پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی/ جلد ۷ شماره ۱/ سال ۱۳۹۷

بررسی اثر آنتاگونیستی جدایه‌های درون‌زی و تجاری تریکودرما روی قارچ *Phaeoacremonium minimum*، عامل بیماری نوار برگی انگور

ابوالفضل نرمانی[۱]، مهدی ارزنلو[۲*] و اسداله بابای اهری[۲]

۱-دانشجوی دوره دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
۲- به ترتیب استادان بیماری‌شناسی و قارچ شناسی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز.
*مسئول مکاتبه: arzanlou@tabrizu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۱/۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۷

چکیده

بیماری نوار برگی انگور که قبلا تحت عنوان بیماری مرکب اسکا شناخته می‌شد، یکی از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های تنه‌ی انگور به شمار می‌رود. قارچ *Phaeoacremonium minimum* به عنوان یکی از عوامل اصلی دخیل در این بیماری شناخته شده است. کنترل بیماری نوار برگی انگور با استفاده از ترکیبات شیمیایی مشکل بوده و در عین حال استفاده از عوامل کنترل زیستی در مدیریت این بیماری نسبتا موثر شناخته شده است. در تحقیق حاضر، پتانسیل بازدارندگی سه گونه *Trichoderma* شامل *T. harzianum* (جدایه تجاری T22)، *T. longibrachiatum* و *T. brevicompactum* (جدایه‌های درون‌زی) روی چهار جدایه *Pm. minimum* با دو تیپ آمیزشی متفاوت با استفاده از روش‌های کشت متقابل، تاثیر متابولیت‌های فرار و متابولیت‌های غیر فرار ارزیابی گردید. نتایج به دست آمده از این مطالعه، نشان داد که تمامی جدایه‌های آنتاگونیست در مقایسه با شاهد تاثیر معنی داری بر رشد شعاعی *Pm. minimum* دارند. در روش کشت متقابل، *T. harzianum* T22 با ۷۶/۵۳ درصد بازدارندگی رشد پرگنه در مقایسه با دو آنتاگونیست دیگر از پتانسیل بالاتری در بازدارندگی از رشد *Pm. minimum* برخوردار بود. همچنین ارزیابی اثرات کنترلی ترکیبات فرار این آنتاگونیست‌ها حاکی از آن بود که اختلاف معنی داری بین این سه گونه آنتاگونیست وجود ندارد. ترکیبات غیر فرار *T. brevicompactum* با ۷۵,۴۶ درصد بازدارندگی از رشد پرگنه بیمارگر پتانسیل کنترلی بالاتری را نسبت به دو گونه‌ی دیگر دارا بود. ترکیبات غیر فرار دو گونه *T. longibrachiatum* و *T. harzianum* T22 به ترتیب ۴۶/۹۳ و ۱۷/۶۷ درصد بازدارندگی داشتند. همچنین بررسی اثرات کنترلی این آنتاگونیست‌ها روی دو تیپ آمیزشی *Pm. aleophilum* نشان داد که ترکیبات فرار *T. longibrachiatum* اثرات کنترلی بیشتری روی تیپ آمیزشی *MAT1-1* (۴۸/۷۴ درصد) نسبت به *MAT1-2* (۳۵/۱۰) دارند. در حالت کلی، نتایج این بررسی نشان داد که گونه *T. brevicompactum* به عنوان یک گونه آنتاگونیست با قابلیت بالا درکنترل زیستی *Pm. minimum* مطرح می‌باشد، بنابراین بررسی‌های تکمیلی در مورد ویژگی‌های کنترل زیستی و کارایی این گونه در کنترل بیمارگرهای دخیل در این بیماری در شرایط گلخانه‌ای و مزرعه‌ای مورد نیاز می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: آنتاگونیست، بیماری نوار برگی، تیپ آمیزشی، کنترل زیستی.

مقدمه

در سال‌های اخیر، بیماری‌های تنه به عنوان تهدید بالقوه در کاشت و پروش انگور خسارت‌های قابل توجهی را به این محصول در سرتاسر دنیا وارد می‌کنند (موگنایی و همکاران ۱۹۹۹، لاریگنون و دبوس ۲۰۰۰، گراماژه و همکاران ۲۰۰۸). بیماری نوار برگی انگور که قبلا تحت عنوان بیماری اسکا شناخته می‌شد، مهم‌ترین بیماری تنه‌ی انگور محسوب می‌شود که به عنوان عامل محدود کننده‌ی کاشت و پرورش انگور در دو دهه‌ی گذشته در سراسر دنیا شناخته شده است.

بیماری نوار برگی انگور با مجموعه‌ای از علایم شاخ و برگ و علایم داخلی مشخص می‌شود. انگورهای بیمار در برخی موارد می‌توانند با تأخیر در جوانه‌دهی در بهار

Archive of SID
www.SID.ir

یعنی زمانی که چرخه‌ی جدید رشد شروع می‌شود، شناسایی شوند (موگنایی و همکاران ۱۹۹۹). برگ‌های انگورهای آلوده به بیماری به رنگ سبز تیره با لکه‌های رنگ پریده بین رگبرگی مشاهده می‌شوند که به تدریج بزرگ شده و به هم می‌پیوندند و ایجاد علایم برگی نقش ببری می‌کنند (موگنایی و همکاران ۱۹۹۹، سوریکو و همکاران ۲۰۰۶). در موارد شدید، شاخه‌های انگور به طور ناگهانی پژمرده می‌شوند که در این حالت به آن سکته یا آپوپلکسی (Apoplexy) گفته می‌شود (سوریکو و همکاران ۲۰۰۶). گونه‌های جنس *Phaeoacremonium* از هیفومیست‌های عمده مرتبط با این بیماری در سراسر دنیا می‌باشند (موسترت و همکاران ۲۰۰۶). در بین گونه‌های این جنس، *Pm. minimum* به عنوان گونه‌ی غالب همراه با بیماری نوار برگی انگور در اغلب مناطق کشت و پرورش انگور گزارش شده است و از قدرت بیماری‌زایی بالایی برخوردار می‌باشد (عدالت و همکاران ۲۰۰۰، ارزنلو و همکاران ۲۰۱۳). بررسی‌ها نشان داده که منابع اصلی مایه‌ی تلقیح *Phaeoacremonium* در تاکستان‌ها، مواد گیاهی آلوده، خاک و مواد تکثیری هستند (لاریگنون و همکاران ۲۰۰۱، رونی-لاتام و همکاران ۲۰۰۱، موسترت و همکاران ۲۰۰۶، اساخی و همکاران ۲۰۰۸، دام و همکاران ۲۰۰۸). اسپورهای این بیمارگرها همچنین از طریق زخم‌های ایجاد شده با سایر عوامل مخرب فیزیکی، توانایی رخنه به انگورها را دارند (عدالت و همکاران ۲۰۰۰).

راه کارهای مدیریت بیماری اغلب پیشگیرانه و محدود به کاهش خطر عفونت قلمه‌ها و مواد تکثیری، کاهش میزان مایه تلقیح و گسترش بیماری در تاکستان-ها می باشد (گراماژه و آرمنگول ۲۰۱۱). انتخاب مواد تکثیری و قلمه از درختچه های مادری سالم و جلوگیری از آلودگی قلمه ها در خزانه یکی از روش های موثر مدیریت بیماری می باشد (موگنایی ۱۹۹۹). رعایت اصول بهداشتی و جلوگیری از ایجاد زخم و دیگر تنش های محیطی در مدیریت بیماری موثر است (فوریه و همکاران ۲۰۰۰). تیمار مواد تکثیری با آب گرم در کاهش میزان مایه‌ی تلقیح عوامل بیماری زای تنه‌ی مو موثر است. قرار دادن قلمه‌ها در اب با دمای ۵۰ درجه‌ی سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه در حذف عوامل قارچی موثر بوده است (وایته و همکاران ۲۰۱۳).

با توجه به هوازاد بودن و خاک‌زاد بودن عامل بیماری و استقرار آن در بافت‌های آوندی میزبان، کنترل بیماری در تاکستان با استفاده از ترکیبات شیمیایی و قارچکش ها مشکل می‌باشد. در گذشته ترکیب شیمیایی ارسنیت سدیم برای کنترل بیمارگرهای تنه‌ی مو به صورت موفقیت آمیز مورد استفاده قرار می گرفت. با توجه به اثرات سوء این ترکیب بر انسان و محیط زیست، استفاده از این ترکیب از سال ۲۰۰۳ در اغلب کشورها ممنوع شده است (برتش و همکاران ۲۰۱۳). تعدادی از ترکیبات شیمیایی برای کنترل بیماری برگ نواری انگور مورد آزمایش قرار گرفته‌اند ولی هنوز قارچکشی برای کنترل این بیمارگرها ثبت تجاری نشده است (موگنایی ۱۹۹۹، اسکالن و همکاران ۲۰۰۷). غوطه‌ور کردن ریشه-های مادری در حال خواب و قلمه‌ها در محلول قارچکش‌هایی مثل زیرام، تیرام، تیوفانات متیل و لایم سولفور قبل از قلمه زنی باعث کاهش آلودگی به *Pm. minimum* می‌شود (اسکالن و همکاران ۲۰۰۷). مطالعات نشان داده‌اند که تیمار زخم‌های ناشی از هرس با قارچکش‌هایی نظیر تیوفانات متیل، سایپروکونازول، بورون و پیراکلواستروبین به طور موثر موجب حفاظت زخم‌های ناشی از هرس از بیمارگرهای *Pm. minimum* در تاکستان‌ها می‌شود (اسکالن و همکاران ۲۰۰۷). برخی از این سموم بر روی برگ و تنه نیز استفاده شده‌اند ولی به دلیل آوندی بودن عامل بیماری زیاد موثر واقع نشده اند. مطالعه‌ای که توسط رضائی و همکاران (۱۳۹۳) در ایران انجام شده است دو قارچکش ارسنیت سدیم و تیوفانات متیل -تیرام بیشترین اثر بازدارندگی را بر روی جوانه زنی اسپور قارچ *Pm. iranianum* در شرایط آزمایشگاهی داشته‌اند. کنترل شیمیایی به دلیل مشکلات زیست محیطی و نیز در معرض نبودن بیمارگر (به دلیل آوندی بودن آن) دارای محدودیت می باشد.

کنترل زیستی به عنوان یک روش جایگزین برای کاربرد مواد شیمیایی به‌شکل فزاینده‌ای در برنامه‌های مدیریت بیماری‌های تنه‌ی مو مورد توجه واقع شده است (فوریه و همکاران ۲۰۰۱، فوریه و هالن ۲۰۰۴). در این بین پتانسیل گونه‌های *Trichoderma* در کنترل بیمارهای تنه‌ی مو مورد بررسی قرار گرفته است. دو گونه *T. harzianum* و *T. atroviridae* در کنترل بیمارگرهای تنه‌ی مو (شانکر بوتریوسفریایی، اسکا و ...)

