ارزیابی جدایه‌های بومی *Trichoderma* spp. در کنترل بیولوژیک قارچ *Botrytis cinerea* عامل بیماری پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی

شهرام نعیمی[۱] و رسول زارع[۲]

۱- آزمایشگاه تحقیقات کنترل بیولوژیک آمل، مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور- تهران

۲- بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه‌ی تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور- تهران

مسئول مکاتبات: پست الکترونیکی: naeimi@iripp.ir

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۷/۰۵ ۲(۲) ۵۵-۷۴ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۵

چکیده

پوسیدگی خاکستری با عامل *Botrytis cinerea* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های توت‌فرنگی در گلخانه، مزرعه و در دوره‌ی پس از برداشت می‌باشد. برای کنترل این بیماری مقدار زیادی از قارچ‌کش‌های مختلف مصرف می‌شود. یکی از راهکارهای جایگزین برای قارچ‌کش‌های شیمیایی، استفاده از عوامل میکروبی مفید می‌باشد. جدایه‌های قارچی جنس *Trichoderma* از میکروارگانیسم‌های غالب میکروفلور خاک بوده و با مکانیسم‌های متنوع، بیمارگرهای گیاهی مختلف را کنترل می‌کنند. در این مطالعه، جدایه‌های بومی تریکودرما از مزارع توت‌فرنگی استان مازندران جداسازی و با روش‌های ریخت‌شناسی و مولکولی شناسایی شدند. پتانسیل جدایه‌های بومی تریکودرما در کنترل *B. cinerea* و بیماری پوسیدگی خاکستری در آزمایشگاه و گلخانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار ارزیابی شد. در آزمایش کشت متقابل، اغلب جدایه‌ها روی پرگنه *B. cinerea* رشد نمودند و در آن‌جا به‌فراوانی تولید اسپور کردند. بیش از ۶۶ درصد از جدایه‌های تریکودرما به‌عنوان آنتاگونیست قوی ارزیابی شدند. به‌استثنای چند جدایه، اغلب جدایه‌های تریکودرما کم و بیش باعث تجزیه (لیز) شدن سختینه‌های بیمارگر شدند. ۴۳/۵ درصد جدایه‌ها به‌طور کامل سختینه‌ها را تجزیه کردند. در آزمون اثر متابولیت‌های فرّار، تعدادی از تیمارها از نظر کاهش رشد بیمارگر با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند و حداکثر میزان ممانعت از رشد میسلیومی بیمارگر توسط جدایه‌های تریکودرما ۵۵ درصد بود. در آزمایش تأثیر عصاره‌ی کشت، تعدادی از تیمارها در دو غلظت (۱ و ۶ میلی‌لیتر) و در دو زمان (۴۸ و ۹۶ ساعت) با یکدیگر اختلاف معنی‌داری نشان دادند و درصد ممانعت از رشد میسلیومی بیمارگر به‌بیش از ۷۱ درصد (غلظت ۵ درصد عصاره‌ی کشت) و ۸۵ درصد (غلظت ۳۰ درصد عصاره‌ی کشت) رسید. نتایج آزمون گلخانه‌ای نشان داد که درصد آلودگی در کلیه‌ی تیمارها در مقایسه با شاهد کاهش یافته است. همچنین مقادیر کمترین و بیشترین درصد آلودگی ۵۳/۵ و ۷۰/۷ درصد بود که به‌ترتیب مربوط به تیمارهای *T. harzianum* MS6-2 و TRICHO-MIX HV بودند.

واژه‌های کلیدی: بیماری کپک خاکستری، تریکودرما، توت‌فرنگی، بیوکنترل

مقدمه

بیش از ۳۰ گونه قارچ روی میوه‌ی توت‌فرنگی ایجاد پوسیدگی می‌کنند که مهم‌ترین آن‌ها قارچ *Botrytis cinerea* Pers.:Fr، عامل پوسیدگی خاکستری (gray mold) یا پوسیدگی بوتریتیسی میوه (Botrytis fruit rot) است. پوسیدگی خاکستری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های توت‌فرنگی در سراسر دنیا است (Hjeljord *et al.*, 2001) و هرجا که توت‌فرنگی کشت می‌شود یک بیماری خطرناک محسوب می‌شود (Wilcox & Seem, 1994). این قارچ، یک بیمارگر

Archive of SID

www.SID.ir

نکروترف همه‌جازی است و پوسیدگی‌های ناشی از آن یکی از شایع‌ترین و گسترده‌ترین بیماری‌های سبزیجات، گیاهان زینتی و میوه‌های گیاهان مختلف، چه در باغ و مزرعه و چه انبار می‌باشد (Rosslenbroich & Stuebler, 2000; Barka *et al*., 2002). با توجه به‌کاربرد متناوب و زیاد قارچ‌کش‌ها، این بیماری دلیل اصلی قرار گرفتن میوه توت‌فرنگی در بین محصولات غذایی پر خطر از لحاظ باقیمانده‌ی آفت‌کش‌های شیمیایی، محسوب می‌شود (Sutton, 1994).

این قارچ، توت‌فرنگی را در تمام سال آلوده می‌کند و گل، برگ و میوه، تحت تأثیر این بیمارگر قرار می‌گیرند. اگرچه گل‌های توت‌فرنگی بیشترین حساسیت را نسبت به‌سایر اندام‌های گیاه نشان می‌دهند، اما علایم بیماری اساساً روی میوه ظاهر می‌شود (Mertely *et al*., 2002). آلودگی روی میوه‌های در حال رشد و در نهایت پوسیدگی آن‌ها معمولاً از گل‌های آلوده ناشی می‌گردد و مخفی ماندن آلودگی گل‌ها، دلیل اصلی ظهور پوسیدگی‌های میوه در انتهای فصل می‌باشد (Boff *et al*., 2002).

قارچ *B. cinerea* به‌صورت میسلیوم و سختینه زمستان‌گذرانی می‌کند و منابع اولیه زادمایه‌ی بیماری عبارتند از برگ‌های مرده، میوه‌های مومیایی شده، مزارع مجاور و علف‌های هرز (Sutton, 1995). بیمارگر ابتدا لکه‌های بزرگ قهوه‌ای رنگ روی میوه‌های توت‌فرنگی ایجاد می‌نماید که تحت شرایط مرطوب (آبِ آزاد) توده‌ی خاکستری رنگی متشکل از میسلیوم‌ها، کنیدیوفور و کنیدی‌های قارچ روی لکه‌ها را می‌پوشاند (Mertely *et al*., 2002). خسارت بیماری وقتی جدی است که در طول دوره‌ی باردهی توت‌فرنگی، شرایط معتدل و مرطوب وجود داشته باشد. تحت شرایط مساعد دمایی (۲۵-۱۵ درجه‌ی سلسیوس) و رطوبتی (رطوبت نسبی بالا و طولانی بودن زمان خیس ماندن اندام‌های هوایی) برای بیمارگر در زمان گل‌دهی و برداشت، زمینه برای گسترش سریع بیماری فراهم شده و کاهش عملکرد محصول به‌بیش از ۵۰ درصد خواهد رسید (Bulger *et al*., 1987). این بیماری علاوه بر خسارتی که در مزرعه ایجاد می‌کند، بعد از برداشت محصول نیز باعث پوسیدگی میوه‌ها در طول دوره‌ی انبار، حمل و نقل و بازار می‌شود و یکی از دلایل کوتاهی عمر انبارداری توت‌فرنگی محسوب می‌شود (Wszelaki & Mitcham, 2003). بنابراین با اضافه کردن خسارت‌های پس از برداشت به‌کاهش محصول پیش از برداشت، جای تعجب نیست که پوسیدگی خاکستری مهم‌ترین بیماری میوه‌ی توت‌فرنگی به‌شمار می‌رود (Mertely *et al*., 2002).

اگرچه روش‌های زراعی نظیر افزایش فاصله‌ی بین بوته‌ها و حذف اندام‌های پیر (منابع زادمایه‌ی بیماری) برای کنترل بیماری پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی استفاده می‌شود ولی تأثیر چندانی در کاهش بیماری ندارند. کاربرد هفتگی قارچ‌کش‌های مختلف، اصلی‌ترین روش کنترل این بیماری است که تا حدودی موفق بوده است (MacKenzie *et al*., 2003). استفاده نادرست از آفت‌کش‌های شیمیایی سبب ایجاد استرین‌های مقاومِ بیمارگر شده است. متأسفانه برای رفع این مشکل، گاهی مقدار بیش‌تری از قارچ‌کش مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین اغلب قارچ‌کش‌ها اثر موقتی دارند و بنابراین طی چندین نوبت به‌کار می‌روند. آفت‌کش‌های شیمیایی باعث آلودگی منابع زیر زمینی، آب‌های سطحی و مواد غذایی شده و آسیب‌های جدی به انسان و سایر موجودات زنده می‌زنند. در ضمن، بعضی از قارچ‌کش‌ها با ممانعت از رشد یا از بین بردن آنتاگونیست‌های بیمارگر، باعث افزایش بیماری می‌شوند (Benitez *et al*., 1998). به‌خاطر مشکلات و مخاطراتی که آفت‌کش‌های شیمیایی برای کشاورزان و محیط زیست ایجاد کرده و می‌کنند، امروزه تأکید زیادی بر کنترل غیر شیمیایی آفات و بیماری‌های گیاهی می‌شود. کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی با استفاده از آنتاگونیست‌ها می‌تواند یک روش جایگزین امیدبخش برای آفت‌کش‌های شیمیایی باشد (Cook & Baker, 1983). مهم‌ترین عوامل میکروبی که بیشترین پتانسیل را در کنترل بیماری‌های ناشی از *B. cinerea* داشته‌اند، شامل

Archive of SID

www.SID.ir

عوامل بیوکنترل قارچی (*Trichoderma* spp.، *Gliocladium roseum*، *Pythium radiosum* B. Paul، *Penicillium* sp. و *Ulocladium* sp.)، باکتریایی (*Serratia marcerscens* Bizio، *Bacillus* spp. و *Pseudomonas* spp.) و مخمرها (متعلق به جنس‌های *Pichia* و *Candida*) بوده است (Barka *et al*., 2002; Li *et al*., 2004; Elad & Stewart, 2004).

