدایه ها را مشخص نماید و احتمال بروز آلودگی و تداخل کشت های دو قارچ به حداقل ممکن خواهد رسید. سرعت رشد کلنی قارچ بیمارگر در سه روز متوالی پس از کشت (۲۴، ۴۸، ۷۲ ساعت) اندازه گیری و در فرمول زیر قرار داده شد و بر این اساس درصد ممانعت کنندگی هریک از جدایه های جهش یافته و شاهد محاسبه گردید. کلیه آنالیزهای آماری در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS 11.3 انجام شد.

$$IG = (C - T) / T * 100$$

IG : درصد بازدارندگی رشد میسیلیومی قارچ بیماریزا

C: قطر کلنی قارچی بیمارگر در بدون کشت متقابل با تریکودرما

T: قطر کلنی قارچی بیمارگر در کشت متقابل با تریکودرما

بررسی ژن های کد کننده آنزیم کیتیناز و گلوکاناز با نشانگر مولکولی STS

جفت آغازگرهای داخلی هر ژن بر اساس ناحیه فعال آن با نرم افزار MEGA version 4 بر اساس توالی این ژنها با شماره دسترسی AF395757 (گلوکاناز) و GU187942 (کیتیناز) موجود در بانک اطلاعات ژنومی NCBI طراحی و توسط شرکت BIONEER (فرانسه) ساخته شدند(جدول۱). با استفاده از نرم افزار NT Sys version 11. 1 از نظر عدم وجود پرایمر دایمر و عدم تشابه با توالی سایر موجودات مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول۱. فهرست آغازگرهای مورد استفاده برای نشانگر STS

نام آغازگر	توالی آغازگر
Chit1-Fw	5´-CCTTCATTGACTGCTCTTGCG-3´
Chit1-Rv	5´-CCTCAAAGCATTGACAACCG-3´
Glu1-Fw	5´-ATTCAACCGCAAGCGTACGC-3´
Glu1-Rv	5´-GCCGACGGAAGGTATAAGAAT-3´

پس از استخراج DNA ژنومی قارچ تریکودرما [۱۱] ژن های کیتیناز و گلوکاناز با انجام واکنش PCR بر روی 50 ng از DNA ژنومی به عنوان رشته الگو و جفت آغازگرهای مرتبط (جدول ۱) و 1 unit از آنزیم Expand DNA polymerase (Roche, Manheim, Germany) تکثیر گردید. تکثیر با استفاده از دستگاه PCR (MJ Mini BIO RAD) و با برنامه حرارتی به صورت یک چرخه واسررشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و ۳۵ چرخه، شامل مراحل واسررشته سازی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۵۶/۴ (کیتیناز) و ۵۵/۴ (گلوکاناز) درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و بسط نهایی در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه و در خاتمه یک چرخه بسط نهایی در دمای ۷۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. برای مشاهده نتایج، فرآورده های PCR از ژل های آگارزی ۱/۵ درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

جداسازی و شناسایی قارچ های مورد مطالعه

بر اساس نتایج بدست آمده جدایه های قارچ جدا شده از خاک اطراف ریشه پس از خالص سازی، براساس خصوصیات مورفولوژیکی فیالید ها و فیالوسپورها و انتوژنز کنیدیوم‌ها به گونه *T. viride* متعلق بودند. قارچ بیمارگر جمع آوری شده ازمزارع چغندرقند آلوده با علائم پوسیدگی ریشه و طوقه نیز به گونه *R.solani* تعلق داشتند. بر اساس آزمون هم دهانی ریسه جدایه های مذکور با جدایه های استاندارد بین المللی موجود در آزمایشگاه بیماری شناسی موسسه تحقیقات چغندر قند کشور، جدایه های *R.solani* جدا شده در این تحقیق همگی در گروه آناستاموزی ۴ (AG-4) قرار دارند.