Archive of SID

www.SID.ir

موثر شناخته شده اند (فوریه و همکاران ۲۰۰۱). گونه های تریکورما به طور معنی‌داری رشد ریشه‌ی نهال‌های مو را افزایش داده اند، این امر منجر به کاهش حساسیت گیاه در برابر برخی بیمارگرهای تنه در شرایط تنش شده است (فوریه و همکاران ۲۰۰۱، اگوستی-بریساچ و ارمنگول ۲۰۱۳). دی مارکو و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که گونه‌های *Trichoderma* قادر به حفاظت زخم‌های ناشی از هرس از حمله قارچ‌های *Phaeomoniella chlamydospora* و *Pm. minimum* می‌باشند. دی مارکو و استی (۲۰۰۷) گزارش کردند که گونه‌های *Trichoderma* این توانایی را دارند که حجم ریشه‌های انگور آلوده به *Pa. chlamydospora* را افزایش دهند. بررسی‌ها نشان داده است که *T. brevicompactum* در شرایط آزمایشگاهی اثر کنترلی بسیار خوبی روی *Eutypa lata*، *Pm. minimum* و *Pa. chlamydospora* دارد (گرافنهان ۲۰۰۶). در تحقیق کوتز و همکاران (۲۰۱۱) جدایه‌های *T. atroviride* از قابلیت خوبی در کنترل *Pm. minimum* برخوردار بوده‌اند.

علاوه بر گونه های تریکودرما، دیگر عوامل کنترل زیستی از قبیل *Bacillus subtilis*، *Fusarium lateritum*، *Erwinia herbicola*، *Cladosporium herbarum*، *Aureobasdium pullulans* و *Rhodotorula rubra*) و ترکیبات با منشاء طبیعی مانند کیتوزان و سیستئین به تنهایی و یا به همراه قارچکش ها در کنترل بیمارگرهای تنه‌ی مو موثر بوده‌اند (برتش و همکاران ۲۰۱۳). با این وجود بررسی تاثیر این عوامل کنترل زیستی اغلب محدود به شرایط آزمایشگاه و یا خزانه بوده است. ناسیمنتو و همکاران (۲۰۰۷) اثر قارچکشی کیتوزان را روی تعدادی از بیمارگرهای قارچی تنه‌ی مو در شرایط آزمایشکاه و مزرعه ای ارزیابی کردند. در تحقیق آنها کیتوزان در مقایسه با شاهد تاثیر معنی‌داری در بازدارندگی از رشد بیمارگر و بهبود رشد گیاه و کاهش میزان بیماری نشان داد. استفاده از عوامل کنترل زیستی در تحریک سیستم دفاعی درختچه‌ی مو بر علیه بیمارگرهای تنه موثرمی باشد. تیمار ریشه‌ی قلمه‌های مو با شبه قارچ *Pythium oligandrum* باعث کاهش ۵۰ درصدی نکروز ایجاد شده توسط بیمارگرهای اسکا شده است (یاکوب و همکاران ۲۰۱۶). در یک تحقیق دیگر تیمار ریشه مو با قارچ های میکوریز داخلی هم منجر به افزایش مقاومت مو نسبت به بیماری های پا سیاه (ایجاد شده توسط *Ilyonecteria* spp.) شده است (جونز و همکاران ۲۰۱۴). پیتت و گوبلر (۲۰۰۶) گزارش کردند که تلقیح ریشه‌ی مو با قارچ میکوریز *Glomus intraradices* باعث کاهش حساسیت به بیماری ساق سیاه در مقایسه با شاهد می گردد.

در سال‌های اخیر، توجه ویژه‌ای به طبیعت درون‌زی بودن گونه‌های جنس تریکودرما و امکان استفاده از آنها در حفاظت گیاهان در برابر عوامل بیماری‌زای گیاهی و تقویت رشد گیاهان معطوف گردیده است (پارسائیان ۲۰۰۷، بایلی و ملنیک ۲۰۱۳). گونه‌های تریکودرما بر خلاف اینکه از پتانسیل پوده رستی قوی برخوردار می-باشند، دارای فاز اپیفیتی قابل توجهی بوده و همچنین از پتانسیل قابل ملاحظه‌ای در درون‌زی بودن برخوردارند و در داخل بافت‌های گیاهی سالم به صورت ریسه‌های غیر فعال و بدون ایجاد خسارت روی میزبان زندگی می-کنند (پارسائیان ۲۰۰۷، بایلی و ملنیک ۲۰۱۳). حضور قارچ‌های درون‌زی در گیاه مزایای زیادی برای گیاه میزبان به همراه دارد که از جمله باعث افزایش مقاومت به تنش‌های محیطی شامل سرما ، خشکی، تغییرات pH و یون‌های سمی در خاک می‌شوند (پارسائیان ۲۰۰۷، بایلی و ملنیک ۲۰۱۳). قابلیت درون‌زی شدن برخی گونه‌های تریکودرما (*T. ovalisporum*، *T. hamatum* و *T. harzianum*) نه تنها در ریشه بلکه در بافت‌های هوایی گیاه شامل شاخه‌های درخت، ساقه و میوه در برخی گونه‌های گیاهی استوایی به اثبات رسیده است (بایلی و همکاران ۲۰۰۶، بایلی و همکاران ۲۰۰۸). یکی از بیماری-هایی که توسط گونه‌های درون‌زی تریکودرما کنترل شده است بیماری غلاف سیاه کاکائو است که توسط چند گونه از *Phytophtora* ایجاد می‌گردد (هانادا و همکاران ۲۰۰۸). همچنین قابلیت رشد درون‌زی چندین گونه از تریکودرما (*T. ovalisporum*، *T. theobromicola*، *T. hamatum*، *T. stilbohypoxyli* و *T. caribbaeum var. aequatoriale*) که از میزبان‌های گیاهی مختلف جداسازی شده بودند، روی گیاه فلفل تند گزارش شده است و با فعال کردن سیستم ایمنی گیاه میزبان بر علیه *Phytophthora capsici*(بی و همکاران ۲۰۱۱) باعث کنترل بیماری شده‌اند. با توجه به استقرار

Archive of SID

www.SID.ir

عامل بیماری برگ نواری انگور در بافت‌های آوندی، در صورت رخنه و کلونیزه کردن بافت‌های آوندی قلمه‌های انگور توسط گونه‌های تریکودرما، امکان کنترل بیمارگر و کاهش خسارت ناشی از بیمارگر فراهم خواهد گردید. در تحقیق حاضر به منظور بررسی قابلیت‌های جدایه‌های درون‌زی تریکودرما در بازدارندگی از رشد عامل بیماری و مقایسه‌ی تاثیر آنها با جدایه تجاری، اثر بازدارندگی سه گونه *Trichoderma* Persoon شامل *T. harzianum* Rifai (جدایه تجاری T22)، *T. longibrachiatum* و *T. brevicompactum* (جدایه‌های درون‌زی) روی چهار جدایه *Pm. minimum* با دو تیپ آمیزشی متفاوت با استفاده از روش‌های کشت متقابل، تاثیر متابولیت‌های فرار و متابولیت‌های غیر فرار بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های *Pm. minimum* و گونه‌های تریکودرما

جدایه‌های *Pm. minimum* از کلکسیون کشت‌های زنده‌ی دانشگاه تبریز (CCTU) که طی تحقیقات قبلی جمع آوری شده بودند و بیماری‌زایی آنها روی درختچه انگور نیز به اثبات رسیده بود، انتخاب گردیدند (نرمانی و همکاران ۲۰۱۶). برای این منظور چهار جدایه *Pm. minimum* با تیپ‌های آمیزشی متفاوت (دو جدایه از هر تیپ آمیزشی) از مناطق جغرافیایی مختلف انتخاب و جهت انجام آزمایش‌های کنترل زیستی استفاده گردید (جدول ۱). جدایه *T. brevicompactum* (جداسازی شده از بافت‌های تنه چنار دارای علایم پوسیدگی) و جدایه تجاری T22 *T. harzianum*، از کلکسیون کشت های زنده‌ی گروه گیاه‌پزشکی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز تهیه گردید. همچنین از بین پنج جدایه *Trichoderma* درون‌زی که در این تحقیق از ساقه‌های چند ساله درختچه‌های انگور جداسازی و شناسایی شدند، یک جدایه بر اساس ارزیابی‌های اولیه‌ی کنترل زیستی، انتخاب و اثرات بازدارندگی آن روی عامل بیماری بررسی شد (جدول ۱).

جدول۱- لیست گونه‌های ***Trichoderma*** و جدایه‌های ***Phaeoacremonium minimum*** استفاده شده در تحقیق حاضر

نام جدایه	CCTU	محل نمونه برداری	تیپ آمیزشی
***Pm. minimum* A**	**CCTU 1275**	آذرشهر	***MAT1-1***
***Pm. minimum* B**	**CCTU 1282**	مشکین شهر	***MAT1-1***
***Pm. minimum* C**	**CCTU 1312**	ملکان	***MAT1-2***
***Pm. minimum* D**	**CCTU 1318**	عجب‌شیر	***MAT1-2***
***Trichoderma* sp.**	**CCTU 1731**	چناران	–
***Trichoderma* sp.**	**CCTU 1765**	چناران	–
***Trichoderma* sp.**	**CCTU 1729**	مرند	–
***Trichoderma* sp.**	**CCTU 1730**	مرند	–
***Trichoderma* sp.**	**CCTU 1766**	مرند	–
T. brevicompactum	**CCTU 1734**	تهران	–
***T. harzainum* T22**	**T22**	تهیه شده از موسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی	–

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی و شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌های درون‌زی تریکودرما

نمونه‌برداری از ساقه‌های چند ساله‌ی درختچه‌های انگور سالم و دارای علایم عمومی زوال انجام شد. جداسازی تریکودرماهای درون‌زی مطابق روش‌های رایج (هلاندر و همکاران ۲۰۰۷) انجام شد.

ویژگی‌های ریخت‌شناختی جدایه‌ها شامل نحوه‌ی انشعاب کنیدیوفورها، شکل، اندازه و سایر خصوصیات فیالیدها، کنیدیوم‌ها، کلامیدوسپورها و ریسه‌ها روی محیط کشت عصاره‌ی مالت آگار (MEA[1]) دو درصد تحت شرایط دو روز تاریکی و چهار روز تناوب نوری (۱۲:۱۲ ساعت) و دمای ۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفتند. نمونه‌های میکروسکوپی با استفاده از آب مقطر تهیه و با میکروسکوپ المپیوس مدل BX51 بررسی شدند

شناسایی مولکولی جدایه‌های تریکودرمای درون‌زی

استخراج DNA ژنومی

جدایه‌های قارچی در تشتک‌های حاوی محیط کشت PDA[2] کشت شده و در تاریکی در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت هفت روز نگهداری گردیدند. استخراج DNA مطابق روش مولر و همکاران (۱۹۹۲) انجام شد. کمیت و کیفیت DNA به دست آمده به روش اسپکتروفتومتری مورد ارزیابی قرار گرفت.