جنس *Trichoderma* شامل قارچ‌های همه‌جازی است که در خاک، مواد آلی و چوب‌های در حال تجزیه به‌فراوانی یافت می‌شوند. گونه‌های این جنس، در مناطق جغرافیایی مختلف، از اجزای غالب میکروفلور خاک به‌شمار می‌روند (Kubicek *et al*., 2003). استرین‌های مختلف تریکودرما می‌توانند طیف وسیعی از بیمارگرهای خاک‌زاد و هوازاد را کنترل کنند. موفقیت استرین‌های تریکودرما به‌عنوان عوامل کنترل بیولوژیک مرهون مکانیسم‌های مختلف آنتاگونیستی شامل رقابت (بر سر غذا و زیستگاه)، آنتی‌بیوز (با تولید آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها) و پارازیتیسم می‌شوند (Harman, 2006). همچنین آن‌ها با ایجاد مقاومت القایی در گیاهان به‌صورت غیر مستقیم باعث کنترل بیماری‌های گیاهی می‌گردند (Howell, 2003). به‌دلیل قابلیت‌های بالای استرین‌های تریکودرما، تحقیقات بسیاری در زمینه‌ی کنترل بیولوژیکی بیماری‌های گیاهی، بااستفاده از جدایه‌های مختلف این جنس قارچی صورت گرفته‌است (Benitez *et al*., 2004). همچنین، تریکودرما یکی از مهم‌ترین جنس‌های قارچی است که به‌صورت تجاری در آمده است و سهم بالایی از بازار مربوط به فرآورده‌های بیولوژیک تجاری به آن اختصاص دارد (Verma *et al*., 2007).

استفاده از استرین‌های تریکودرما برای کنترل بیولوژیک قارچ *B. cinerea* اولین بار توسط (Tronsmo & Dennis 1977) به‌منظور کنترل پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی صورت گرفت. این محققان اظهار داشتند که کاربرد چند گونه از تریکودرما در طول دوره‌ی شکوفه‌دهی و میوه‌دهی توت‌فرنگی، بیماری کپک خاکستری را کاهش داد و بهترین جدایه، به‌اندازه‌ی قارچ‌کش دیکلوفلوانید روی کاهش بیماری مؤثر بوده است. Ercole (1985) گزارش داد که تحت شرایط کنترل شده، استرین‌های *T. viride* در مقایسه با قارچ‌کش‌های کاپتان و ونکلوزولین از لحاظ کارآیی در کاهش رشد عامل بیماری برتر بوده‌اند. در تحقیقی دیگر، کنترل پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی و افزایش محصول در اثر به‌کارگیری *T. viride* گزارش شده است (Sesan & Podosu, 1992). در بررسی تأثیر تیمارهای دربردارنده‌ی جدایه‌های *T. harzianum*، *T. hamatum* و *T. langibranchium* به‌صورت جداگانه و توأم در غلظت‌ها و روش‌های مختلف کاربرد، روی بیماری‌های پوسیدگی خاکستری و آنتراکنوز توت‌فرنگی، برخی تیمارها موجب کاهش معنی‌دار بیماری‌های مذکور گردیدند (Freeman *et al.*, 2004). علیزاده، ۱۳۷۴ (Alizadeh, 1995) طی بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در زمینه‌ی اثر چند قارچ‌کش و جدایه‌های آنتاگونیست *T. koningii*، *T. viride* و *T. harzianum* روی کنترل بیولوژیک بیماری کپک خاکستری توت‌فرنگی نشان داد که کاربرد این آنتاگونیست‌ها به‌میزان ۵ تا ۴۲ درصد بیماری را کاهش دادند و در این میان، بیشترین کاهش درصد بیماری توسط جدایه‌ی *T. koningii* موجب شده است. فیضی و همکاران، ۱۳۹۲ (Feyzi *et al*., 2013) توانایی آنتاگونیستی چهار گونه‌ی تریکودرما را علیه *B. cinerea* عامل کپک خاکستری توت‌فرنگی در آزمایشگاه مورد ارزیابی قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند که چهار جدایه‌ی مورد بررسی در روش کشت متقابل و تأثیر متابولیت‌های فرار به‌ترتیب ۷۴-۵۹٪ و ۴۷-۴۰٪ باعث ممانعت از رشد بیمارگر شدند.

در حال حاضر، چندین فرآورده‌ی تجاری حاوی تریکودرما نظیر Binab (با ماده‌ی مؤثره *Trichoderma harzianum* و *T. polysporum* محصول شرکت Binab Bio-Innovation AB)، PlantShield (با ماده‌ی مؤثره *T. harzianum* T22 محصول شرکت Bioworks) و

Archive of SID

www.SID.ir

TRICHODEX (بـا مـاده‌ی مـؤثره *T. harzianum* T39 محصـول شـرکت Makhteshim) بـرای کنتـرل پوسـیدگی خاکستری توت‌فرنگی در گلخانه و انبار در دسترس می‌باشد. این فرآورده‌های تجاری برای استفاده در گلخانه‌ها و نیز پس از برداشت محصول به‌کار می‌روند؛ جایی که شرایط پایدار و کنتـرل شـده‌ی محیطـی، امکـان بـروز فعالیـت آنتاگونیسـتی آفـت‌کـش زیسـتی (biopesticide) را مـی‌دهـد (Elad & Stewart, 2004).

به‌دلیل مصرف بالای قارچ‌کش‌های مختلف برای کنترل بیماری پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی در ایـران بـه‌ویـژه در استان مازندران و مشکلات مربوط به‌وجود باقیمانده‌ی سموم و تهدید سلامت مصرف‌کنندگان، تحقیق در زمینه‌ی شناسایی و به‌کارگیری عوامـل کنتـرل بیولوژیـک ایـن بیمـاری ضـروری است. این پروژه بـا هـدف جداسـازی و شناسـایی جدایـه‌هـای بومی از جنس تریکودرما به‌منظور ارزیـابی کـارآیی آن‌هـا در کنترل *B. cinerea* در آزمایشگاه و گلخانه انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه برداری

از ۱۲ مزرعـه‌ی تـوت‌فرنگـی در اسـتان مازنـدران نمونه‌برداری انجام شد. خاک اطراف ریشه (ریزوسفر) به‌همراه اندام‌های هوایی توت‌فرنگی (برگ، گل و میـوه) جمع‌آوری شدند و به آزمایشگاه منتقل شـدند. نمونـه‌هـای خـاک داخـل کیسـه‌هـای پلاسـتیکی و در دمـای اتـاق (۲۵-۲۰ درجـه‌ی سلسیوس) و اندام‌های هوایی در یخچال با دمای حـدود چهـار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

جداسازی عامل بیماری

بـرای جداسـازی *B. cinerea* میـوه‌هـای آلـوده‌ی توت‌فرنگی در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵درصـد بـه‌مـدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و پس از سه بار آب‌کشی با آب مقطر استریل، به‌قطعات نیم تا یـک سـانتی‌متـری تقسـیم شدند و برای جذب آب اضافی در بـین دو لایـه کاغـذ صـافی استریل قرارگرفتند. قطعات در تشتک‌های پتری حاوی محـیط کشت آب-آگار ۲ درصد کشت داده شدند و در انکوباتور بـا دمای ۲۱ درجـه‌ی سلسـیوس نگهـداری شـدند. قـارچ‌هـای بـا مشخصات جنس *Botrytis* با روش تک اسـپور خـالص‌سـازی شـدند. بـرای شناسـایی *B. cinerea* مشخصـات مورفولوژیـک جدایـه‌هـا بـا توصـیف *Commonwealth Mycological Institute* (CMI) شـماره‌ی ۴۳۱ (Ellis & Walker, 1974) مطابقت داده‌شد.

آزمون اثبات بیماری‌زایی

برای اثبات بیماری‌زایی، برای هر جدایه به‌طور جداگانه، سوسپانسـیون اسـپورهای قـارچ روی میـوه‌هـای تـوت‌فرنگـی سـترون بـا غلظـت 10^6 کنیـدی در میلـی‌لیتـر پاشـیده شـد (Sutton & Peng, 1993). سـپس ظـروف حـاوی میـوه‌هـا به‌مدت پنج روز در ژرمیناتور با دمای ۲۱ درجه‌ی سلسـیوس و تناوب نوری (L/D ۱۲/۱۲) قرار داده شـدند. براسـاس سـرعت رشد و تعداد سختینه‌هـای تشـکیل شـده و نیـز شـدت بیمـاری پوسیدگی خاکستری در گلخانه، بیمـاری‌زاتـرین جدایـه بـرای انجام آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انتخاب شد.

جداسازی *Trichoderma* spp.

الف) جداسازی از خاک:

جدایه‌های تریکودرما به‌روش کشت سری رقـت خـاک (dilution plating) و بـا اسـتفاده از محـیط کشـت انتخـابی مـک‌فـادن و سـاتِن (McFadden & Sutton's RB-S-F) جداسازی شدند. برای تهیه‌ی این محیط، یک گـرم KH_2PO_4، ۰/۵ گـرم $MgSO_4$، پـنج گـرم پپتـون، ۱۰ گـرم گلـوکز، ۱۷ میلی‌گرم رُز بنگال، ۳۰ میلی‌گرم سولفات استرپتومایسین و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب حل شد و پس از سترون کردن در اتـوکلاو، ۰/۲ میلـی‌لیتـر فرمالدهیـد بـه آن اضـافه شـد (Davet & Rouxel, 2000). ده گرم خاک (خشـک شـده در آون) به ۹۰ میلی لیتر آب مقطر سـترون داخـل یـک فلاسـک ارلن مایر اضافه شد و بـه‌مـدت ۲۰ تـا ۳۰ دقیقـه روی دسـتگاه تکان دهنده‌ی (shaker) قرار گرفـت. سـپس ۱۰ میلـی لیتـر از

Archive of SID

www.SID.ir

سوسپانسیون حاصل، به ۹۰ میلی لیتر آب مقطر سترون اضافه و به‌مدت یک دقیقه روی دستگاه تکان دهنده هم زده شد. این عمل به‌منظور رسیدن به‌رقت مناسب تکرار شد. یک میلی‌لیتر از رقت مطلوب، با استفاده از میله‌ی شیشه‌ای L شکل روی سطح محیط کشت انتخابی پخش شد. برای هر رقت سه تکرار در نظر گرفته شد.