القای موتاسیون در قارچ تریکودرما با استفاده از اشعه گاما

مقایسه درصد جوانه زنی اسپور بعد از گذشت ۲۴ ساعت از پرتوتابی با دزهای مختلف، تیمارها را در چند گروه مختلف قرار داد. بر این اساس تاثیر پرتوتابی با اشعه گاما در محدوده دز ۲۵۰ گری هیچگونه ممانعتی برای رشد ریسه نداشته و نیز۴۳/۴٪ اسپورهای قارچی نیز توانایی جوانه زنی خود را حفظ نموده اند. از آنجایی که معیار دز جذبی مناسب برای القای موتاسیون غیر کشنده در ارگانیسم ها، ظهور تقریباً ۴۰-۵۰٪ جوانه زنی اسپور بعد از پرتوتابی می‌باشد [۱۲]، دز اپتیمم القای موتاسیون انتخاب و جدایه های جهش یافته با این دز تهیه گردید (جدول۱).

جدول۱. تاثیر اشعه گاما بر جوانه زنی اسپور قارچ *T. viride* بر روی محیط کشت PDA بعد از ۲۴ ساعت

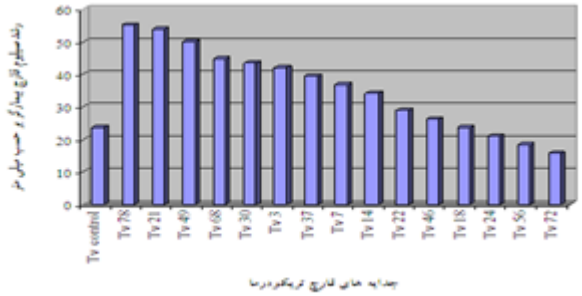
پرتوتابی با اشعه گاما (گری)								
۰	۵۰	۱۵۰	۲۰۰	۲۵۰	۳۰۰	۳۵۰	٤۰۰	٤۵۰
۸٤/۵	۸۱/۱	۷۳/۹	۵۹/۷	٤۳/٤	۱۵/۵	۱۱/۹	۹/۷	۰
(A)	(B)	(C)	(D)	(E)	(F)	(G)	(G)	(H)

*: در هر ردیف، میانگین های با حروف مشترک در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی داری ندارند.

نتایج بررسی پتانسیل آنتاگونیستی جدایه های جهش یافته تریکودرما علیه بیمارگر *R. solani*

در این تحقیق در حدود ۳/۵۷٪ جدایه واجد جهش های نامطلوب بودند و بیش از ۹۶/۴۲٪ جدایه های جهش یافته حاصل پتانسیل آنتاگونیستی بالاتری نسبت به جدایه شاهد (مادری) داشته اند که نشان می دهد تعداد قابل توجهی از جهش های تصادفی حاصل از پرتو تابی با اشعه گاما مطلوب بوده اند(شکل ۱). با

توجه به تصادفی بودن وقوع جهش دراثر کاربرد پرتو گاما مشاهده بروز این درصد از جهش های نامطلوب دور از انتظار نمی باشد. در مطالعات قبلی نیز گزارش شده است که پرتوتابی با اشعه گاما در افزایش کنترل بیولوژیکی همزمان *S. rolfsii* و *Rhizoctonia solani* توسط گونه های *T. viride* موثر بوده است[۱۳] و در گونه *T.virens* ایجاد موتاسیون با استفاده از اشعه گاما به افزایش قدرت رشد و رقابت و اسپورزایی قارچ همزمان با افزایش بیان ژن های مرتبط با افزایش مقاومت به *Rhizoctonia solani* همراه بوده است [۱۴]. بر اساس نتایج این بخش ۱۴ جدایه جهش یافته از بین ۲۵۰ کلنی برای بررسی جهش با استفاده از نشانگر اختصاصی STS انتخاب شدند.