تکثیر نواحی ژنومی، توالی یابی و شناسایی مولکولی

ناحیه ITS-rDNA با استفاده از آغازگر رفت (ITS1 = '5TCCGTAGTTGGACCTGCGG3') و برگشت (ITS4 = '5TCCTCCGCTTATTGATATGC3') در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (وایت و همکاران ۱۹۹۰) و در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر تکثیر گردید. مخلوط واکنش حاوی ۱۰ میکرولیتر Taq DNA Pol 2x Master Mix ، ۰/۸ پیکومول از هر کدام از آغازگرهای رفت و برگشت، ۱۵-۱۰ نانوگرم DNA ژنومی و۱۲/۴ میکرولیتر آب دیونیزه استریل بود. تکثیر نواحی ژنومی مورد نظر با استفاده از دستگاه ترموسایکلر (Bio RAD– Mj Mini) و با اعمال درجه حرارت ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه جهت واسرشت سازی اولیه و به دنبال آن ۳۶ چرخه شامل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۶ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت یک دقیقه و در نهایت یک چرخه ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت هفت دقیقه جهت گسترش نهایی انجام شد. دستگاه پس از انجام واکنش چهار درجه سانتی گراد برای مدت نامعلوم، جهت جلوگیری از تجزیه و تخریب محصول واکنش تنظیم گردید. فرآورده-های واکنش روی ژل آگارز ۱٪ حاوی ۱/. میکروگرم بر میلی‌گرم اتیدیوم‌بروماید در بافر 1X TAE توسط دستگاه عکس‌برداری از ژل (Gel documentation) تحت نور ماورا بنفش مشاهده و بررسی شدند و محصول PCR برای توالی‌یابی به شرکت انستیتوپاستور ایران فرستاده شد. داده های خام توالی بعد از ویرایش با نرم افزار سکمن (Lasergene package, DNAstar, Madison, USA)، با استفاده از نرم افزار بلاست (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) با توالی های موجود در بانک ژن مقایسه و هویت جدایه‌های قارچی تعیین گردید.

بررسی اثر کنترل زیستی جدایه‌های تریکودرما بر *Pm. minimum*

۱-کشت متقابل قارچ عامل بیماری با عوامل کنترل زیستی

به منظور مقایسه‌ی قدرت بازدارندگی جدایه‌های *Trichoderma* از رشد قارچ بیمارگر، از روش کشت دو طرفه استفاده شد. برای این منظور، حلقه‌های پنج‌میلی متری از حاشیه کشت‌های تازه قارچ بیمارگر و جدایه های *Trichoderma* تهیه و در داخل تشتک پتری نه سانتی‌متری حاوی محیط کشت سیب زمینی-دکستروز-آگار با فاصله هشت سانتی‌متر از هم کشت شدند. در پتری شاهد، از یک حلقه محیط‌کشت PDA به جای قارچ آنتاگونیست استفاده شد. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در تاریکی نگهداری شدند. قطر پرگنه قارچ عامل بیمارگر هر روز اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه

[1]Malt Extract Agar
[2]Potato Dextrose Agar

Archive of SID

www.SID.ir

گردید و پس از ۱۴ روز نیز اندازه‌گیری نهایی صورت گرفت. آزمایش در قالب طرح پایه کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. در مطالعه‌ی حاضر، توانایی استقرار عوامل بیوکنترل روی هیف بیمارگر و تولید اسپور، ایجاد هاله‌ی بازدارنده و درصد بازدارندگی از رشد شعاعی قارچ بیمارگر از فرمول پیشنهادی ادینگتون و همکاران، (۱۹۷۱) $I(\%) = [(C-T)/C]\times 100$ استفاده شد. که در آن I درصد بازدارندگی از رشد شعاعی قارچ بیماری‌زا، C شعاع پرگنه قارچ بیمارگر در تیمار شاهد و T شعاع رشد پرگنه قارچ بیماری‌زای گیاهی در تعامل با قارچ آنتاگونیست می‌باشد.

۲-تاثیر ترکیبات برون سلولی فرار گونه‌های تریکودرما بر *Pm. minimum*

دیسک‌هایی به قطر پنج میلی‌متر از حاشیه پرگنه‌های پنج روزه‌ی عوامل بیوکنترل و نیز قارچ بیمارگر در مرکز تشتک‌های پتری نه سانتی‌متری حاوی محیط کشت PDA قرار داده شدند. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی نگه‌داری شدند. بعد از گذشت ۴۸ ساعت، منتهی‌الیه رشد پرگنه قارچ بیمارگر علامت-گذاری شد. تحت شرایط سترون، درب تشتک‌های حاوی قارچ آنتاگونیست و بیمارگر برداشته شد و تشتک حاوی قارچ بیمارگر به صورت وارونه بر روی تشتک حاوی قارچ آنتاگونیست قرار داده شد. محل انطباق دو تشتک با نوار پارافیلم به طور کامل مسدود گردید. در تیمار شاهد از تشتک پتری حاوی دیسک PDA بدون هیچ نوع قارچ آنتاگونیست استفاده شد وتشتک حاوی قارچ بیمارگر به صورت وارونه روی آن قرار داده شد. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در تاریکی نگه‌داری شدند. قطر پرگنه‌ی قارچ عامل بیماری هر روز اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه گردید. پنج روز پس از قرار دادن تشتک‌ها به صورت متقابل نیز اندازه‌گیری نهایی صورت گرفت. درصد بازدارندگی از رشد شعاعی قارچ بیمارگر با استفاده از فرمول گفته شده محاسبه گردید.

۳-تاثیر مواد برون سلولی غیرفرار گونه‌های تریکودرما بر *Pm. minimum*

جهت بررسی تاثیر ترکیبات خارج سلولی عوامل بیوکنترل، پنج ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵۰ میلی‌لیتر محیط‌کشت مایع سیب‌زمینی دکستروز (PDB[3]؛ ۲۰۰ گرم سیب‌زمینی، ۲۰ گرم دکستروز، ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) توسط دو قطعه دیسک میسلیومی به قطر هفت میلی‌متر از حاشیه‌ی پرگنه‌ی پنج روزه‌ی قارچ عامل کنترل زیستی تلقیح شده و در دمای آزمایشگاه نگه‌داری شدند. پس از یک ماه محتویات ارلن‌ها در شرایط سترون دو بار با استفاده از کاغذ صافی استریل بوسیله پمپ خلاء عصاره‌گیری شدند. محیط حاوی ترشحات قارچی به مدت پنج دقیقه به منظور حذف مواد جامد با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. عصاره‌های صاف شده پس از افزودن ۲۰ گرم بر لیتر آگار اتوکلاو شده و در تشتک‌های پتری ریخته‌شدند. قارچ بیمارگر در مرکز تشتک‌های حاوی محیط‌کشت تهیه شده با عصاره‌ی قارچ‌های آنتاگونیست کشت داده شد. قارچ بیمارگر رشد یافته بر روی محیط‌کشت PDA بدون عصاره نیز به عنوان شاهد استفاده شد. تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد تحت شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. قطر پرگنه‌ی قارچ عامل بیماری هر روز اندازه‌گیری و با شاهد مقایسه گردید و پس از ۱۴ روز نیز اندازه‌گیری نهایی صورت گرفت. درصد بازدارندگی از رشد شعاعی میسلیوم قارچ بیمارگر با استفاده از فرمول اشاره شده در بخش قبل محاسبه شد.

تاثیر غلظت‌های مختلف مواد برون سلولی غیرفرار اتوکلاو شده و اتوکلاو نشده گونه‌های تریکودرما بر *Pm. minimum*

جهت بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف مواد خارج سلولی غیرفرار عوامل بیوکنترل از محیط‌کشت‌های PDA حاوی غلظت‌های مختلف ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ درصد از عصاره‌ی کشت اتوکلاو شده و غلظت‌های مختلف ۲۵، ۵۰ و۷۵ درصد از عصاره‌ی کشت اتوکلاو نشده استفاده

[3]Potato Dextrose Broth

Archive of SID

www.SID.ir

شد. به منظور تهیه‌ی محیط‌های غذایی حاوی عصاره‌ی کشت اتوکلاو شده، عصاره کشت قارچ‌های آنتاگونیست مطابق روش ارزنلو و همکاران (۲۰۱۴) به نسبت‌های مختلف با محیط کشت PDA مخلوط و اتوکلاو شدند. برای تهیه‌ی محیط‌کشت PDA حاوی ترکیبات غیرفرار اتوکلاو نشده‌ی قارچ‌های آنتاگونیست، محیط حاوی ترشحات قارچی به مدت پنج دقیقه به منظور حذف مواد جامد با دور ۱۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. برای از بین بردن قدرت جوانه زنی اسپورهای باقی مانده‌ی قارچ آنتاگونیست، عصاره صاف شده و سانتریفیوژ شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد نگه‌داری شدند و در نهایت محیط‌کشت‌های PDA حاوی رقت‌های مورد نظر از عصاره‌ی کشت اتوکلاو نشده مطابق روش ارزنلو و همکاران (۲۰۱۴) تهیه شدند. از تشتک حاوی محیط‌کشت PDA نیز به عنوان شاهد استفاده شد. قارچ بیمارگر در مرکز تشتک‌ها کشت داده شد و تشتک‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد وتحت شرایط تاریکی نگه‌داری شدند. پس از ۱۴ روز درصد بازدارندگی از رشد شعاعی قارچ بیمارگر با استفاده از فرمول ذکر شده در بالا محاسبه شد.

محاسبات آماری

در بررسی فعالیت آنتاگونیستی در آزمایشگاه برای صفت بازدارندگی قارچ‌های آنتاگونیست علیه چهار جدایه قارچ *Pm. minimum*، هر کدام از آزمایش‌ها جداگانه در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال پنج درصد استفاده گردید. برای مقایسه‌ی اثرات کنترلی جدایه‌های تریکودرما روی دو نوع تیپ آمیزشی *MAT1-1* و *MAT1-2* از آزمون تی استفاده گردید. برای تجزیه داده‌ها از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱ استفاده شد. ترسیم نمودارها با نرم‌افزار Excel انجام شد.

نتایج

شناسایی جدایه‌های تریکودرمای درون‌زی در انگور

ویژگی‌های ریخت‌شناختی پنج جدایه درون‌زی تریکودرما جداسازی شده در این تحقیق با ویژگی های ارایه شده برای گونه *T. longibrachiatum* مطابقت داشت. ویژگی های پرگنه روی محیط کشت MEA دو درصد، در دمای ۲۱ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط دو روز تاریکی و چهار روز در تناوب نوری عبارت بود از: رنگ پرگنه سبز تیره، سطح زیرین آن سبز مایل به زرد، پرگنه سریع الرشد و دارای دوایر متحدالمرکز، قطر آن پس از شش روز ۶۰ الی۶۵ میلی‌متر، دارای ریسه‌های سطحی، هوایی، بی‌رنگ، محور اصلی کنیدیوفورها بلند و دارای انشعابات کم تراکم و نامنظم، انشعابات اولیه اغلب کوتاه و نامنظم و به ندرت دارای انشعابات ثانویه، فیالید-ها بیشتر به صورت منفرد و نامنظم و ندرتا به صورت دسته‌های چندتایی و فراهم، فیالیدها آمپولی شکل یا استوانه‌ای و کشیده و در اندازه‌های ۳-۲/۵ (-۲) × (۹-) ۷-۶/۳۰ (-۵) میکرومتر، کنیدیوم‌ها سبز رنگ دارای سطح صاف، بیضوی و در اندازه‌های ۲-۱/۵ × (۶-) ۵/۵-۴/۵(-۲,۵) میکرومتر و کلامیدوسپور بصورت میانی. مقایسه داده‌های توالی ناحیه ITS ایجاد شده در این تحقیق با داده‌های توالی مرجع در بانک ژن همخوانی داشت، هویت جدایه‌ها با استفاده از ترکیب داده‌های ریخت شناختی و مولکولی گونه *T. longibrachiatum* تعیین گردید.