ب) جداسازی از گیاه

برای جداسازی قارچ از اندام‌های هوایی، قطعات کوچکی از ساقه و برگ به‌اندازه‌ی یک سانتی‌متر مربع درون فلاسک ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری حاوی آب مقطر سترون به‌علاوه چهار قطره Triton-XR 100 ریخته شد و به‌مدت دو ساعت روی دستگاه تکان دهنده با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفت (Ercole, 1985). پس از تهیه سریال رقت، ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون ایجاد شده روی سطح محیط کشت انتخابی پخش شد. بقیه‌ی مراحل مانند روش جداسازی از خاک بود. تشتک‌های پتری به‌مدت چند روز در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و شرایط تاریکی قرار گرفتند. جدایه‌های تریکودرما رشد یافته در محیط انتخابی با روش تک اسپور، خالص شده و به لوله‌های آزمایش حاوی PDA منتقل شده و در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

شناسایی جدایه‌های تریکودرما در سطح گونه

الف) شناسایی مورفولوژیکی

جدایه‌های تریکودرما در محیط مالت-آگار ۲٪ و نیز PDA کشت شدند (هر دو محیط ساخت کارخانه Merck آلمان). کشت‌های قارچ در محیط مالت آگار ابتدا به‌مدت دو روز درون انکوباتور با دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس و شرایط تاریکی قرارگرفتند و سپس در شرایط دمای اتاق و نور طبیعی (نور غیرمستقیم در آزمایشگاه) نگهداری شدند. برای هرجدایه سه تکرار در نظر گرفته‌شد. رشد خطی جدایه‌ها با اندازه‌گیری قطر پرگنه، چهار روز پس از قرار گرفتن آن‌ها در انکوباتور در دمای ۱±۲۰ درجه‌ی سلسیوس و در شرایط تاریکی در محیط کشت مالت-آگار ۲٪ انجام شد. به‌منظور مشاهدات و اندازه‌گیری‌های میکروسکوپی، پرپاراسیون‌ها در اسید لاکتیک ۲۵٪ و نیز محلول کاتن بلو لاکتوفنل تهیه شدند. از میکروسکوپ نوری اُلیمپوس (مدل CH-2) برای بررسی آن‌ها استفاده شد. برای شناسایی جدایه‌ها در حد گونه، شکل، اندازه و سایر مشخصات مربوط به کنیدیوفور، فیالید، کنیدیوم و کلامیدوسپور (۵۰ عدد از هر کدام) و نیز مشخصات مربوط به ظاهر پرگنه‌ها و میزان رشد آن‌ها ثبت شد. مشخصات مورفولوژیک با کلیدهای شناسایی Bissett (1991 a-b & 1992) و Gams & Bissett (1998) مقایسه شدند.

ب) شناسایی مولکولی

شناسایی گونه‌های تریکودرما با روش‌های کلاسیک که از معیارهای مورفولوژیک استفاده می‌کند، به‌دلیل شباهت صفات مورفولوژیک، دشوار، مبهم و اشتباه آمیز است (Samuels, 2006). برای حل مشکلات مربوط به‌شناسایی جدایه‌های تریکودرما، Druzhinina *et al.* (2005) یک سیستم بارکُد DNA (DNA barcoding) را برای شناسایی دقیق و سریع جدایه‌های تریکودرما براساس توالی‌های نوکلئوتیدی مشخص در منطقه‌ی ITS1 و ITS2 از ژن rDNA ابداع کردند. این روش در قالب برنامه *Trich*OKEY 2.0 و به‌صورت آنلاین در دسترس است (http://www.isth.info/tools/molkey/ index.php). برای شناسایی مولکولی براساس روشی که در گذشته تشریح شده‌است (Naeimi *et al.*, 2010) ناحیه‌ی ITS همه‌ی جدایه‌های تریکودرما تکثیر و تعیین توالی شد و سپس از برنامه‌ی *Trich*OKEY 2 استفاده شد. توالی‌های ITS در بانک ژن ذخیره شدند و به ازای هر توالی، یک شماره‌ی دستیابی (accession number) اخذ شد.

تعیین جمعیت جدایه‌های تریکودرما

برای شمارش پرگنه‌های جدایه‌های تریکودرمای مربوط به‌هر نمونه، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون خاک در رقت‌های

Archive of SID

www.SID.ir

10^{-2} تا 10^{-4} در تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت انتخابی ریخته‌شد. جمعیت جدایه‌ها برای هر نمونه به‌صورت تعداد واحدهای پرگنه ساز در هر گرم خاک (cfu/g) محاسبه شد.

بررسی اثر جدایه‌های تریکودرما روی *B. cinerea* در آزمایشگاه

روش کشت دوطرفه (dual culture technique)

قرص‌هایی از قسمت‌های در حال رشد پرگنه‌های *B. cinerea* و تریکودرما به‌فاصله‌ی ۱/۵ سانتی‌متر از لبه‌ی تشتک‌های پتری نُه سانتی‌متری حاوی محیط کشت PDA، رو به‌روی هم قرار داده شدند. تشتک‌های پتری در انکوباتور با دمای ۲۱ درجه‌ی سلسیوس در تاریکی قرار داده شدند. برای هرجدایه سه تکرار در نظر گرفته شد. در تشتک پتری شاهد فقط قرص میسلیومی بیمارگر قرار داده شد. پس از گذشت پنج روز، درجه‌ی آنتاگونیسم با استفاده از سیستم Bell *et al.* (1982) سنجیده شد. در این سیستم، پنج کلاس برای بیان قدرت آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما در روش کشت متقابل تعیین شده‌است. کلاس ۱= تریکودرما کاملاً روی پرگنه بیمارگر رشد کرده (overgrowth) و تمام سطح محیط کشت داخل تشتک پتری را اشغال می‌کند. کلاس ۲= تریکودرما حداقل دو سوم سطح محیط کشت را اشغال می‌کند. کلاس ۳= تریکودرما و بیمارگر هر یک تقریباً نصف سطح محیط کشت را می‌پوشانند و هیچ‌کدام از این دو، بر دیگری غالب نیست. کلاس ۴= بیمارگر حداقل دو سوم سطح محیط کشت را اشغال می‌کند و به‌نظر می‌رسد که در مقابل پیشروی تریکودرما مقاومت می‌کند. کلاس ۵= بیمارگر کاملاً روی پرگنه تریکودرما رشد کرده و تمام سطح محیط را می‌پوشاند. کشت‌های متقابل به‌مدت نُه روز مورد مشاهده و بازبینی قرار گرفتند. براساس سیستم فوق، جدایه‌ای از تریکودرما «آنتاگونیست» در نظر گرفته‌شد که میانگین نمره آن جدایه، مساوی یا کوچک‌تر از ۲ بود.

بررسی تأثیر تریکودرما در تجزیه‌کردن سختینه‌های *B. Cinerea*

برای تشکیل سختینه، حلقه‌ای از حاشیه‌ی کشت تازه *B. cinerea* در وسط تشتک‌های پتری حاوی PDA کشت داده‌شد. تشتک‌های پتری در دمای ۱۵ درجه‌ی سلسیوس به‌مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. سختینه‌های تشکیل‌شده با پنس استریل به‌ظروف پتری حاوی پرگنه‌های شش روزه جدایه‌های تریکودرما در محیط کشت PDA قرار داده شدند (نُه سختینه در هر تشتک و سه تکرار برای هر جدایه). تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۱ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از یک ماه سختینه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی سطحی شدند و به‌محیط کشت آب-آگار منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت، جوانه‌زنی و رشد میسلیومی آن‌ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد (Köhl & Mukherjee *et al.*, 1999 Schlosser, 1989;). سختینه‌هایی که با فشار، بافتشان متلاشی شده بود، به‌عنوان تجزیه شده در نظر گرفته شد.

بررسی تأثیر متابولیت‌های فرّار تریکودرما در رشد *B. cinerea*

این آزمایش طبق روش Dennis & Webster (1971) انجام شد. قرص‌هایی به‌قطر پنج میلی‌متر از حاشیه‌ی کشت جوان سه روزه تریکودرما و *B. cinerea* به‌طور جداگانه در وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA کشت داده شدند. سپس درهای تشتک‌های پتری مربوط به‌جدایه‌های تریکودرما و بیمارگر تحت شرایط استریل برداشته و تشتک حاوی *B. cinerea* به‌طور وارونه روی تشتک تریکودرما قرار گرفت. در تشتک‌های پتری شاهد، قرصی از محیط کشت PDA جایگزین تریکودرما شد. محل تماس دو تشتک پتری با پارافیلم و نوار چسب به‌خوبی مسدود شد تا ارتباط داخل دو تشتک با محیط خارج کاملاً قطع شود. تشتک‌های پتری در انکوباتور با درجه‌ی حرارت ۲۶ درجه‌ی سلسیوس و شرایط تاریکی قرار داده شدند. درصد ممانعت از رشد بیمارگر توسط جدایه‌های تریکودرما با استفاده از رابطه

Archive of SID

www.SID.ir

A-B/A × 100 محاسبه شد. A قطر پرگنه بیمارگر در شاهد و B قطر پرگنه بیمارگر در تیمار است.

بررسی تأثیر عصاره‌ی کشت (culture filtrate) جدایه‌های تریکودرما در رشد *B. cinerea*

در این آزمایش اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیومی *B. cinrea* مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این آزمایش، محیط مایعی با ترکیب یک گرم $Ca(NO_3)_2$، ۰/۲۵ گرم $MgSO_4, 7H_2O$، ۰/۲۵ گرم KNO_3، ۰/۱۲۵ گرم KH_2PO_4، یک گرم $CaCl_2, 2H_2O$، ۵۰ میلی‌گرم اسید سیتریک و سه گرم ساکاروز در یک لیتر آب مقطر تهیه شد. محیط فوق در فلاسک‌های ارلن مایر ۵۰۰ میلی‌لیتری (هر یک حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر) ریخته شد و پس از سرد شدن محیط، به‌هر یک از فلاسک‌ها، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور جدایه‌های تریکودرما (10^7 اسپور در میلی‌لیتر) اضافه شد. در فلاسک شاهد به‌جای سوسپانسیون اسپور، یک میلی‌لیتر آب مقطر استریل اضافه شد. فلاسک‌های ارلن مایر روی دستگاه شیکر انکوباتور در شرایط ۷۰ rpm و دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس قرار گرفتند. پس از پنج روز که توده‌ی میسلیومی قارچ تشکیل شد، برای افزایش تحریک تولید کیتینازها و گلوکانازها، پِلِت‌های (pellets) قارچ بیمارگر در شرایط استریل به فلاسک‌ها اضافه شد. فلاسک‌ها مجدداً در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. برای تهیه‌ی گلوله (حبه)های میسلیومی *B. cinerea* محیط کشت مایع عصاره‌ی مالت ۲٪ در فلاسک‌های ارلن مایر ۱۰۰ میلی‌لیتری (هر کدام حاوی ۲۰ میلی‌لیتر) ریخته شد. پس از سترون کردن و سرد شدن محیط، به‌هر یک از فلاسک‌ها، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور *B. cinerea* (10^6 اسپور در میلی‌لیتر) اضافه شد. این فلاسک‌ها به‌مدت سه روز در شیکر انکوباتور (در شرایط فوق‌الذکر) نگهداری شدند. پنج روز بعد از اضافه کردن گلوله‌های میسلیومی *B. cinerea* به فلاسک‌های ارلن مایر حاوی تریکودرما، محیط مایع درون هر فلاسک با استفاده از دستگاه پمپ خلاء و صافی میکروبیولوژیک با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرومتر (ساخت کارخانه Millipore) فیلتر شد.