شکل ۱. نتایج آزمون آنتاگونیستی T. viride علیه R.Solani

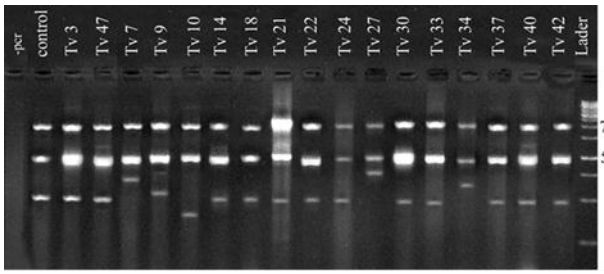
تکثیر ژن های کد کننده آنزیم کیتیناز و گلوکاناز در جدایه های جهش یافته با نشانگر اختصاصی STS

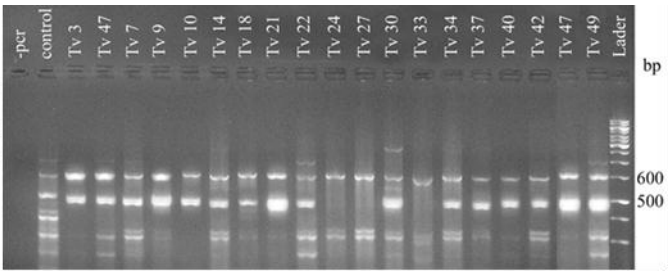
پس از تکثیر قطعه های ۷۰۰ و ۵۰۰ bp با استفاده از آغازگرهای Chit1-Fw و Chit1-Rv از جدایه های جهش یافته *T.viride* تفاوت الگوی باندی مشاهده شد و در بسیاری از جدایه های جهش یافته (Tv49, Tv46,Tv80,Tv78, Tv68, Tv66, Tv65,Tv61, Tv60, Tv52) افزایش پتانسیل آنتاگونیستی باعث افزایش بیان ژن کیتیناز شده است که نشان می دهد موتاسیون مطلوب بوده است. در بعضی جدایه ها(Tv55,Tv56.Tv72,Tv85) با کاهش پتانسیل آنتاگونیستی بیان ژن کیتیناز کاهش یافته و شکست های احتمالی ناشی از کاربرد پرتو گاما تاثیری بر شدت بیان ژن کیتیناز نداشته است. همچنین در بعضی از جدایه ها (Tv46,Tv65) افزایش پتانسیل آنتاگونیستی با افزایش بیان ژن کیتیناز مرتبط نبوده و به سایر مکانیسم های بیوکنترل مربوط بوده است.(شکل ۲) در جدایه هایی که افزایش بیان و فعالیت کیتینازی موجب تقویت قدرت آنتاگونیستی این جدایه ها شده توالی ژن کیتیناز به منظور تعیین جهش های احتمالی و کاربردهای بعدی آن در دست ورزی جدایه های بومی و ارتقای پتانسیل آنتاگونیستی آنها موثر به نظر می رسد.

با استفاده از آغازگرهایGlu1-Fw و Glu1-Rv دو قطعه به طول ۵۰۰ و ۶۰۰bp تکثیرشد. تفاوت الگوی باند در جدایه های جهش یافته مشاهده شد و در برخی از آنها از جمله (Tv52,Tv60,Tv61,Tv65,Tv66,Tv68,Tv78,Tv85,Tv46

افزایش پتانسیل آنتاگونیستی باعث افزایش بیان ژن گلوکاناز شده است که نشان می دهد موتاسیون مطلوب بوده است. در بعضی جدایه ها(Tv55,Tv56,Tv72) با کاهش پتانسیل آنتاگونیستی بیان ژن گلوکاناز کاهش

یافته و شکست های احتمالی ناشی از کاربرد پرتو گاما تاثیری بر شدت بیان ژن گلوکاناز نداشته است. در بعضی جدایه ها(Tv80) افزایش پتانسیل آنتاگونیستی با افزایش بیان ژن گلوکاناز مرتبط نبوده است. (شکل۳). بر این اساس می توان برخی از تغییرات در قدرت انتاگونیستی را به بروز جهش در ژن گلوکاناز این جدایه ها نسبت داد. لازم به ذکر است دست یابی به جهش های نقطه ای که در توالی ژن و یا پروموتر آن منجر به افزایش بیان و فعالیت آنزیم شود اطلاعات بسیار مفیدی به منظور افزایش پتانسیل آنتاگونیستی تریکودرما از طریق دستکاری توالی ژن های کیتیناز و گلوکاناز در اختیار پژوهشگران قرار خواهد داد. سایر باند های حاصله با وزن های کمتر احتمالا توالی های این ژن که دراثر جهش ناشی از پرتو گاما دچار شکستگی شده اند، می باشند. اندازه گیری فعالیت آنزیمی در این جدایه ها و مطالعات پروتئومیکسی آن ها گام بعدی این پژوهش خواهد بود.