در تحقیق حاضر برای اولین بار تلاش گردید تا گونه‌های درون‌زی تریکودرما از بافت‌های آوندی تنه‌ی درختچه‌ی انگور جداسازی شوند. در این راستا پنج جدایه تریکودرما از نمونه‌های ساقه انگور از استان‌های آذربایجان شرقی و خراسان رضوی جداسازی شد. بر اساس ویژگی‌هایی نظیر نرخ رشد و قدرت بازدارندگی در آزمون‌های اولیه، از بین پنج جدایه یک جدایه جهت ارزیابی پتانسیل آنتاگونیستی در این پژوهش انتخاب گردید.

نتایج بررسی آزمایشگاهی قدرت آنتاگونیستی گونه‌های *Trichoderma* بر علیه چهار جدایه قارچ *Pm. minimum*

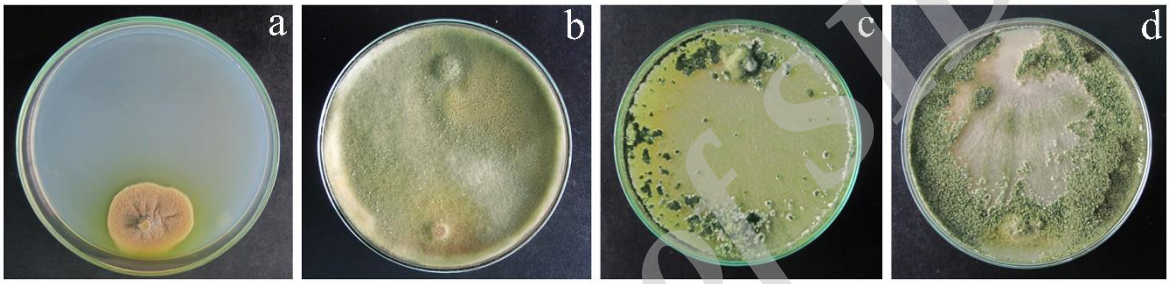
۱- مهار رشد میسلیومی در روش کشت متقابل

طبق نتایج آزمون نرمال بودن، داده‌ها از توزیع نرمال برخوردار بودند. نتایج آنالیز داده‌ها نشان داد که در روش کشت متقابل هر سه جدایه‌ی تریکودرما بر

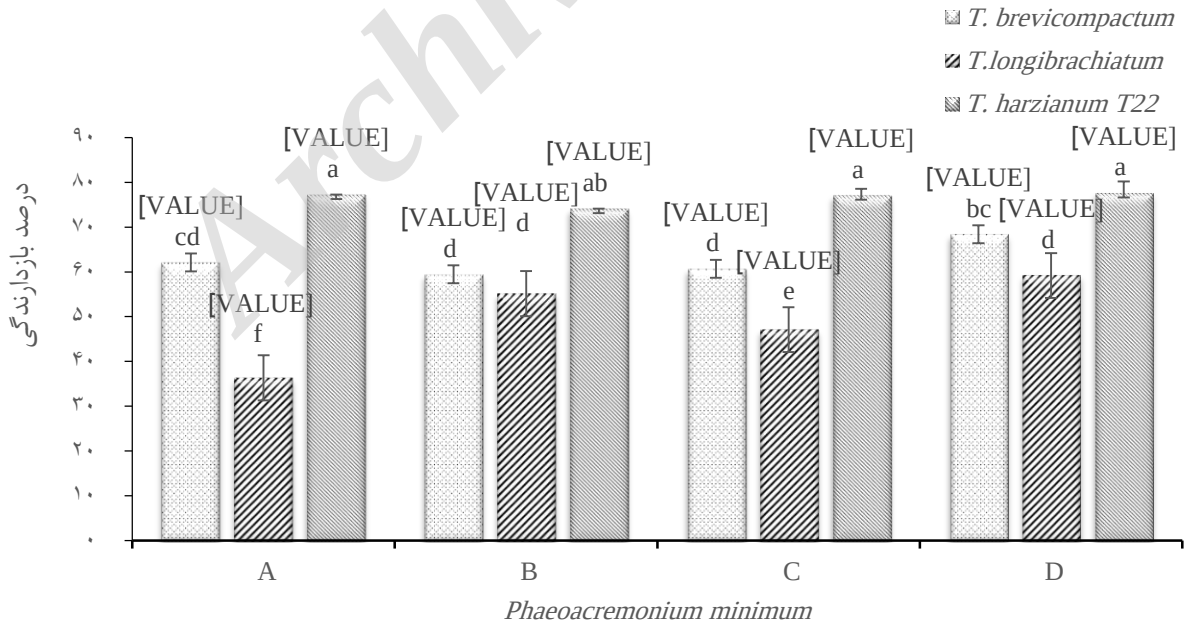
Archive of SID

www.SID.ir

روی پرگنه بیمارگر رشد کردند و تولید هاله‌ی بازدارنده ننمودند. پیچش به اطراف ریسه بیمارگر در هیچ یک از سه جدایه تریکودرما مشاهده نشد. همچنین اسپورزایی جدایه *T. harzianum* T22 بر خلاف *T. brevicompactum* و *T.longibrachiatum* روی پرگنه *Pm. minimum* مشاهده نگردید (شکل۱). مطالعه‌ی پتانسیل قارچ‌های آنتاگونیست در رقابت با چهار جدایه قارچ *Pm. minimum* نشان داد که همه جدایه‌های مورد مطالعه قارچ‌های آنتاگونیست در مقایسه با شاهد اثر بازدارندگی معنی داری در رقابت با قارچ بیماری‌زا دارند (شکل۱). نتایج حاصل از محاسبه میانگین درصد بازدارندگی تیمارها و مقایسه آن‌ها، نشان داد که بیشترین درصد بازدارندگی در تعامل بین جدایه *Pm. minimum* D با آنتاگونیست *T. harzianum* T22 است که میانگین آن ۷۷/۶۱ درصد محاسبه گردید. در این مورد کمترین درصد بازدارندگی در تعامل بین جدایه *Pm. minimum* C با آنتاگونیست *T.longibrachiatum* مشاهده شد که ۳۶/۳۶ درصد محاسبه گردید (شکل ۲). همچنین نتایج این بررسی روشن ساخت که در روش کشت متقابل آنتاگونیست *T. harzianum* T22 به طور معنی‌داری اثرات کنترلی بیشتری نسبت به دو آنتاگونیست دیگر دارد (شکل ۲).



شکل ۱- کشت متقابل: a- شاهد بعداز ۱۴ روز روی محیط کشت PDA، b- برهمکنش *Trichoderma harzianum T22* - *Phaeoacremonium minimum* D، c- برهمکنش *Phaeoacremonium minimum* D - *Trichoderma longibrachiatum*، d- برهمکنش *Phaeoacremonium minimum* D - *Trichoderma brevicompactum*.



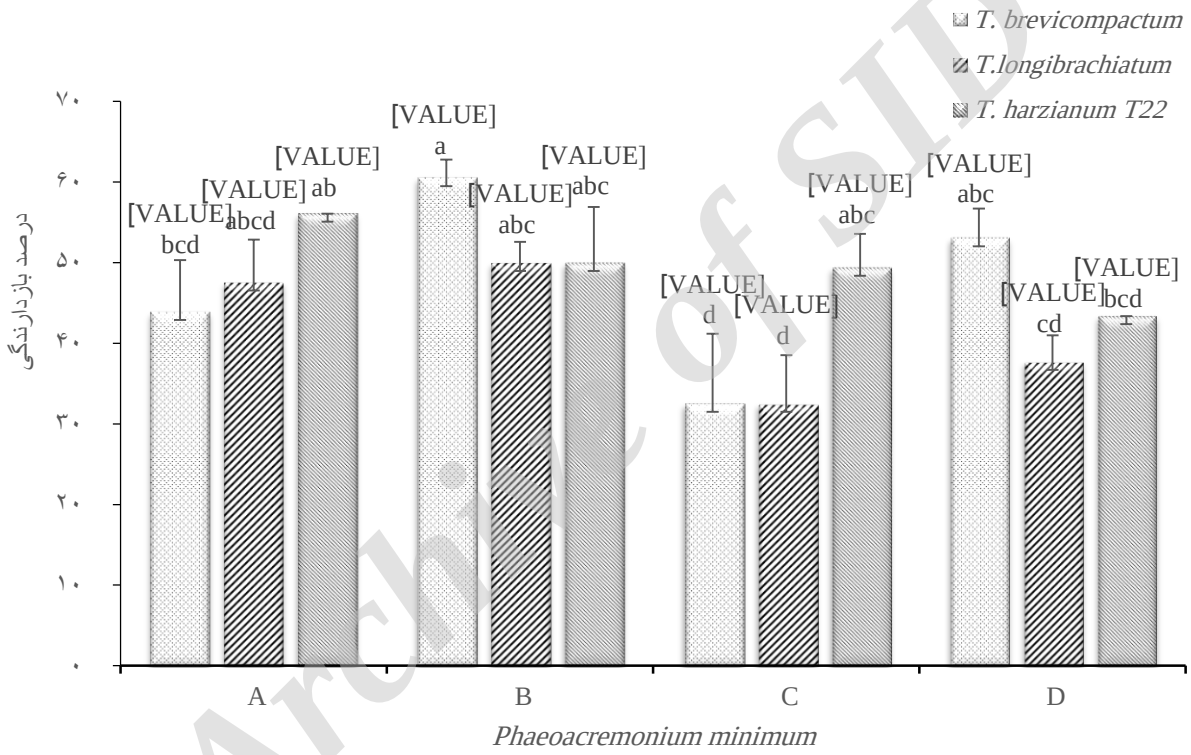
شکل **۲- درصد بازدارندگی جدایه‌های قارچی آنتاگونیست در کشت متقابل روی جدایه‌های *Phaeoacremonium minimum* در سطح احتمال پنج درصد.**

Archive of SID

www.SID.ir

۲- پتانسیل ترکیبات فرار ترشح شونده

مواد فرار تولید شده از همه‌ی جدایه‌های قارچ آنتاگونیست تاثیر معنی داری در بازدارندگی از رشد *Pm. minimum* داشتند ولی درصد بازدارندگی بسته به گونه‌ی قارچ آنتاگونیست و نیز بسته به جدایه قارچ بیماری‌زای مورد آزمایش متفاوت بود. بیشترین مقدار مربوط به *T. brevicompactum* در برابر قارچ *Pm. minimum* B (*MAT1-1*) (به میزان ۶۰/۵ درصد) محاسبه گردید و کمترین میزان نیز مربوط به جدایه‌های *T.longibrachiatum* و *T. brevicompactum* در تعامل با جدایه *Pm. aleophilum C* (*MAT1-2*) (۳۲/۵ درصد) بود (شکل ۳). اثرات بازدارندگی مواد فرار گونه *T. longibrachiatum* روی جدایه‌های تیپ آمیزشی *MAT1-1* بیشتر از *MAT1-2* بود، همچنین نتایج این بررسی مشخص کرد که مواد فرار تولید شده توسط سه گونه *Trichoderma* اختلاف معنی داری در میزان بازدارندگی از رشد پرگنه بیمارگر نداشتند.