برای بررسی تأثیر عصاره‌ی حاصل از هر یک از جدایه‌های تریکودرما، در داخل لوله‌های آزمایش مقادیر ۱۴ و ۱۹ میلی‌لیتر محیط کشت PDA ریخته شد و پس از سترون کردن در اتوکلاو، در حمام بن ماری ۵۰ درجه‌ی سلسیوس قرار داده شدند. پس از ثابت شدن دمای محیط درون لوله‌ها، با استفاده از پیپت استریل به‌میزان شش و یک میلی‌لیتر از عصاره‌ی هر یک از جدایه‌های تریکودرما به‌محیط PDA درون لوله‌های آزمایش ریخته شد تا حجم آن‌ها به ۲۰ میلی‌لیتر برسد. محتویات لوله‌ها، پس از این‌که به‌خوبی مخلوط شد، در تشتک‌های پتری نُه سانتی‌متری ریخته شد. برای هر غلظت از عصاره سه تکرار در نظر گرفته‌شد. بعد از انعقاد محیط، در وسط هر تشتک، یک قرص پنج میلی‌متری از حاشیه‌ی کشت سه روزه *B. cinerea* قرار داده شد و سپس تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۱ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. قطر رشد میسلیومی بیمارگر پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد. درصد بازداری از رشد میسلیومی *B. cinerea* با استفاده از رابطه‌ی A-B/A × 100 محاسبه شد. A قطر پرگنه بیمارگر در شاهد و B قطر پرگنه بیمارگر در تیمار است.

بررسی تأثیر جدایه‌های انتخابی تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی خاکستری در گلخانه

براساس نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی، جدایه‌های تریکودرما برای ارزیابی تأثیر آن‌ها در کنترل بیماری در گلخانه انتخاب شدند. نشاهای توت‌فرنگی (رقم حساس گیلاسی)، در گلدان‌های پلاستیکی ۳/۵ لیتری با ابعاد ۱۶/۵× ۱۸/۵ سانتی‌متر، حاوی خاک برگ، خاک رس و ماسه منتقل شدند و گلدان‌ها روی سکوهای داخل گلخانه شیشه‌ای نگهداری شدند. دمای گلخانه ۲۸-۲۲ درجه‌ی سلسیوس و رطوبت نسبی ۸۰-۷۵ درصد تنظیم شد. گلدان‌ها هر ۴-۳ روز

Archive of SID

www.SID.ir

آبیاری شدند. بوته‌های توت‌فرنگی در طی مدت نگهداری در گلخانه هیچ آفت‌کش شیمیایی دریافت نکردند.

برای تهیه‌ی سوسپانسیون کنیدی‌های بیمارگر و آنتاگونیست‌ها، ابتدا آن‌ها در محیط SPDA (PDA حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات استرپتومایسین) کشت داده شدند. پس از گذشت دو هفته در دمای اتاق (حدود ۲۵ درجه‌ی سلسیوس) که قارچ‌ها به‌خوبی تولید کنیدی کردند، تشتک‌های پتری با آب مقطر استریل غرقاب شدند و برای جدا شدن اسپورها، سطح محیط به آرامی با میله‌ی شیشه‌ای مالش داده شد. سوسپانسیون به‌دست آمده، از پارچه‌ی ململ استریل عبور داده شد و غلظت مورد نیاز کنیدی‌ها با هموسایتومتر Neubauer Improved (Precicolor, HBG, Germany) تنظیم شد (Hjeljord *et al*., 2001; Wszelaki & Mitcham, 2003). میزان غلظت سوسپانسیون اسپور برای *B. cinerea* و جدایه‌های تریکودرما به‌ترتیب 10^6 و 10^7 کنیدی در میلی‌لیتر تنظیم شد. برای چسبیدن بهتر اسپورها به‌سطح اندام‌های هوایی، Tween 20 (۰/۰۵ درصد) به‌سوسپانسیون اضافه شد. محلول‌پاشی با محلول‌پاش کوچکِ دستی انجام شد.

تأثیر قارچ‌کش بیولوژیک تریکو-میکس اچ. وی (TRICHO-MIX HV) ساخت شرکت فناوران حیات سبز هم در قالب یک تیمار در گلخانه ارزیابی شد. این فرآورده بیولوژیک به‌صورت پودر فرموله شده است و ماده‌ی مؤثره آن *T. harzianum* می‌باشد. پس از دریافت این فرآورده از شرکت مذکور، نسبت به‌تعیین تعداد واحدهای پرگنه‌ساز (cfu) اقدام شد و از سوسپانسیون ۱۰ در هزار آن برای محلول‌پاشی استفاده گردید.

در مرحله‌ی گل‌دهی، ابتدا سوسپانسیون اسپور آنتاگونیست‌ها و فرآورده‌ی تجاری و ۴۸ ساعت بعد، سوسپانسیون اسپور *B. cinerea* روی بوته‌ها محلول‌پاشی شد به‌طوری که کلیه‌ی اندام‌های هوایی (ساقه، برگ و گل) کاملاً خیس شدند. در تیمار شاهد آلوده به‌جای سوسپانسیون اسپور تریکودرما، آب مقطر استریل روی بوته‌ها پاشیده شد. محلول‌پاشی سوسپانسیون اسپور جدایه‌های تریکودرما و فرآورده تجاری طی دو هفته‌ی متوالی تکرار شد (در کل سه بار و به‌فاصله‌ی هفت روز از یکدیگر). چهار روز پس از مایه‌زنی بیمارگر، تعداد گل‌های آلوده (نکروزه) شمارش شدند و ۱۵ روز بعد از مایه‌زنی بیمارگر، میوه‌های رسیده مورد بررسی قرارگرفتند و تعداد میوه‌های دارای علائم پوسیدگی خاکستری ثبت شد. برای تعیین شیوع بیماری (incidence)، تعداد میوه آلوده شمارش گردید و درصد آلودگی محاسبه شد. میوه‌های رسیده‌ی توت‌فرنگی طی چهار هفته‌ی متوالی و هفته‌ای دوبار برداشت شدند و میزان یا شیوع بیماری محاسبه شد. مقادیر مربوط به‌هر هفته با یکدیگر جمع و میانگین گرفته شد. همچنین، ۳۰ عدد میوه‌ی توت‌فرنگی (برای هر تکرار ۱۰ میوه) ظاهراً سالم (بدون علائم بیماری پوسیدگی خاکستری) ابتدا با هیپوکلریت سدیم ضدعفونی سطحی و سپس با آب مقطر سترون، شست و شو شدند و بدون این که با یکدیگر تماس داشته‌باشند داخل ظروف پلاستیکی درپوش‌دار قرار داده شدند و در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس و در تاریکی نگهداری شدند. برای تأمین رطوبت نسبی بالا، کاغذ صافی‌های مرطوب و سترون در کف ظرف قرارداده‌شدند. پس از سه تا چهار روز درصد بیماری برای این میوه‌ها هم محاسبه شد و به‌مقادیر قبلی اضافه گردید (Hjeljord *et al*., 2001).

ارزیابی دینامیک جمعیت

به‌منظور بررسی امکان بقای آنتاگونیست‌ها روی اندام‌های هوایی توت‌فرنگی و دینامیک جمعیت آن‌ها، در زمان‌های ۷، ۱۴، ۲۸ روز بعد از آخرین محلول‌پاشی، قطعات کوچکی از اندام‌های هوایی توت‌فرنگی (برگ) در فلاسک‌های ارلن مایر حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به‌علاوه پنج قطره Tween 20 قرار گرفتند. فلاسک‌ها به‌مدت ۳۰ دقیقه روی دستگاه تکان دهنده با سرعت ۱۸۰ rpm قرارداده شدند. ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل (سری رقت)

Archive of SID

www.SID.ir

به‌تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت انتخابی منتقل شدند و در انکوباتور ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از چند روز تعداد پرگنه‌های تشکیل شده شمارش شدند (Wszelaki & Mitcham, 2003; Freeman *et al*., 2004).

تجزیه و تحلیل‌های آماری

بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای نرمال کردن توزیع داده‌ها در موارد لازم، تبدیل اعداد انجام شد اما در جداول، داده‌های اصلی نمایش داده شده است. داده‌ها با نرم افزار SAS 9.0 آنالیز شدند و گروه بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's multiple range test) صورت گرفت.

نتایج

جداسازی عامل بیماری

شش جدایه‌ی *B. cinerea* از میوه‌های آلوده توت‌فرنگی جداسازی و شناسایی شدند (جدایه‌های K1-1 تا K1-6). همه‌ی جدایه‌ها در میوه‌های توت‌فرنگی ایجاد پوسیدگی کردند و روی آن‌ها اسپورزایی نمودند. جدایه‌های *B. cinerea* همگی مجدداً از میوه‌ها جداسازی شدند. جدایه‌ی K1-2 به‌عنوان بیماری‌زاترین جدایه در همه‌ی آزمایشات این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت. شعاع پرگنه این جدایه پس از چهار روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس و روی محیط کشت PDA، ۵/۴ سانتی‌متر بود. همچنین جدایه‌ی مذکور به‌فراوانی سختینه‌های سیاه‌رنگ و نسبتاً بزرگی تولید کرد (میانگین تعداد سختینه در یک تشتک پتری نُه سانتی‌متری ۱۱۲ عدد) و میانگین شدت بیماری ایجاد شده توسط آن در میوه‌های توت‌فرنگی ۸۵ درصد بود.

جداسازی و شناسایی جدایه‌های تریکودرما

با استفاده از محیط کشت انتخابی، در مجموع ۲۷ جدایه تریکودرما از مزارع توت‌فرنگی استان مازندران به‌دست‌آمد (جدول ۱). جدایه‌های شناسایی شده به چهار گونه‌ی *Trichoderma harzianum*، *T. virens*، *T. hamatum* و *T. atroviride* تعلق داشتند (شماره‌های دستیابی EU821797-EU821780). *T. harzianum* با ۲۰ جدایه (۷۴ درصد از کل جدایه‌ها) گونه‌ی غالب تریکودرما در مزارع توت‌فرنگی مازندران بود. *T. virens* با پنج جدایه در رده‌ی دوم فراوانی قرارداشت.

تعیین جمعیت جدایه‌های تریکودرما

به‌جز از دو نمونه، همه‌ی نمونه‌های خاک مربوط به‌مزارع توت‌فرنگی استان مازندران حاوی پروپاگول‌های تریکودرما بودند و جمعیت $۱-۷ \times ۱۰^{۲}$ cfu/g را تشکیل دادند. از کل نمونه‌های مربوط به‌اندام‌های هوایی، فقط پنج جدایه تریکودرما به‌دست‌آمد که مربوط به‌دو مزرعه بود.