شکل۲. فرآورده های Glu1-Rv و Glu1-Fwبا آغازگرهای PCR

شکل۳. فرآورده های Chit1-Fw و Chit1-Rvبا آغازگرهای PCR

تشکر و قدردانی: این تحقیق با استفاده از منابع طرح" کنترل بیماری های خاکزاد گیاهی با استفاده از فناوری های هسته ای و مولکولی" در گروه پژوهشی گیاهپزشکی و نگهداری مواد غذایی- پژوهشکده کشاورزی هسته ای -سازمان انرژی اتمی که در انجام شده است.

منابع

1. **Moradi, R., Shahbazi, S., Mostafavi, H., Mirmajlesi, M., Ebrahimi, M. A., 2011.** " Appointment suitable Irradiation in suggestion desired mutation and evaluation of morphological effect in Trichoderma " the first congress of agricaltural science and technology. The university of zangan. P.27.

2. **Howell, C.R.**, **2009**. "Mechanisms Employed by Trichoderma Species in the Biological control of plant Diseases: the history and Evolution of current Concepts" USD/ARS southern plains Agricultural Research center.

3. **Chet, I., Harman, G. E., and Baker, R., 2005**. "Trichoderma hamatum: Its hyphal interactions with Rhizoctonia solani and Pythium spp" Microbial Echology, Vol. 7, No 1, 29-38.

4. **Hallajian, M., 2009.**" Application molcular method in agricalture" the second national congress application nuclear technical in agricalture. Nuclear science and technology research Institue of karaj. P.105-113.

5. **Horenby, D., 1998.** " control of human plant disease" translated of Alavi, A., Ahomanesh, A., Education advancement agricalture research institue of tehran. P. 826.

6. **Howell, C. R., 1998**." The role of antibiosis in bicontrol. In Harman, G. E. and Kubicek, C. P. (eds.). Trichoderma and Gliocladium" Taylor and Francis, Londan, 173-184.

7. **Mukherjee, M., Hadar, R., Mulherjee, P. K., , Horwitz, B. A. 2003.** "Homologus expression of a mutated beta-tubulin gene dose not confers benomyl resistance on Trichoderma harzianum" J. Applied Microbiol, 95, 861-867.

8. **Coventry, E., Noble, R., Mead, A., Marin, F. R., Perez, J. A., Whips, J. M., 2006.** " Allium White Rot Suppression with Composts and Trichoderma viride in Relation to Sclerotia Viability" J. of Biological Control, Vol. 96, No. 9, 1009-1021.

9. **Haggag, W. M., 2002.** "Induction of hyperproducing chitinase Trichoderma mutants for efficient biocontrol of Botrytis cinerea on tomato and cucumber plants growing in plastic houses" Arab J. Biotech, Vol. 5, No. 2, 151-164 .

10.**Sneh, B., Zeidan, M., Ichielevich- Austet, M., Barash, I., and Koltin, Y. 1986.** Increased growth responses induced by a non pathogenetic isolate of Rhizoctonia solani. Can. J. Bot. Vol. 64: 2372-2378.

11.**Safaei, N., Alizade, A., Adam, G., 2006.** Distiction molcular and evaluation Genetic variety iranian population Fusarium germinearum. Plant disease. 41: 171-189.

12. **Mostafavi, H., 2009**. Application nuclear technology in management parasits and plant disease" the second congress national application nuclear technology in agricalture. Nuclear science and technology research institue of karaj. P. 331-335.

13. **Sneh, B., Zeidan, M., Ichielevich- Austet, M., Barash, I., and Koltin, Y. 1986.** Increased growth responses induced by a non pathogenetic isolate of Rhizoctonia solani. Can. J. Bot. Vol. 64: 2372-2378.

14.**Haggag, W.M., Abdel-Latif, H., Mohamed, A. 2007.** "Biotechnological Aspects of Microorganisms Used in Plant Biological Control" American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture 1, 7-12.