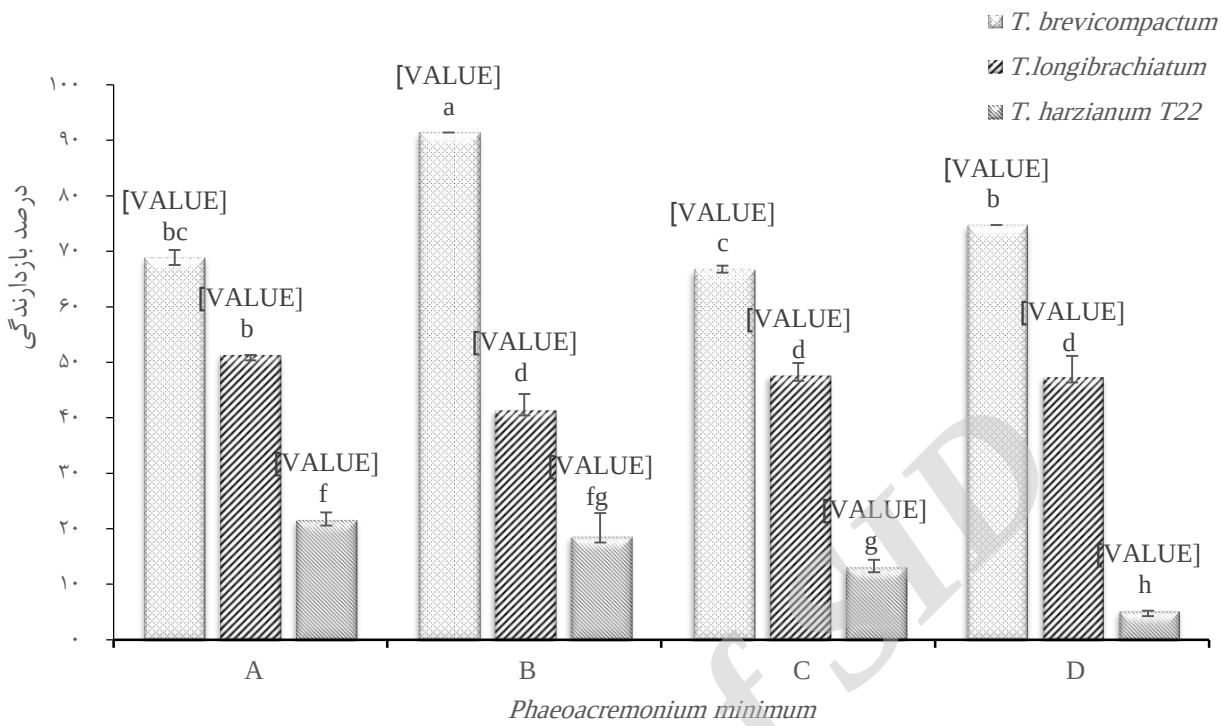
شکل ۳- درصد بازدارندگی مواد فرار جدایه‌های قارچی تریکودرما روی جدایه‌های ***Phaeoacremonium minimum*** در سطح احتمال پنج درصد.

۳- پتانسیل ترکیبات برون سلولی غیر فرار و آنتی بیوتیک‌ها

مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه جدایه‌های *Pm. minimum* توسط مواد غیرفرار و آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شونده‌ی قارچ آنتاگونیست نشان داد که رشد چهار جدایه‌ی بیمارگر مورد مطالعه به طور معنی‌داری توسط مواد مذکور ممانعت شدند. در این میان بیشترین درصد بازدارندگی ترکیبات غیر فرار اتوکلاو شده مربوط به تعامل *T. brevicompactum* با جدایه *Pm. minimum B* به میزان ۹۱/۴۲ و کمترین درصد بازدارندگی مربوط به تعامل *T. harzianum* T22 با جدایه *Pm. minimum* D به میزان ۵/۲۴ درصد بود (شکل ۴).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۴- درصد بازدارندگی مواد غیر فرار جدایه‌های تریکودرما بر روی جدایه‌های *Phaeoacremonium minimum* در سطح احتمال پنج درصد.

تاثیر رقت‌های مختلف ترکیبات برون سلولی غیر فرار و آنتی بیوتیک‌ها

مقایسه میانگین میزان بازدارندگی از رشد پرگنه جدایه‌های *Pm. minimum* توسط غلظت‌های مختلف مواد غیرفرار و آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شونده گونه‌های تریکودرما که رشد چهار جدایه بیمارگر مورد مطالعه به طور معنی‌داری توسط این مواد ممانعت شدند.بیشترین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه مربوط به غلظت ۱۰۰ درصد ترکیبات غیر فرار اتوکلاو شده *T. brevicompactum* در تعامل با جدایه *Pm. minimum* B با تیپ آمیزشی *MAT1-1* به میزان ۹۱/۴۲ و کمترین بازدارندگی مربوط به غلظت ۲۵ درصد ترکیبات غیر فرار اتوکلاو شده *T. harzianum* T22 در تعامل با جدایه‌های *Pm. minimum* B ، *Pm. minimum* C و *Pm. minimum* D بدون اثر کنترلی بود (جدول ۲).

نتایج بررسی قابلیت‌های کنترلی گونه‌های *Trichoderma* بر روی دو تیپ آمیزشی (*MAT1-1* و *MAT1-2*) بیمارگر

نتایج حاصل از آزمون تی نشان داد که در روش کشت متقابل، در تعامل *T. harzianum* T22 با جدایه‌های *Pm. minimum* با تیپ‌های آمیزشی متفاوت، بیشترین درصد بازدارندگی بر روی تیپ آمیزشی *MAT1-2* با ۷۷/۳۳±۱/۳۳ درصد و کمترین مقدار بر روی تیپ آمیزشی *MAT1-1* با ۷۵/۶۹±۰/۷ درصد بود. هر چند در این زمینه اختلاف معنی داری در میزان بازدارندگی (در سطح ۵٪) روی دو تیپ آمیزش مشاهده نشد. همچنین در تعامل *T. brevicompactum* با جدایه‌های *Pm. minimum* با تیپ‌های آمیزشی *MAT1-1* و *MAT1-2* به ترتیب ۶۰/۷۸±۱/۵۲ و ۶۴/۵۴±۱/۹۲ درصد بازدارندگی بدون وجود اختلاف معنی دار بین دو تیمار در سطح احتمال پنج درصد بود. در تعامل *T. longibrachiatum* با جدایه‌های *Pm. minimum* با تیپ‌های آمیزشی *MAT1-1*و *MAT1-2* به ترتیب ۴۵,۷۴±۴/۲۶ و ۵۳/۱۴±۳/۷۶ درصد بازدارندگی بدون اختلاف معنی دار در سطح احتمال پنج درصد بود (جدول ۳).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۲- درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف مواد غیر فرار گونه‌های مختلف ***Trichoderma*** از رشد جدایه‌های ***Phaeoacremonium minimum*** در سطح احتمال پنج درصد

گونه‌های ***Trichoderma***	غلظت‌های ترکیبات غیر فرار	درصد بازدارندگی روی جدایه‌های گونه ***Pm. minimum***			
		MAT1-1		***MAT1-2***	
		A	**B**	**C**	**D**
T. brevicompactum	*N ٪۲۵	۲۹/۶۶±۱/۳۳ fgh	۳۸/۵۵±۲/۸۵e	۲۹/۷۵±۱/۲۷ hi	۵۵/۷۸±۰ d
	N٪۵۰	۵۴/۰۳±۶/۷۵bc	۴۸/۵۶±۲/۴۷d	۴۳/۸±۱/۲۸ def	۵۷/۸۸±۱/۰۵ d
	N٪۷۵	۷۵/۶۶±۲/۳۴a	۶۲/۸۴±۱/۴۲bc	۵۴/۰۲±۰ bc	۶۸/۴۱±۰ bc
	**A ٪۲۵	۳۷/۸۱±۱/۳۵ def	۳۴/۲۷±۳/۷۸ef	۳۶/۱۲±۰/۶۴ ghi	۵۵/۷۸±۰ d
	A٪۵۰	۵۰/۶۶±۲/۴۳c	۵۷/۱۳±۰c	۴۵/۰۸±۱/۲۸ de	۶۵/۲۵±۱/۸۲ c
	A٪۷۵	۵۹/۴۴±۰b	۶۸/۵۶±۱,۴۳b	۵۷/۸۵±۲/۲۱ b	۷۱/۵۷±۰ ab
	A٪۱۰۰	۶۸/۹۰±۱/۳۵a	۹۱/۴۲±۰a	۶۶/۷۹±۰/۶۴ a	۷۴/۷۳±۰a
T. longibrachiatum	N ٪۲۵	۲۳/۶۲±۲/۹۴ hi	۱۴/۲۶±۲/۴۷j	۲۴/۶۴±۳/۳۷ ij	۲۷/۳۵±۳/۶۴ g
	N٪۵۰	۳۱/۷۱±۲/۹۴ efg	۲۴/۲۷±۱/۴۳ gh	۳۷/۴۱±۵/۱ fgh	۲۲/۰۸±۱/۰۵ gh
	N٪۷۵	۳۹/۱۶±۲/۳۴ de	۲۸/۵۵±۱/۴۲ fg	۳۸/۶۹±۲/۲۱ efg	۲۲/۸۰±۱/۰۵ gh
	A ٪۲۵	۳۲/۳۷±۱/۳۷ efg	۲۴/۲۶±۳/۷۸ gh	۳۰/۳۹±۳/۳۷ ehi	۳۹/۹۸±۱/۸۲ f
	A٪۵۰	۳۹/۱۶±۲/۳۴ de	۳۴/۲۷±۱/۴۳ ef	۳۸/۶۹±۳/۸۳ efg	۳۹/۹۸±۱/۸۲f
	A٪۷۵	۴۳/۲۲±۰ d	۳۸/۵۶±۱/۴۳ e	۴۵/۷۱±۱/۶۹ de	۴۱/۰۳±۱/۰۵ f
	A٪۱۰۰	۵۱/۳۳±۰ c	۴۱/۴۱±۲/۸۵ e	۴۷/۶۳±۱/۲۷cd	۴۷/۳۵±۳/۷۹ e
T. harzianum T22	N ٪۲۵	۲۶/۹۸±۲/۳۲ ghi	۱۸/۵۵±۲/۴۷ hij	۱۱/۸۷±۳/۳۱ l	۱۱/۵۵±۱/۸۲ i
	N٪۵۰	۲۲/۹۵±۰ hi	۲۲/۱۲±۱/۸۹ ghi	۲۳/۱۵±۳/۳۸ l	۲۱/۰۳±۰ h
	N٪۷۵	۲۳/۶۲±۰/۶۷ hi	۲۲/۸۴±۰ ghi	۱۳/۱۴±۲/۵۵ l	۲۵/۲۶±۲/۷۸ gh
	A ٪۲۵	۰±۰ efg	۰±۰ k	۰±۰ k	۰±۰ k
	A٪۵۰	۲۱/۵۹±۲۱/۳۵ i	۱۵/۶۹±۳/۷۸ ij	۱۳/۱۴±۱/۲۷ l	۵/۲۴±۰ j
	A٪۷۵	۳۵/۰۹±۲/۳۵ ef	۱۸/۵۵±۲/۲۸ hij	۱۴/۴۲±۱/۲۷ kl	۲۳/۲۷±۱/۱۲ gh
	A٪۱۰۰	۳۷/۸۱±۱/۳۵ def	۲۴/۲۷±۱/۴۳ gh	۲۰/۸۱±۲/۵۵ jk	۲۷/۳۵±۱/۸۲ g

* و ** (**A** و **N**) به ترتیب اوکلاو شده و نشده.