بررسی تأثیر جدایه‌های تریکودرما روی *B. cinerea* در آزمایشگاه

روش کشت دو طرفه (dual-plate technique)

هیچ‌یک از جدایه‌های تریکودرما ایجاد هاله بازدارندگی (inhibition zone) در پرگنه بیمارگر نکردند. اما اغلب جدایه‌ها روی پرگنه *B. cinerea* رشد نمودند (overgrowth) و در آن‌جا به‌فراوانی تولید اسپور کردند. ۲۰/۸ درصد جدایه‌ها در کلاس ۱ آنتاگونیسم (تریکودرما کاملاً روی پرگنه بیمارگر رشد کرده و تمام سطح محیط کشت را اشغال می‌کند) و ۴۵/۸ درصد جدایه‌ها در کلاس ۲ (تریکودرما حداقل دو سوم سطح محیط کشت را اشغال می‌کند) قرار گرفتند (شکل ۱). بنابر این بر اساس این سیستم ۶۶/۶ درصد از جدایه‌های تریکودرما آنتاگونیستِ *B. cinerea* محسوب شدند که ۷۵ درصد آن‌ها از گونه‌ی *T. harzianum* بودند. هیچ‌کدام از جدایه‌های تریکودرما در کلاس‌های ۴ و ۵ قرار نگرفتند. فقط در مورد بعضی از تیمارها (MS5-1، MS8-3، MS8-4، MS11-2 و MS12-4) در داخل تشتک‌های پتری، سختینه‌های بیمارگر تشکیل شد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- جدایه‌های تریکودرمای به‌دست آمده از مزارع توت‌فرنگی استان مازندران.

Table 1- *Trichoderma* isolates obtained from strawberry fields in Mazandaran Province.

Isolate	Habitat	Location	Accession No.*	Isolate	Habitat	Location	Accession No.
T. harzianum MS1-1	Soil	Bahnamir	EU821780	*T. harzianum* MS10-2	Soil	Kiakola	EU821781
T. harzianum MS1-2	Soil	Bahnamir	EU821780	*T. harzianum* MS10-2	Soil	Kiakola	EU821788
T. harzianum MS3-1	Soil	Kiakola	EU821780	*T. harzianum* MS10-3	Soil	Kiakola	EU821780
T. harzianum MS3-2	Soil	Kiakola	EU821780	*T. harzianum* MS10-4	Soil	Babolsar	EU821780
T. harzianum MS3-3	Phyllosphere	Kiakola	EU821780	*T. harzianum* MS12-1	Soil	Babolsar	EU821780
T. harzianum MS5-1	Soil	Amol	EU821787	*T. harzianum* MS12-2	Phyllosphere	Babolsar	EU821780
T. harzianum MS5-2	Phyllosphere	Amol	EU821787	*T. harzianum* MS12-3	Soil	Anarmarz	EU821795
T. harzianum MS6-1	Soil	Jooybar	EU821786	*T. virens* MS7-3	Soil	Kiakola	EU821796
T. harzianum MS6-2	Soil	Jooybar	EU821792	*T. virens* MS8-1	Soil	Kiakola	EU821796
T. harzianum MS6-21	Soil	Jooybar	EU821792	*T. virens* MS8-5	Phyllosphere	Amol	EU821795
T. harzianum MS7-1	Soil	Anarmarz	EU821787	*T. virens* MS5-3	Phyllosphere	Babolsar	EU821795
T. harzianum MS8-2	Soil	Kiakola	EU821790	*T. virens* MS12-4	Soil	Chamestan	EU821798
T. harzianum MS8-3	Soil	Kiakola	EU821790	*T. hamatum* MS11-2	Soil	Chamestan	EU821797
T. harzianum MS8-4	Soil	Kiakola	EU821790				

*از هر گروه توالی‌های یکسان، فقط یکی در بانک ژن ذخیره شد و شماره دستیابی (accession number) مربوطه اخذ گردید.

* Identical GenBank accession numbers indicate that the sequences of the corresponding isolates are identical.

بررسی تأثیر تریکودرما در تجزیه‌کردن سختینه‌های *B. cinerea*

در این آزمایش، ۷۸/۳ درصد جدایه‌های تریکودرما (۱۸ جدایه) کم و بیش باعث تجزیه شدن سختینه‌های بیمارگر شدند (جدول ۲). ۴۳/۵ درصد جدایه‌ها (۱۰ جدایه) کاملاً سختینه‌ها را تجزیه کردند. همچنین ۲۱/۷ درصد جدایه‌ها (پنج جدایه) نتوانستند سختینه‌ها را پارازیت کرده و آن‌ها را تجزیه نمایند.

بررسی متابولیت‌های فرّار تریکودرما در رشد *B. cinerea*

در این آزمون، بر اساس جداول تجزیه واریانس، اثر تیمارها در هر دو زمان ارزیابی در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از روش دانکن نشان داد که تعدادی از تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول ۳). درصد ممانعت از رشد میسلیومی بیمارگر توسط جدایه‌های تریکودرما حداکثر ۵۵ درصد بود. جدایه‌های *T. harzianum* MS1-1 و *T. harzianum* MS6-2 به‌ترتیب با ۳۶/۵ درصد و ۳۳/۶ درصد (پس از ۴۸ ساعت) و ۵۴/۴ و ۵۱/۱ درصد (پس از ۹۶ ساعت) باعث بیش‌ترین کاهش در رشد پرگنه *B. cinerea* گردیدند. جدایه‌های متعلق به‌گونه‌های *T. virens* و *T. hamatum* در این آزمایش چندان موفق نبودند و جدایه *T. atroviride* MS11-1 پس از گذشت ۹۶ ساعت تا حدودی از رشد میسلیومی بیمارگر جلوگیری به‌عمل آورد (۲۷/۷ درصد).

جدول ۲–تأثیر جدایه‌های تریکودرما در تجزیه‌کردن سختینه‌های *B. cinerea* در داخل تشتک‌های پتری.

Table 2- Effect of *Trichoderma* isolates in lysing *B. cinerea* sclerotia in Petri dishes.

Isolate	Degree of lysis	Isolate	Degree of lysis
T. harzianum MS1-1	+++[a]	*T. harzianum* MS10-2	+++
T. harzianum MS1-2	+++	*T. harzianum* MS10-3	++
T. harzianum MS3-1	+	*T. harzianum* MS10-4	+++
T. harzianum MS3-3	+	*T. harzianum* MS12-1	-
T. harzianum MS5-1	-	*T. harzianum* MS12-3	+
T. harzianum MS5-2	-	*T. virens* MS5-3	-
T. harzianum MS6-1	+++	*T. virens* MS7-3	++
T. harzianum MS6-2	+++	*T. virens* MS8-1	+
T. harzianum MS7-1	-	*T. virens* MS12-4	+
T. harzianum MS8-2	++	*T. hamatum* MS11-2	+++
T. harzianum MS8-3	+++	*T. atroviride* MS11-1	+++
T. harzianum MS8-4	+++		

[a] شدت لیز شدن سختینه‌های بیمارگر: شدید (+++)، متوسط (++)، ضعیف (+) و عدم لیز شدن (-).

[a] Degree of lysis of sclerotia: high (+++), moderate (++), weak (+) and no lysis (-).

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی تأثیر عصاره‌ی کشت (culture filtrate) جدایه‌های تریکودرما در رشد *B. cinrea*

براساس جداول تجزیه‌ی واریانس اثر تیمارها در این آزمایش در دو غلظت (۱ و ۶ میلی‌لیتر) و در دو زمان (۴۸ و ۹۶ ساعت) در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار بود. مقایسه‌ی میانگین تیمارها با استفاده از روش دانکن نشان داد که تعدادی از تیمارها با یکدیگر تفاوت معنی‌دار داشتند (جدول ۴). بر خلاف آزمایش قبلی درصد ممانعت از رشد میسلیومی *B. cinerea* توسط جدایه‌های تریکودرما قابل توجه بود به‌طوری که این کاهش به‌بیش از ۷۱ درصد (غلظت یک میلی‌لیتر عصاره‌ی کشت) و ۸۵ درصد (غلظت شش میلی‌لیتر عصاره‌ی کشت) رسید. در آزمایشی که یک میلی‌لیتر عصاره‌ی کشت تریکودرما به‌تشتک‌های پتری اضافه شد (غلظت ۵ درصد) پس از ۹۶ ساعت، جدایه‌های *T. harzianum* MS8-4 و *T. harzianum* MS6-2 هرکدام به‌میزان ۷۱/۴ درصد و جدایه‌های *T. harzianum* MS10-2، *T. virens* MS8-1، *T. harzianum* MS10-4 و *T. harzianum* MSI-I به‌ترتیب به‌میزان ۷۰، ۶۶/۷، ۶۶ و ۶۲/۶ درصد از رشد میسلیومی بیمارگر ممانعت نمودند.

جدول ۳– تأثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیومی *B. cinerea*

Table 3- Effect of volatile metabolites of *Trichoderma* isolates on the growth rate of *B. cinerea.*

Isolate	Growth rate (mm)		Growth inhibition (%)	
	After 48 h	After 96 h	After 48 h	After 96 h
T. harzianum MS1-1	31.33 m	41.00 m	39.74 a	54.44 a
T. harzianum MS1-2	46.33 ghi	81.33 de	10.90 de	9.63 h
T. harzianum MS3-1	50.33 abc	90.00 a	3.21 hi	0.00 l
T. harzianum MS3-3	51.00 abc	90.00 a	1.92 ij	0.00 l
T. harzianum MS5-1	47.67 efgh	73.00 f	8.33 efg	18.89 f
T. harzianum MS5-2	47.33 fgh	83.33 c	8.97 def	7.41 i
T. harzianum MS6-1	43.33 j	48.67 k	16.67 c	45.93 b
T. harzianum MS6-2	33.67 l	43.67 l	35.26 a	51.48 a
T. harzianum MS7-1	48.00 defg	85.33 b	7.69 efg	5.19 j
T. harzianum MS8-2	47.67 efgh	66.67 g	8.33 efg	25.93 e
T. harzianum MS8-3	49.67 bcde	77.00 e	4.49 gh	14.44 g
T. harzianum MS8-4	39.33 k	64.67 h	24.36 b	28.15 e
T. harzianum MS10-2	45 ij	59.33 i	13.46 cd	34.07 d
T. harzianum MS10-3	45.67 hi	60.67 i	12.18 cde	39.52 d
T. harzianum MS10-4	39.33 k	55.67 j	24.36 b	38.15 c
T. harzianum MS12-1	48.00 defg	80.00 d	7.69 efg	11.11 h
T. harzianum MS12-3	46.67 ghi	72.00 f	10.26 de	20.00 f
T. virens MS5-3	47.33 fgh	80.33 d	8.97 def	10.74 h
T. virens MS7-3	49.33 cdef	90.00 a	5.13 fgh	0.00 l
T. virens MS8-5	45.00 ij	71.67 f	13.46 cd	20.37 f
T. virens MS12-4	51.67 ab	90.00 a	0.64 jk	0.00 l
T. hamatum MS11-2	50.00 abcd	88.67 a	3.85 hi	1.48 k
T. atroviride MS11-1	46.33 ghi	64.33 h	10.90 de	28.52 e
Control	52 a	90.00 a	-	-

اعداد، میانگین سه تکرار می‌باشند. میانگین‌های هر ستون که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون دانکن در سطح $P \leq 0.01$ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

Values are the means of three replications. Values within a column followed by different letter(s) are statistically different according to Duncan's multiple range test (P = 0.01).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۴– تأثیر عصاره‌ی کشت جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم *B. cinerea*.