جدول ۳- درصد بازدارندگی گونه‌های ***Trichoderma*** بر روی دو تیپ آمیزشی (***MAT1-1*** و ***MAT1-2***) بیمارگر

روش مورد بررسی	گونه‌های ***Trichoderma***	درصد بازدارندگی روی دو تیپ آمیزشی جدایه‌های گونه ***Pm. minimum***	
		MAT1-1	***MAT1-2***
کشت متقابل	***T. brevicompactum***	۶۰/۷۸±۱/۵۲ a	۶۴/۵۴±۱/۹۲ a
	T. longibrachiatum	۴۵,۷۴±۴/۲۶a	۵۳/۱۴±۳/۷۶a
	T. harzianum T22	۷۵/۶۹±۰/۷a	۷۷/۳۳±۱/۳۳ a
ترکیبات فرار	***T. brevicompactum***	۵۲/۱۸±۴/۸۱a	۴۲/۷۷±۶/۲۳a
	T. longibrachiatum	۴۸/۷۴±۲/۷a	۳۵/۱±۳/۲۷b
	T. harzianum T22	۵۳/۰۱±۳/۴a	۴۶/۳۷±۲/۳۰a
ترکیبات غیر فرار	***T. brevicompactum***	۸۰/۱۶±۵/۰۷a	۷۰/۷۶±۱/۷۹a
	T. longibrachiatum	۴۶/۳۷±۲/۵۵a	۴۷/۴۹±۱/۷۹a
	T. harzianum T22	۲۰/۰۷±۲/۱a	۹/۱۹±۱/۸۵a

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج بررسی تاثیر مواد فرار ترشح شونده‌ی گونه های *Trichoderma* بر روی رشد دو نوع تیپ آمیزشی قارچ *Pm. minimum* نشان داد که در تعامل *T. harzianum* T22 با جدایه‌های *Pm. minimum* با تیپ‌های آمیزشی *MAT1-1* و *MAT1-2* به ترتیب ۳/۴±۵۳/۰۱ و ۲/۳۰±۴۶/۳۷ درصد بازدارندگی بدون وجود اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار در سطح احتمال پنج درصد بود. همچنین در تعامل *T. brevicompactum* با جدایه‌های *Pm. minimum* با تیپ‌های آمیزشی *MAT1-1* و *MAT1-2* به ترتیب ۴/۸۱±۵۲/۱۸ و ۶/۲۳±۴۲/۷۷ درصد بازدارندگی بدون وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بود. ولی در تعامل *T. longibrachiatum* با جدایه‌های *Pm. minimum* با تیپ‌های آمیزشی *MAT1-1* و *MAT1-2* اختلاف معنی داری در میزان بازدارندگی مشاهده گردید و به ترتیب ۲/۷±۴۸/۷۴ و ۳/۲۷±۳۵/۱ درصد بود (جدول ۳).

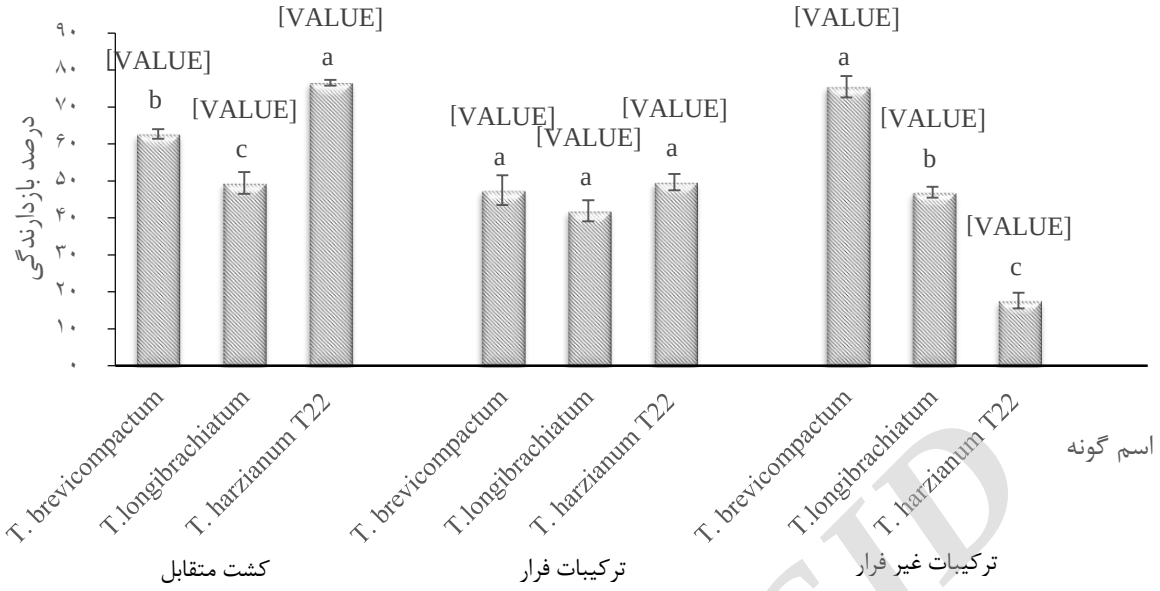
نتایج بررسی تاثیر ترکیبات غیر فرار و آنتی بیوتیک-های ترشح شونده‌ی گونه‌های *Trichoderma* بر روی رشد دو نوع تیپ آمیزشی قارچ بیمارگر نشان داد که در تعامل *T. harzianum* T22 با جدایه‌های *Pm. minimum* با تیپ‌های آمیزشی *MAT1-1* و *MAT1-2* به ترتیب ۲/۱±۲۰/۰۷ و ۱/۸۵±۹/۱۹ درصد بازدارندگی بدون وجود اختلاف معنی‌دار بین دو تیمار در سطح احتمال پنج درصد بود. همچنین در تعامل *T. brevicompactum* با جدایه‌های *Pm. minimum* با تیپ‌های آمیزشی *MAT1-1* و *MAT1-2* به ترتیب ۵/۰۷±۸۰/۱۶ و ۱/۷۹±۷۰/۷۶ درصد بازدارندگی بدون وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بود. در تعامل *T. longibrachiatum* با جدایه‌های *Pm. minimum* با تیپ‌های آمیزشی *MAT1-1* و *MAT1-2* نیز اختلاف معنی داری در میزان بازدارندگی مشاهده نگردید و به ترتیب ۲/۵۵±۴۶/۳۷ و ۱/۷۹±۴۷/۴۹ درصد بازدارندگی بود (جدول ۳).

مقایسه‌ی اثرات کنترل زیستی گونه‌های *Trichoderma*

نتایج مطالعه‌ی پتانسیل قارچ‌های آنتاگونیست در رقابت با چهار جدایه قارچ *Pm. minimum* حاکی از آن بود که هر سه گونه تریکودرما مورد استفاده در این تحقیق و در هر سه روش مورد کاربرد، در مقایسه با شاهد از اثر بازدارندگی رشد معنی‌داری در رقابت با *Pm. minimum* برخوردار بودند. در روش کشت متقابل بیشترین درصد بازدارندگی در تعامل بین جدایه‌های *Pm. minimum* با آنتاگونیست *T. harzianum* T22 به میزان ۷۶/۵۳ درصد (میانگین بازدارندگی تمام چهار جدایه) و کمترین درصد بازدارندگی نیزمربوط به آنتاگونیست *T. longibrachiatum* بود که ۴۹/۴۴ محاسبه گردید و بین گونه‌های تریکودرما از نظر میزان درصد بازدارندگی از رشد بیمارگر اختلاف معنی داری در سطح احتمال پنج درصد وجود داشت (شکل ۵). همچنین نتایج بررسی تاثیر مواد فرار ترشح شونده گونه‌های *Trichoderma* بر روی رشد جدایه های قارچ *Pm. minimum* مورد مطالعه نشان داد که اختلاف معنی-داری در اثرات کنترلی بین سه گونه *Trichoderma* وجود ندارد (شکل ۵). نتایج بررسی تاثیر ترکیبات غیرفرار و آنتی‌بیوتیک‌های ترشح شونده‌ی قارچ آنتاگونیست نشان داد بین سه گونه آنتاگونیست اختلاف معنی‌دار وجود داشته و بیشترین درصد بازدارندگی در تعامل بین جدایه‌های قارچ بیماری‌زا *Pm. minimum* با آنتاگونیست *T. brevicompactum* به میزان ۷۵/۴۶ درصد و کمترین درصد بازدارندگی در تعامل بین جدایه‌های *Pm. minimum* با آنتاگونیست *T. harzianum* T22 به میزان ۱۷/۶۷ درصد بود (شکل ۵).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۵- مقایسه اثرات کنترل زیستی سه گونه‌ی مختلف *Trichoderma* روی میانگین بازدارندگی چهار جدایه *Phaeoacremonium. minimum*

بحث

بیماری نوار برگی انگور یک تهدید جدی برای صنعت انگور در استان آذربایجان شرقی به شمار می‌رود. گونه *Pm. minimum* به عنوان مهمترین گونه دخیل در بیماری برگ نواری انگور در شمال غرب کشور گزارش گردیده است (نرمانی و همکاران ۲۰۱۶). با توجه به هوازاد بودن و خاک‌زاد بودن عامل بیماری و استقرار آن در بافت‌های اوندی، کنترل بیماری با استفاده از روش‌های شیمیایی صرفه اقتصادی نداشته و استفاده از ترکیبات شیمیایی دارای اثرات سوء زیست محیطی می‌باشد. بنابراین استفاده از روش‌های جایگزین در مدیریت بیماری ضروری می باشد. از درختان انگور تاکنون گونه‌های *T. aureoviride* Rifai، *T. harzianum*، *T. koningii* Oudem. و *T. viride* Pers.، *Trichoderma* sp. گزارش شده است (https://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases). گونه *T. longibrachiatum* برای اولین بار از درختچه‌های انگور جداسازی می‌شوند. در ایران گونه *T. longibrachiatum* اخیرا به عنوان درون‌زی از بلوط سیاه (*Quercus macranthera* Fish and Mey.) در جنگل های ارسباران گزارش شده است (قاسمی و همکاران، در حال چاپ).

بررسی اثرات کنترلی متابولیت‌های غیر فرار تولید شده توسط سه گونه آنتاگونیست (*T. harzianum* T22، *T. brevicompactum* و *T.longibrachiatum*) در این تحقیق نشان داد که متابولیت‌های غیر فرار جدایه تجاری *T. harzianum* T22 اثرات کنترلی خیلی کمتری نسبت به دو جدایه دیگر بر رشد *Pm. minimum* دارند. این اثر کنترلی پایین، می‌تواند از کارایی پایین متابولیت‌های تولیدی توسط این گونه و یا عدم تولید یا تولید پایین ترکیبات ضد میکروبی از نظر کمی و کیفی توسط این گونه باشد. ترکیبات غیر فرار گونه *T. brevicompactum* اثرات کنترلی خیلی بالایی بروز دادند که نشان دهنده کارامد بودن ترکیبات غیر فرار تولیدی این گونه در کنترل زیستی می‌باشد. آنتی‌بیوتیک‌های مختلفی از این گونه گزارش گردیده است که می‌توان به Alamethicins F30، trichocryptins B -residue ۱۲ ۱۴، residue trichocryptins A - ۱۱ ۱۲، residue trichobrevins A -B ۱۹۱۱، trichoferins -residue ۱۰ ۶ و trichocompactins -۱۷ ۸ اشاره کرد (دژنکوب و همکاران ۲۰۰۶). متابولیت‌های غیر فرار گونه *T.longibrachiatum* نیز اثرات کنترلی قابل توجهی در مقایسه با گونه *T. harzianum T22* نشان داد ولی در مقایسه با گونه *T. brevicompactum* به طور معنی دار

Archive of SID

www.SID.ir

اثر کنترلی کمتری داشت. گزارش‌های متعددی در مورد فعالیت ضد قارچی متابولیت‌های جداسازی شده از گونه های جنس *Trichoderma* وجود دارد. Koningininها از ترکیبات کمپلکس پایرونی هستند که از گونه‌های *T. harzianum*، *T. koningii* و *T. aureoviride* جداسازی گردیده اند (دانلوپ و همکاران ۱۹۸۹). Koninginin D از رشد برخی از قارچ‌های مهم بیماری‌زای خاک‌زاد مانند *Ph. cinnamomi*، *Fusarium oxysporum* Schltdl، *Rhizoctonia solani* J.G. Kühn، Rands، *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker و *Pythium middletonii* Sparrow ممانعت می‌کند (دانلوپ و همکاران ۱۹۸۹). Harzianopyridone استخراج شده از *T. harzianum* یک متابولیت با فعالیت انتی بیوتیکی بالقوه برعلیه *R. solani*، *Botrytis cinerea* Pers. (دیکینسون و همکاران ۱۹۸۹)، *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) Arx & Olivier var. *graminis* و *P. ultimum* می‌باشد (ویناله و همکاران ۲۰۰۶). Harzianic acid یکی دیگر از ترکیبات استخراجی از استرین‌های گونه *T. harzianum* است که از مشتقات tetramic acid میباشد و دارای فعالیت آنتی بیوتیکی بر علیه *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary، *Pythium irregulare* Buisman و *R. solani* می‌باشد (ویناله و همکاران ۲۰۰۹).

در بررسی اثرات غلظت‌های مختلف ترکیبات غیر فرار و اثر حرارت بر روی این ترکیبات، مشخص گردید در مواردی اثرات کنترلی ترکیبات غیر فرار اتوکلاو شده نسبت به اتوکلاو نشده بیشتر می‌باشد که این می‌تواند به این دلیل باشد که در حالت اتوکلاو نشده متابولیت حرارت داده نمی‌شود و در نتیجه اسپورهای داخل متابولیت تخریب نمی‌شوند و مواد سمی داخل سلول خارج نمی‌شود تا به محیط وارد شود در حالی‌که این مواد در اثر حرارت، خارج شده و به مواد سمی‌تر تبدیل می‌شوند (ارزنلو و همکاران ۲۰۱۴).

در تحقیق حاضر متابولیت‌های فرار گونه های آنتاگونیست (*T. harzianum T22*، *T. brevicompactum* و *T. longibrachiatum*) اثرات کنترلی قابل توجهی روی جدایه های *P. minimum* از خود نشان دادند و از نظر اثرات کنترلی تفاوت معنی داری بین آنها دیده نشد. جدایه‌های *Trichoderma* قادر به تولید انواع ترکیبات ضد میکروبی هستند و از رشد میکروارگانیسم‌های دیگر جلوگیری می‌کنند. بیشتر نژادهای *Trichoderma* تولید متابولیت‌های سمی فرار و غیرفرار می‌کنند که از کلنیزه شدن محیط اطراف خود بوسیله میکروارگانیسم‌های دیگر جلوگیری می‌کند (ویناله و همکاران ۲۰۰۶). در شرایط طبیعی به نظر می‌رسد این شیوه آنتاگونیستی به دلیل تولید مواد بازدارنده با فشار بخار بالا و تبخیر سریع آن‌ها و امکان نفوذ آن در خلل و فرج خاک از اهمیت زیادی در کنترل این عامل بیماری‌زا که زمستان‌گذرانی آن در خاک می‌باشد، برخوردار باشد.

در این تحقیق برای اولین بار اثر انتاگونیستی گونه-های تریکودرما روی جدایه‌های *Pm. minimum* با تیپ‌های آمیزشی متضاد ارزیابی شد. با وجود اینکه اثرات کنترلی گونه های آنتاگونیست روی تیپ آمیزشی *MAT1-1* بیشتر بود ولی این اختلاف معنی دار نبود. به طور جالب توجه فقط متابولیت‌های فرار گونه *T. longibrachiatum* که از روی انگور جداسازی گردیده بود به طور معنی دار اثرات کنترلی بیشتری روی تیپ آمیزشی *MAT1-1* داشت که نشان دهنده حساس بودن تیپ آمیزشی *MAT1-1* به متابولیت‌های فرار تولیدی این گونه است. اخیرا توزیع تیپ‌های آمیزشی این گونه در شمال غرب کشور بررسی گردیده که نشان دهنده‌ی عدم توزیع ۱:۱ تیپ‌های آمیزشی میباشد به گونه ای که توزیع تیپ آمیزشی *MAT1-2* دو برابر *MAT1-1* می باشد (نرمانی و همکاران ۲۰۱۵). عوامل مختلفی ممکن است در توزیع نابرابر تیپ‌های آمیزشی در جمعیت‌های قارچ‌های بیمارگر گیاهی و یا انسانی نقش داشته باشند که از این بین می‌توان به انتخاب وابسته به تیپ آمیزشی در داخل جمعیت، وارد شدن اخیر یک تیپ آمیزشی به منطقه و یا اختلاف در پرآزاری تیپ‌های آمیزشی متفاوت اشاره کرد (میلگروم ۱۹۹۶، تورگوئن ۱۹۹۸، ارزنلو و همکاران ۲۰۱۰).

در حالت کلی نتایج این بررسی نشان داد که گونه *T. brevicompactum* یک آنتاگونیست با قابلیت بالا در بازدارندگی از رشد *Pm. aleophilum* بوده و دارای

Archive of SID

www.SID.ir

ویژگیهایی مناسب برای کنترل زیستی می‌باشد. بنابراین ارزیابی اثر انتاگونیستی این گونه در کنترل بیمارگرهای گیاهی در مراحل مختلف قبل و پس از برداشت و شناسایی دقیق مکانیسم‌های آنتاگونیستی این گونه ضروری می باشد. با توجه به طبیعت درون‌زی جدایه *T. brevicompactum* استفاده شده در این تحقیق، بررسی قابلیت درون‌زی شدن این جدایه در قلمه‌های انگور و کنترل زیستی بیماری برگ نواری انگوردر داخل بافت های میزبان موضوع تحقیق بعدی می باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله مراتب قدردانی خود را از مدیریت محترم دفتر استعدادهای درخشان دانشگاه تبریز به خاطر تامین بودجه لازم برای انجام این تحقیق ابراز می‌دارند.

منابع

رضائی ع، کریمی شهری م، هاشمی م، قزل سفلو ن و دهواری و، ۱۳۹۳. بررسی اثر چند قارچ کش مهم بر روی رشد میسلیوم و جوانه زنی اسپور قارچ های مولد اسکای مو در شرایط آزمایشگاهی. نشریه حفاظت گیاهان (علوم و صنایع کشاورزی) جلد ۲۸ شماره ۲. صفحه‌های ۲۵۴ تا ۲۶۲.

قاسمی س، ارزنلو م، ۱۳۹۵. شناسایی ریخت شناختی و مولکولی گونه‌های تریکودرمای اندوفیت درختان بلوط در جنگل‌های ارسباران. نشریه پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی (زیر چاپ).

Adalat K, Whiting C, Rooney-Latham S and Gubler WD, 2000. Pathogenicity of three species of *Phaeoacremonium* spp. on grapevine in California. Phytopathologia Mediterranea 39: 92-99.

Agustí-Brisach C and Armengol J. 2013. Black-foot disease of grapevine: an update on taxonomy, epidemiology and management strategies. Phytopathologia Mediterranea 52(2): 245.

Arzanlou M, Crous PW and Zwiers LH, 2010. Evolutionary dynamics of mating-type loci of *Mycosphaerella* spp. occurring on banana. Eukaryotic Cell 9: 164-172.

Arzanlou M, Narmani A, Moshari S and Khodaei S, 2013. Pome and stone fruit trees as possible reservoir hosts for *Phaeoacremonium* spp., the causal agents of grapevine esca disease, in Iran. Archives of Phytopathology and Plant Protection 47: 717-727.

Arzanlou M, Khodaei S, Narmani A, Bababi-ahari A and Motallebi Azar A, 2014. Inhibitory effect of *Trichoderma* isolates on growth of *Alternaria alternata*, the causal agent of leaf spot disease on sunflower, under laboratory conditions. Archives of Phytopathology and Plant Protection 47 (13): 1592-1599.

Bae H, Roberts DP, Lim HS, Strem MD, Park SC, Ryu CM, Melnick RL and Bailey BA, 2011. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms. Molecular Plant-Microbe Interactions 24(3):336-51.

Bailey BA, Bae H, Strem MD, Crozier J, Thomas SE, Samuels GJ, Vinyard BT and Holmes KA, 2008. Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biological control potential in *Theobroma cacao*. Biological Control 46(1):24-35.

Bailey BA, Bae H, Strem MD, Roberts DP, Thomas SE, Crozier J, Samuels GJ, Choi IY and Holmes KA, 2006. Fungal and plant gene expression during the colonization of cacao seedlings by endophytic isolates of four *Trichoderma* species. Planta 224(6):1449-64.

Bailey BA and Melnick RL, 2013. The endophytic *Trichoderma*. In: Mukherjee PK, Horwitz BA, Singh US, Mukherjee M, Schmoll M (eds.), *Trichoderma*: biology and applications, 1st edn. CAB International, London, pp. 152-172.

Archive of SID

www.SID.ir

Bertsch C, Ramírez-Suero M, Magnin-Robert M, Larignon P, Chong J, Abou-Mansour E, Spagnolo A, Clément C, and Fontaine F. 2013. Grapevine trunk diseases: complex and still poorly understood. Plant Pathology 62(2): 243-265.