Table 4- Effect of culture filtrate of Trichoderma isolates on the growth rate of *B. cinerea*.

Isolate	Growth inhibition$_1$ (%)[a]		Growth inhibition$_6$ (%)[b]	
	After 48 h	After 96 h	After 48 h	After 96 h
T. harzianum MS1-1	51.14 abc	67.41 ab	63.51 ab	72.77 bc
T. harzianum MS1-2	42.11 abcd	61.16 ab	59.86 b	59.38 d
T. harzianum MS3-1	7.53 ij	4.02 fg	13.87 ij	5.81 j
T. harzianum MS3-3	11.29 hij	7.15 efg	10.23 j	4.02 jk
T. harzianum MS5-1	9.04 ij	10.72 de	14.60 ij	11.16 i
T. harzianum MS5-2	21.06 fg	7.15 efg	11.69 j	10.72 i
T. harzianum MS6-1	40.61 bcd	22.77 c	44.53 cd	26.79 ef
T. harzianum MS6-2	54.14 ab	70.54 a	76.64 a	79.02 ab
T. harzianum MS7-1	30.84 def	18.31 cd	33.58 def	20.54 gh
T. harzianum MS8-2	37.60 cd	51.79 b	51.83 bc	55.81 d
T. harzianum MS8-3	33.09 de	21.88 c	28.47 efgh	32.15 e
T. harzianum MS8-4	57.90 a	69.20 ab	78.10 a	85.71 a
T. harzianum MS10-2	52.64 abc	71.43 a	78.83 a	82.14 ab
T. harzianum MS10-3	43.62 abcd	53.57 ab	51.10 bc	58.04 d
T. harzianum MS10-4	51.14 abc	65.18 ab	64.24 ab	64.29 cd
T. harzianum MS12-1	21.82 efg	8.93 ef	30.66 efg	12.50 i
T. harzianum MS12-3	16.55 gh	6.25 efg	19.71 hi	4.47 jk
T. virens MS5-3	6.78 j	3.13 g	8.77 j	3.13 k
T. virens MS7-3	13.55 ghi	4.47 fg	10.23 j	6.25 j
T. virens MS8-5	53.39 abc	66.07 ab	75.18 a	79.02 ab
T. virens MS12-4	21.82 efg	16.52 cd	24.09 fgh	19.20 h
T. hamatum MS11-2	21.82 efg	7.59 efg	22.63 gh	12.95 i
T. atroviride MS11-1	33.84 de	12.95 de	35.77 de	25.00 fg
Control	-	-	-	-

اعداد، میانگین سه تکرار می‌باشند. میانگین‌های هر ستون که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون دانکن در سطح $P \leq 0.01$ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند. [a, b] به ترتیب یک و شش میلی‌لیتر عصاره کشت.

Values are the means of three replications. Values within a column followed by different letter(s) are statistically different according to Duncan's multiple range test (P = 0.01). [a, b] One and six milliliter of culture filtrate, respectively.

درآزمایش شش میلی‌لیتر عصاره (غلظت ۳۰ درصد) هم پس از ۹۶ ساعت، جدایه‌های *T. harzianum* MS8-4 با ۸۵ درصد باعث بیش‌ترین میزان کاهش رشد گردید. پس از آن، جدایه‌های *T. harzianum* MS10-2، *T. virens* MS8-1 و *T. harzianum* MS6-2 به‌ترتیب با ۸۱/۶، ۷۸/۹ و ۷۷/۵ کاهش، در جایگاه‌های بعدی قرار گرفتند. برخلاف آزمایش تأثیر متابولیت‌های فرار، در این جا حداقل یک جدایه از گونه‌ی *T. virens* مؤثر نشان داد اما کنترل بیماری توسط جدایه‌های *T. atroviride* و *T. hamatum* قابل ملاحظه نبود. لازم به‌ذکر است که با افزایش غلظت عصاره‌ی کشت جدایه‌های تریکودرما در محیط کشت، تأثیر آن‌ها در ممانعت از رشد میسلیومی بیمارگر بیشتر بود.

بررسی اثر جدایه‌های انتخابی تریکودرما در کنترل بیماری پوسیدگی خاکستری در گلخانه

براساس نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی تعداد شش جدایه تریکودرما شامل پنج جدایه‌ی *T. harzianum* (MS1-1، MS6-2، MS8-4، MS10-2 و MS10-4) به‌علاوه‌ی یک جدایه‌ی *T. virens* (MS8-1) برای بررسی تأثیر آن‌ها در کنترل بیماری پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی در گلخانه انتخاب شدند. نتایج تجزیه‌ی واریانس نشان داد که اثر تیمار

Archive of SID

www.SID.ir

در هرچهار هفته ارزیابی در سطح احتمال ۱ درصد معنی‌دار بود. مقایسه‌ی میانگین تیمارها با استفاده از روش دانکن نشان داد که تعدادی از تیمارها با شاهد اختلاف معنی‌دار داشتند (جدول ۵). حداقل درصد میوه‌های آلوده به‌میزان ۵۰ درصد در هفته دوم بعد از آخرین محلول‌پاشی سوسپانسیون اسپور جدایه‌های تریکودرما ثبت گردید. در مجموع جدایه‌های *T. harzianum* MS6-2 و *T. harzianum* MS8-4 با درصدِ میوه‌های آلوده به‌ترتیب به‌میزان ۵۳/۵ درصد و ۵۷/۶ درصد (میانگین چهار هفته متوالی) بهتر از تیمارهای دیگر باعث کاهش میزان بیماری پوسیدگی خاکستری میوه‌ی توت‌فرنگی در گلخانه شدند. حداکثر میزان کنترل بیماری هم بالطبع به‌این دو جدایه (به‌ترتیب با ۲۸/۷۶ و ۲۳/۳۰ درصد) اختصاص داشت.

جدول ۵- تأثیر چند استرین انتخابی تریکودرما و یک قارچ‌کش بیولوژیک تجاری در کنترل پوسیدگی خاکستری میوه‌ی توت‌فرنگی در گلخانه براساس درصد میوه‌های آلوده و درصد کنترل بیماری.

Table 5- Effect of selected *Trichoderma* strains and a commercial biofungicide in controlling gray mold of strawberry in the greenhouse in terms of percentage of infected fruits and disease control.

Treatment	1st week	2nd week	3rd week	4th week	All weeks	Control (%)
T. harzianum MS1-1	63.7 c	58.3 bc	61.3 b	63.3 cd	61.7 d	17.84 bc
T. harzianum MS6-2	55.3 d	50.3 d	53.3 c	55.0 e	53.5 f	28.76 a
T. harzianum MS8-4	60.7 cd	55.0 c	56.0 c	58.7 de	57.6 e	23.30 ab
T. harzianum MS10-2	66.0 bc	61.0 b	62.3 b	67.0 bc	64.1 cd	14.65 cd
T. harzianum MS10-4	72.7 b	69.0 a	72.3 a	68.0 bc	70.3 b	6.39 e
T. virens MS8-1	66.0 bc	61.7 b	68.3 a	69.0 bc	66.3 c	11.72 d
TRICHO-MIX HV	70.3 b	70.3 a	70.0 a	72.0 ab	70.7 b	5.86 e
Control	82.0 a	72.0 a	70.7 a	75.7 a	75.1 a	-

اعداد، میانگین سه تکرار و بیانگر درصد میوه‌های آلوده توت‌فرنگی به بیماری پوسیدگی خاکستری می‌باشند. میانگین‌های هر ستون که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون دانکن در سطح $P \leq 0.01$ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

Values are the means of three replications and indicative of the percentage of infected strawberry fruits. Values within a column followed by different letter (s) are statistically different according to Duncan's multiple range test (P = 0.01).

تعیین دینامیک جمعیت استرین‌های تریکودرما

براساس جداول تجزیه‌ی واریانس اثر تیمار یک و دو هفته پس از محلول‌پاشی آخر به‌ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد معنی‌دار بود اما چهار هفته بعد، اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد. جمعیت همه استرین‌های تریکودرما و نیز استرین موجود در فرآورده تجاری روی سطوح اندام‌های هوایی توت‌فرنگی در طول زمان به‌طور قابل توجهی کاهش پیدا کرد (جدول ۶). یک هفته پس از آخرین محلول‌پاشی، میزان جمعیت از 10^7 به 10^5 کنیدی در میلی‌لیتر تقلیل پیدا کرد و پس از آن، افت جمعیت استرین‌ها در هفته‌های بعد شدت بیش‌تری گرفت. کم‌ترین افت میزان جمعیت مربوط‌به TRICHO-MIX HV، استرین‌های *T. harzianum* MS6-2 و *T. harzianum* MS10-2 (در یک گروه آماری) و بیش‌ترین کاهش جمعیت مربوط به *T. harzianum* MS10-4 و *T. harzianum* MS8-4 می‌باشد. دو هفته بعد، میزان کاهش جمعیت شدت بیشتری یافت که در مورد استرین *T. virens* MS8-1 به‌کمتر از 10^2 رسید. در این زمان، استرین *T. harzianum* MS6-2 و پس از آن TRICHO-MIX HV دارای بیش‌ترین جمعیت بودند (جدول ۶). بالاخره یک ماه

Archive of SID

www.SID.ir

پس از محلول‌پاشی آخر، جمعیت همه تیمارها به‌شدت کاهش پیدا کرد که در مورد دو استرین *T. harzianum* MS8-4 و *T. virens* MS8-1 میزان جمعیت به‌صفر رسید.

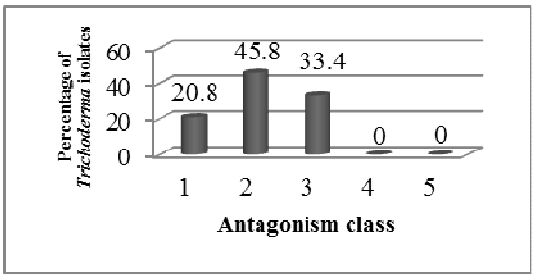
جدول ۶- جمعیت استرین‌های تریکودرما بر حسب تعداد واحدهای پرگنه ساز در هر سانتی‌متر مربع برگ توت‌فرنگی (cfu/cm^2 leaf area) یک، دو و چهار هفته پس از محلول‌پاشی آخر در گلخانه.