Damm U, Mostert L, Crous PW, and Fourie PH, 2008. Novel *Phaeoacremonium* species associated with necrotic wood of Prunus trees. Persoonia 20: 87-102.

Degenkolb T, Gräfenhan T, Nirenberg HI, Gams W and Brückner H, 2006. *Trichoderma brevicompactum* complex: rich source of novel and recurrent plant-protective polypeptide antibiotics (peptaibiotics). Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 7047-7061.

Dickinson JM, Hanson JR, Hitchcock PB and Claydon N, 1989. Structure and biosynthesis of harzianopyridone, an antifungal metabolite of *Trichoderma harzianum*. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 11: 1885-1897.

Di Marco S, Osti F and Cesari A, 2004. Experiments on the control of Esca by *Trichoderma*. Phytopathologia Mediterranea 43: 108-116.

Di Marco, S. and F. Osti, 2007. Application of *Trichoderma* to prevent *Phaeomoniella chlamydospora* infections in organic nurseries. Phytopathologia mediterranea 46 (1): P.73-83.

Dunlop RW, Simon A, Sivasithamparam K and Ghisalberti EL, 1989. An antibiotic from *Trichoderma koningii* active against soilborne plant pathogens. Journal of Natural Products 52: 67-74.

Edington LV, Khew KL and Barron, 1971. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology 61: 42-44.

Edwards J and Pascoe IG, 2001. Pycnidial state of *Phaeomoniella chlamydospora* found on Pinot noir grapevines in the field. Australian Plant Pathology 30: 67.

Eskalen A, Feliciano AJ and Gubler WD, 2007. Susceptibility of grapevine pruning wounds andsymptom development in response to infection by *Phaeoacremonium aleophilum* and *Phaeomoniella chlamydospora*. Plant Disease 91: 1100-1104.

Essakhi S, Mugnai L, Crous PW, Groenewald JZ and Surico G, 2008. Molecular and phenotypic characterization of novel *Phaeoacremonium* species isolated from esca diseased grapevines. Persoonia 21: 119-134.

Fourie PH, Halleen F, Groenewald M and Crous PW, 2000. Black goo decline of grapevine: Current understanding of this mysterious disease. Winelands 2000: 93-96.

Fourie PH and Halleen F, 2004. Proactive control of Petri disease of grapevine through treatment of propagation material. Plant Disease 88: 1241-1245.

Fourie PH, Halleen F, van der Vyver J and Schreuder W. 2001. Effects of *Trichoderma* treatments on the occurrence of decline pathogens in the roots and rootstocks of nursery grapevines. Phytopathologia Mediterranea 40(3): 473-478.

Grafenhan T, 2006. Epidemiology and biological control of latent grapevine trunk diseases. Ph.D. Thesis, Humboldt-University, Berlin, Germany.

Gramaje D, García-Jiménez J and Armengol J, 2008. Sensitivity of Petri disease pathogens to hot water treatments in vitro. Annals of Applied Biology 153: 95-103.

Gramaje D, Armengol J, Mohammadi H, Banihashemi Z and Mostert L, 2009. Novel *Phaeoacremonium* species associated with Petri disease and esca of grapevine in Iran and Spain. Mycologia 101: 920-929.

Gramaje D and Armengol J. 2011. Fungal trunk pathogens in the grapevine propagation process: potential inoculum sources, detection, identification, and management strategies. Plant Disease 95(9): 1040-1055.

Archive of SID

www.SID.ir

Hanada RE, De Souza JT, Pomella AWV, Hebbar KP, Pereira JO, Ismaiel A and Samuels GJ 2008. *Trichoderma martiale* sp. nov., a new endophyte from sapwood of *Theobroma cacao* and a potential agent of biological control. Mycological Research 112: 1335–1343.

Helander M, Ahlholm J, Sieber TN, Hinneri S and Saikkonen K, 2007. Fragmented environment affects birch leaf endophytes. New Phytologist 175: 547-553.

Jones EE, Hammond S, Blond C, Brown DS and Ridgway HJ. 2014. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and rootstock cultivar on the susceptibility to infection by Ilyonectria species. Phytopathologia Mediterranea 53(3): 582-583.

Kotze C, Van nikerk J, Halleen F, Mostert L and Fourie P, 2011. Evaluation of biocontrol agents for grapevine pruning wound protection against trunk pathogen infection. Phytopathologia Mediterranea 50 (Supplement): S247-S263.

Larignon P and Dubos B, 2000. Preliminary studies on the biology of *Phaeoacremonium.* Phytopathologia Mediterranea 39: 184-189.

Larignon P, Fulchic R, Cere L and Dubos B, 2001. Observation on black dead arm in French vineyards. Phytopathology of Mediterrana 40: S336-S342.

Moller EM, Bahnweg G, Sanderman H and Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies and infected plant tissues. Nucleic Acids Research 20: 6115–6116.

Milgroom M, 1996. Recombination and the multilocus structure of fungal populations. Annual Review of Phytopathology 34: 457-477.

Morton L, 2000. Viticulture and grapevine declines: lessons of black goo. Phytopathologia Mediterranea 39: 59-67.

Mostert L, Groenewald JZ, Summerbell RC, Gams W and Crous PW, 2006. Taxonomy and pathology of *Togninia* (*Diaporthales*) and its *Phaeoacremonium* anamorphs. Studies in Mycology 54: 1-115.

Mugnai L, Graniti A and Surico G, 1999. Esca (black measles) and brown-wood streaking: two old and elusive diseases of grapevines. Plant Disease 83: 404-418.

Nascimento T, Rego C and Oliveira H. 2007. Potential use of chitosan in the control of grapevine trunk diseases. Phytopathologia Mediterranea 46: 218–224.

Narmani A, Arzanlou M and Babai-Ahari A, 2015. Uneven Distribution of Mating-Type Alleles Among *Togninia minima* Isolates, One of the Causal Agents of Leaf Stripe Disease on Grapevines in Northwest Iran. Journal of Phytopathology 164: 441-447.

Parsaeian M, Mirlohi AF, Rezaie AM and Khayam nekoie M, 2007. The effect of endophytic fungi on physiological characteristics and cold tolerance of two species of meadow fescue and tall fescue. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources 10: 197-212.

Petit E and Gubler WD. 2006. Influence of *Glomus intraradices* on black foot disease caused by *Cylindrocarpon macrodidymum* on *Vitis rupestris* under controlled conditions. Plant Disease 90: 1481–1484.

Rooney-Latham S, Eskalen A and Gubler WD, 2001. Recovery of *Phaeomoniella chlamydospora* and *Phaeoacremonium inflatipes* from soil and grapevine tissues. Phytopatholia Mediterranea 40: S351-S356.

Serra S, Mannoni MA and Ligios V, 2007. Preliminary studies on the susceptibility of pruning wounds to contamination with fungi involved in grapevine decline disease in Italy. Phytopathologia Mediterranea 46: 115.

Archive of SID

www.SID.ir

Surico G, Mugnai L, and Marchi G, 2006. Older and more recent observations on esca: a critical overview. Phytopathologia Mediterranea 45: S68-S86.

Turgeon BG, 1998. Application of mating type gene technology to problems in fungal biology. Annual Review of Phytopathology 36: 115-137.

Vinale F, Marra R, Scala F, Ghisalberti EL, Lorito M and Sivasithamparam K, 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. Letters in Applied Microbiology 43: 143-8.

Vinale F, Flematti G, Sivasithamparam K, Lorito M, Marra R, Skelton BW and Ghisalberti EL, 2009. 2009. Harzianic acid, an antifungal and plant growth promoting metabolite from *Trichoderma harzianum*. Journal of Natural Products 72: 2032-2035.

Waite H, Gramaje D, Whitelaw-Weckert M, Torley P and Hardie WJ. 2013. Soaking grapevine cuttings in water: a potential source of cross contamination by micro-organisms. Phytopathologia Mediterranea 52(2): 359-368.

White TJ, Bruns T, Lee S and Taylor J, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pp. 315–322 In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.), PCR Protocols : A guide to Methods and Applications Academic Press, New York, USA.

Yacoub A, Gerbore J, Magnin N, Chambon P, Dufour MC, Corio-Costet MF, Guyoneaud R and Rey P. 2016. Ability of *Pythium oligandrum* strains to protect *Vitis vinifera* against *Phaeomoniella chlamydsopora*, a pathogen involved in Esca, by inducing plant resistance. Biological Control 92: 7-16.

Ziedan EH and Farrag ES, 2011. Application of yeasts as biocontrol agents for controlling foliar diseases on sugar beet plants. Journal of Agricultural Technology 7(6): 1789-1799.

Archive of SID

www.SID.ir

Antagonistic Effect of Endophytic and Commercial *Trichoderma* Isolates on *Phaeoacremonium minimum*, the Causal Agent of Leaf Stripe Disease of Grapevine

A Narmani[1], M Arzanlou[2*] and A Babei Ahari[2]

[1]PhD. Student of Plant Pathology, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultre, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
[2]Professers of Plant Pathology and Mycology, Respectiveley, Department of Plant Protection, Faculty of Agricultre, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
*Coresponding author: **arzanlou@tabrizu.ac.ir**

Received: 28 Janurary 2017 Accepted: 28 November 2017

Abstract

Leaf stripe disease (LSD) of grapevine, which was previously known as esca complex disease, is one of the most important and destructive trunk diseases of grapevines. *Phaeoacremonium minimum* is the principle hyphomycete associated with disease. Chemical control of LSD has proven difficult, meanwhile, application of biological control agents for disease management have been promising. The aim of present study was to evaluate inhibitory potentiol of three *Trichoderma* species sincluding one commercial product (*Trichoderma harzianum* T22) and two endophytic isolates, *T. longibrachiatum* and *T. brevicompactum*, against four isolates of *Pm. minimum* with opposite mating type (two *MAT1-1* and two *MAT1-2* isolates) using dual culture, volatile and non-volatile metabolite assays. The results of this study showed that all three species of the antagonist had significant inhibitory effect on the growth of *Pm. minimum*, in comparison to the control. In dual culture assay, *T. harzianum* T22 showed the highest potential in the inhibition of the *Pm. minimum* growth, with 76.53 percent growth inhibition, in comparison to the two other antagonists. In volatile metabolites assay, significant differences were observed among the antagonists in growth inhibition of the *Pm. minimum*. In non-volatile compounds assay, T. *brevicompactum* with 75.46 percent growth inhibition of pathogen, showed the highest control potential in comparison with the other two species. Non-volatile compounds of *T. longibrachiatum* and *T. harzianum* T22 showed 46.93 and 17.67 percent inhibition on colony growth, respectively. Evaluation of the inhibitory effects of these antagonists on the opposite mating types of *Pm. minimum* showed that volatile compounds of *T. longibrachiatum* were more effective on *MAT1-1* (48.74% growth inhibition) compared to *MAT1-2* (35.10 growth inhibition). Overall, the results of this study reveal *T. brevicompactum* as an effective antagonist against *Pm. minimum*; hence, further evaluation of its biocontrol properties and efficacy in disease control under greenhouse and field condition remain to be studied.

Keywords: Antagonist, Leaf stripe disease, Mating type, Biological control.

Archive of SID

www.SID.ir