Table 6– Population of *Trichoderma* strains (in terms of cfu/cm^2 leaf area) one, two and four weeks after the final spraying in glasshouse.

Treatment	After 1 week ($\times 10^5$)	After 2 weeks ($\times 10^2$)	After 4 weeks ($\times 10$)
T. harzianum MS1-1	1.7 abc	1.3 c	0.3 a
T. harzianum MS6-2	4.3 a	10.7 a	1.3 a
T. harzianum MS8-4	1.0 bc	1.3 c	0.0 a
T. harzianum MS10-2	3.7 a	2.3 bc	1.0 a
T. harzianum MS10-4	0.7 c	3.3 ab	0.7 a
T. virens MS8-1	3.3 ab	0.7 c	0.0 a
TRICHO-MIX HV	4.7 a	5.0 ab	1.7 a

اعداد، میانگین سه تکرار می‌باشند. میانگین‌های هر ستون که با حروف متفاوت نشان داده شده‌اند، بر اساس آزمون دانکن در سطح $P \leq 0.01$ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار دارند.

Values are the means of three replications. Values within a column followed by different letter (s) are statistically different according to Duncan's multiple range test (P = 0.01).



شکل ۱- واکنش آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما علیه *Botrytis cinerea* در آزمون کشت متقابل.

Fig. 1- Antagonistic reactions of *Trichoderma* isolates against *Botrytis cinerea* in dual culture tests.

اگرچه جمعیت استرین *T. harzianum* MS6-2 و TRICHO-MIX HV چهار هفته بعد از آخرین محلول‌پاشی در گلخانه با سرعت کم‌تری رو به کاهش نهاد اما بین استرین‌ها از نظر میزان سیر نزولی جمعیت، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد.

بحث

در این تحقیق از دو روش شناسایی مورفولوژیکی و مولکولی برای شناسایی جدایه‌های تریکودرما استفاده شد. بر اساس منابع، *Trich*OKEY قابلیت بالایی در شناسایی دقیق و درست جدایه‌های تریکودرما در حد گونه داشته است. به‌طوری‌که در سال‌های اخیر، محققین مختلفی در سراسر دنیا از این ابزار جدید شناسایی استفاده کرده‌اند. با کمک این نرم افزار، همه‌ی جدایه‌های به‌دست آمده از مزارع توت‌فرنگی بدون ابهام و با درجه‌ی اطمینان بالا شناسایی شدند. *T. harzianum* فراوان‌ترین گونه‌ی شناسایی شده از مزارع توت‌فرنگی استان مازندران بود. محققین دیگری هم از ایران گزارش کردند که این گونه در میان گونه‌های مورد بررسی، غالب بوده است (Zafari *et al.*, 2002; Naeimi *et al.*, 2010). لازم به‌ذکر است که *T. harzianum* فراوان‌ترین گونه‌ی جنس *Trichoderma* در دنیا محسوب می‌شود (Samuels, 2006).

در پژوهش حاضر، جدایه‌های بومی تریکودرما و یک قارچ‌کش بیولوژیک تجاری ساخت داخل کشور به‌منظور کنترل بیولوژیک بیماری مهم کپک خاکستری توت‌فرنگی مورد ارزیابی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای قرار گرفتند. در آزمون کشت متقابل، درصد قابل توجهی از استرین‌های تریکودرما، آنتاگونیست قوی *B. cinerea* ارزیابی شدند و نیز بیشتر آن‌ها قادر به‌تجزیه کردن سختینه‌های بیمارگر بودند. اما متابولیت‌های فرار این استرین‌ها نتوانستند به‌خوبی از رشد میسلیومی *B. cinerea* جلوگیری نمایند. از طرف دیگر،

Archive of SID

www.SID.ir

متابولیت‌های غیر فرار (شامل آنزیم‌ها و آنتی‌بیوتیک‌ها) با شدت بیشتری از رشد پرگنه قارچ بیمارگر در آزمایشگاه ممانعت به‌عمل آوردند (تا میزان ۸۵٪ با غلظت عصاره ۳۰٪). نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی این تحقیق کم و بیش مشابه‌نتایج پژوهش Alizadeh (995) و Feyzi *et al.* (2013) است. Lugauskas (1961) گزارش کرد که متابولیت‌های فرار *T. viride* باعث توقف کامل رشد میسلیومی *B. cinerea* در آزمایشگاه شدند.

در گلخانه، استرین‌های انتخابی تریکودرما، علی‌رغم نشان دادن فعالیت آنتاگونیستی مطلوب علیه بیمارگر در آزمایشگاه و معنی‌دار بودن آماری تعدادی از تیمارها با یکدیگر و شاهد، هیچ‌کدام باعث کاهش قابل قبول پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی میوه در گلخانه نشدند. هر چند دو استرین بهتر از بقیه بیماری را کنترل کردند ولیکن حداکثر میزان کنترل بیماری حدود ۲۹ درصد بود. نظر به‌این که بیماری به‌سرعت در فاز انبار، حمل و نقل و بازار گسترش می‌یابد، حتی میزان کم بیماری هم می‌تواند مشکل ساز بوده و مطلوب نخواهد بود. این نکته را باید خاطر نشان کرد که بیماری کپک خاکستری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های توت‌فرنگی در دنیا است که کنترل آن همیشه یکی از چالش‌های بزرگ تولیدکنندگان بوده است. بنابراین کنترل قابل قبول بیماری با استفاده از عوامل میکروبی، از جمله اهداف مدیریت بیماری است که نیل به‌آن مستلزم تحقیقات گسترده و همه جانبه است. نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای با نتایج تحقیق Alizadeh (1995) هم‌خوانی دارد که خاطر نشان کرد جدایه‌های تریکودرما به‌میزان حداکثر ۴۵ درصد بیماری کپک خاکستری را در گلخانه کنترل نمودند. اما برخلاف نتایج تحقیق حاضر، Tronsmo & Dennis (1977) گزارش کردند که گونه‌های تریکودرمای مورد تحقیق آن‌ها، بیماری کپک خاکستری را به‌خوبی کنترل نمودند و حتی یک جدایه، از قارچ‌کش شیمیایی دیکلوفلوانید هم مؤثرتر نشان داد. همچنین Ercole (1985) گزارش داد که *T. viride* در مقایسه با قارچ‌کش‌های کاپتان و ونکلوزولین کنترل رضایت بخشی از بیماری ارایه داد. Sesan & Podosu (1992) هم کنترل بیماری توسط جدایه‌ای از همین گونه را گزارش کردند.

اگرچه چندین فرآورده تجاری کنترل بیولوژیک با ماده‌ی مؤثره تریکودرما مانند TRICHODEX، Binab و PlantShield برای کنترل کپک خاکستری توت‌فرنگی در دسترس می‌باشد اما در ایران محصول مشابهی برای این منظور فعلاً وجود ندارد. نتایج این تحقیق هم نشان داد که قارچ‌کش بیولوژیک تجاری (TRICHO-MIX HV) قادر به کنترل بیماری در گلخانه نبوده و حتی از این نظر در وضعیت ضعیف‌تری نسبت به استرین‌های آنتاگونیست بومی قرار داشت. لازم به ذکر است که بر طبق برچسب فرآورده مذکور، بیماری پوسیدگی خاکستری میوه‌ی توت‌فرنگی در لیست بیماری‌های قابل پیشگیری و کنترل آن قرار ندارد.

قدرت بقای یک آنتاگونیست و توانایی سازش آن با میکروارگانیسم‌های دیگر و شرایط محیطی از فاکتورهای مهم یک آنتاگونیست توانا می‌باشد. یکی از دلایل اصلی میزان پایین کنترل بیماری توسط استرین‌های تریکودرما، کاهش چشم‌گیر جمعیت آن‌ها پس از کاربرد در گلخانه (بر اساس نتایج تحقیق حاضر) می‌باشد. با توجه به خاکزی بودن تریکودرما، عدم سازگاری و بقای استرین‌های آنتاگونیست در اندام‌های هوایی بوته‌های توت‌فرنگی غیرطبیعی نیست. بنابراین تهیه یک فرمولاسیون مناسب از مؤثرترین استرین‌ها به‌منظور افزایش بقای آن‌ها می‌تواند موضوع تحقیقات آتی باشد. علاوه بر میزان جمعیت عوامل بیوکنترل میکروبی و بقا و سازگاری آن‌ها، عوامل دیگری هم برای یک کنترل بیولوژیک موفق در شرایط طبیعی لازم است که می‌توان به‌دسترسی به‌مواد غذایی، درجه‌ی حرارت و رطوبت مناسب و کاربرد به‌موقع آنتاگونیست اشاره کرد. همچنین گیاه میزبان و ترکیبات بازدارنده آن و نیز جمعیت و ترکیب میکروارگانیسم‌های محیط نیز ممکن است اثربخشی آنتاگونیست‌های انتخاب شده را تحت تأثیر قرار دهند

Archive of SID

www.SID.ir

Tronsmo & Dennis (1977) (Freeman *et al*., 2004) گزارش کردند که فعالیت آنتاگونیستی عوامل کنترل بیولوژیک در دماهای مختلف، متفاوت است. بنابراین ممکن است درجه‌ی حرارت گلخانه برای جدایه‌های انتخابی تریکودرما در این تحقیق، مناسب نبوده باشد. Hjeljord *et al*. (2000) نامساعد بودن شرایط محیطی (به‌خصوص درجه‌ی حرارت)، کمبود مواد غذایی و وجود ترکیبات بازدارنده را از دلایل اصلی کاهش جوانه‌زنی کنیدی‌های تریکودرما برشمرده‌اند که متعاقباً منجر به کاهش فعالیت بیوکنترلی استرین‌های امیدبخش در محیط‌های طبیعی می‌شود.

براساس نتایج این پژوهش، بعضی از استرین‌های بومی تریکودرما قادر بودند تا ۵۰ درصد میزان بیماری پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی را کاهش دهند. اگرچه این مقدار از کنترل، شاید در مقایسه با قارچ‌کش‌های شیمیایی چندان قابل توجه نباشد. اما با توجه به‌اهمیت این بیماری و حجم بالای سموم مصرفی برای کنترل آن و مخاطرات جدی قارچ‌کش‌های شیمیایی برای محیط زیست و تهدید سلامت غذایی، این استرین‌ها ارزش تحقیقات بیشتر را دارا می‌باشند. لذا مطالعات تکمیلی در زمینه‌ی علل افت شدید جمعیت استرین‌های تریکودرما و کاهش تأثیر آن‌ها در گلخانه، بررسی مکانیسم بیوکنترل، تهیه و تدارک فرمولاسیون‌های مناسب، ارزیابی پتانسیل این جدایه‌ها در کنترل بیماری در فاز پس از برداشت (دوره‌ی انبارداری و حمل و نقل) و بررسی اثر ترکیب این استرین‌ها با یکدیگر یا با سایر عوامل میکروبی (باکتری‌ها و مخمرهای آنتاگونیست) در کنترل بیماری پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی می‌تواند کارآیی عوامل بیوکنترل را بهبود بخشد.

References

Alizadeh, H. 1995. Evaluation of the effect of some fungicides and antagonistic *Trichoderma* on the strawberry gray mold pathogen. M.Sc. thesis in plant pathology, College of Agriculture, University of Tehran. 117 pp.

Barka, E. A., Gognies, S., Nowak, J., Audran, J. & Belarbi, A. 2002. Inhibitory effect of endophyte bacteria on *Botrytis cinerea* and its influence to promote the grapevine growth. Biological Control. 24: 135-142.

Benitez, T., Delgado-Jarana, J., Rincon, A., Key, M. & Limon, M. C. 1998. Biofungicides: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. Recent Research and Developments in Microbiology. 2: 129-150.

Benitez, T., Rincon, A. M., Limon, M. C. & Codon, A. C. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology. 7: 249-260.

Bell, D. K., Wells, H. D. & Markham, C. R. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. Phytopathology. 72: 379-382.

Bissett, J. 1991a. A revision of the genus *Trichoderma*. II. Infrageneric classification. Canadian Journal of Botany. 69: 2357-2372.

Bissett, J. 1991b. A revision of the genus *Trichoderma*. III. Sect. *Pachybasium*. Canadian Journal of Botany. 69: 2373-2417.

Bissett, J. 1992. *Trichoderma atroviride*. Canadian Journal of Botany. 70: 639-641.

Boff, P., Köhl, J., Jansen, M., Horsten, P. J. F. M., Lombaers-van der Plas, C. & Gerlagh, M. 2002. Biological control of gray mold with *Ulocladium atrum* in annual strawberry crops. Plant Disease. 86: 220-224.

Archive of SID

www.SID.ir

Bulger, M. A., Ellis, M. A. & Madden, L. V. 1987. Influence of temperature and wetness duration on infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and disease incidence of fruit originating from infected flowers. Phytopathology. 77: 1225-1230.

Cook, R. J. & Baker, K. F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The APS, St. Paul, Minnesota.

Davet, P. & Rouxel, F. 2000. Detection and Isolation of Soil Fungi. Science Publishers, Inc, USA.

Dennis, C. & Webster, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma.* II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society. 57: 41-48.

Elad, Y. & Stewart, A. 2004. Microbial control of *Botrytis* spp. pp 223-241. In: Elad, Y.; Williamson, B.; Tudzynski, P. & Delen, N. (eds.), *Botrytis:* Biology, Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Ellis, M. B. & Walker, J. M. 1974. *Sclerotinia fuckelina* (conidial state: *Botrytis cinerea*). CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 431, CMI, Kew, Surrey, England.

Ercole, N. 1985. Biological control of gray mold of strawberry by application of *Trichoderma viride.* Review of Plant Pathology. 64: 4416-4422.

Druzhinina, I., Koptchinski, A., Komon, M., Bissett, J., Szakacs, G., & Kubicek, C.P. 2005. An oligonucleotide barcode for species identification in *Trichoderma* and *Hypocrea*. Fungal Genetics and Biology. 42: 813-828.

Feyzi, S., Amini, J., Mirzaii, S., & Roughanian, M. 2013. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of strawberry grey rot. Conference of Biological Control in Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, 27-28 Aug., Karaj, Iran. 140.

Freeman, S., Minz, D., KolesnikBarbul, I., Zreibil, O., Maymon, A., Nitzani, M., Kirshner, Y., Rav-David, B., Bilu, D.A., Dag, A., Shafir, S. & Elad, Y. 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea*, and survival in strawberry. European Journal of Plant Pathology. 110: 361- 370.

Gams, W. & Bissett, J. 1998. Morphology and Identification of *Trichoderma*. pp. 3–34. In: Kubicek, C. P. & Harman, G. E. (eds.), *Trichoderma* and *Gliocladium*. Vol. 1. Basic Biology, Taxonomy and Genetics. Taylor & Francis Ltd., London, p. 3-34.

Harman, G. E. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. Phytopathology. 96: 190-194.

Hjeljord, L. G., Stensvand, A. & Tronsmo, A. 2000. Effect of temperature and nutrient stress on the capacity of commercial *Trichoderma* products to control *Botrytis cinerea* and *Mucor piriformis* in greenhouse strawberries. Biological Control. 19: 149-160.

Hjeljord, L. G., Stensvand, A. & Tronsmo, A. 2001. Antagonism of nutrient-activated conidia of *Trichoderma harzianum* (*atroviride*) P1 against *Botrytis cinerea*. Phytopathology. 91: 1172-1180.

Howell, C. R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease. 87: 4–10.

Köhl, J. & Schlosser, E. 1989. Decay of sclerotia of *Botrytis cinerea* by *Trichoderma* spp. at low temperature. Journal of Phytopathology. 125: 320- 326.

Archive of SID

www.SID.ir

Kubicek, C. P., Bissett, J., Druzhinina, I., Kullnig-Gradinger, C. M. & Szakacs, G. 2003. Genetic and metabolic diversity of *Trichoderma*: a case study on South East Asian isolates. Fungal Genetics and Biology. 38: 310-319.

Li, G.Q., Huang, H. C., Acharya, S. N. & Erickson, R. S. 2004. Biological control of blossom blight of alfalfa caused by *Botrytis cinerea* under environmentally controlled and field conditions. Plant Disease. 88: 1246–1251.

Lugauskas, A. 1961. Fungi of the genus *Trichoderma* from the rhizosphere of fodder plants from some soils of Lithuania and their antagonistic properties. Darbai Lietuvos TSR mokslu Akademijos. 1: 11-21.

MacKenzie, S. J., Xiao, C. L., Mertely, J. C., Chandler, C. K., Martin, F. G. & Legard, D. E. 2003. Uniformity of strawberry yield and incidence of Botrytis fruit rot in an annual production system. Plant Disease. 87: 991-998.

Mertely, J. C., MacKenzie, S. J. & Legard, D. E. 2002. Timing of fungicide applications for *Botrytis cinerea* based on development stage of strawberry flowers and fruit. Plant Disease. 86: 1019-1024.

Mukherjee, P. K., Mukhopadhyay, A. N., Sarmah, D. K. & Shrestha, S. M. 1999. Comparative antagonistic properties of *Gliocladium virens* and *Trichoderma harzianum* on *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* – its relevance to understanding the mechanisms of biocontrol. Journal of Phytopathology. 143: 275-279.

Naeimi, S., Okhovvat, S. M., Javan-Nikkhah, M., Kredics, L. & Khosravi, V. 2010. Frequency and distribution of *Trichoderma* spp. in the paddy rice fields of Mazandaran province, Iran. Iranian Journal of Plant Protection Science. 40: 79-91. (In Persian with English summary).

Rosslenbroich, H. & Stuebler, D. 2000. *Botrytis cinerea*-history of chemical control and novel fungicides for its management. Crop Protection. 19: 557-561.

Samuels, G. J. 2006. *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. Phytopathology. 96: 195-206.

Sesan, T. E. & Podosu, A. 1992. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevine with *Trichoderma* spp. and *Saccharomyces chevalieri*. Bulletin of the Polish Academy of Science: Biological Science.

Sutton, J. C. 1994. Biological control of strawberry diseases. Advances in Strawberry Research.13: 1-12.

Sutton, J. C. 1995. Evaluation of microorganisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. Advances in Plant Pathology 11: 173–190.

Sutton, J.C. & Peng, G.1993. Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. Phytopathology. 83:615-621.

Tronsmo, A. & Dennis, C. 1977. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. Netherlands Journal of Plant Pathology. 83: 449-455.

Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R.Y. & Valero, J.R. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal. 37: 1–20.

Wilcox, W. F. & Seem, R. C. 1994. Relationship between strawberry gray mold incidence, environmental variables, and fungicide applications during different periods of the fruiting season. Phytopathology. 84: 264-270.

Archive of SID

www.SID.ir

Wszelaki, A. L. & Mitcham, E. J. 2003. Effect of combinations of hot water dips, biological control and controlled atmospheres for control of gray mold on harvested strawberries. Postharvest Biology and Technology. 27: 255-264.

Zafari, D., Ershad, D., Zare, R. & Alizadeh, A. 2002. A contribution to the identification of *Trichoderma* species in Iran. Iranian Journal of Plant Pathology. 38: 21-45. (In Persian with English summary).

Archive of SID

www.SID.ir

Evaluation of indigenous *Trichoderma* spp. isolates in biological control of *Botrytis cinerea*, the causal agent of strawberry gray mold disease

Shahram Naeimi[1*] and Rasoul Zare[2]

1- Biological Control Research Laboratory, Department of Biological Control Research, Iranian Research Institute of Plant Protection, Amol, Iran

2- Research Professor, Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Iran

Corresponding author: Shahram Naeimi, email: naeimi@iripp.ir

Received: Sep. 27, 2012 **1 (2) 55-74** **Accepted: Jan. 05, 2013**

Abstract

Gray mold caused by *Botrytis cinerea* is the most important disease of strawberry in the greenhouse and in the field worldwide. The disease is also a serious problem during storage, transit and marketing stages. Nowadays, fungicide application is the most common strategy to control this disease. Consequently, strawberries are among the crops which may be contaminated with pesticide residues. Public concern about such residues in edible products and the environment, augmented by the practical problems arising from fungicide resistance in pathogen, has accelerated the search for the safe and effective alternative disease control strategies. One of the alternative strategies for the replacement of chemical methods could be biological control. *Trichoderma* species are ubiquitous fungi in soil with antagonistic activity against several plant pathogens. This study aimed to evaluate potential of indigenous *Trichoderma* strains against *B. cinerea* in *in vitro* and in the greenhouse. In dual culture tests, the majority of *Trichoderma* strains overgrew on *B. cinerea* colony with a high sporulation. More than 66% of strains were considered to be antagonists against *B. cinerea*. Furthermore, most strains were more or less capable of lysing sclerotia of the pathogen. The volatile metabolites of all *Trichoderma* strains significantly reduced the mycelial growth of the pathogen but, the inhibition rate was not above 55%. Culture filtrates of all strains at two concentrations significantly prevented the mycelial growth with maximum rate of 71% and 85% for 1 and 6 ml concentrations, respectively. The results obtained in the greenhouse experiments showed that disease infection was decreased in all treatments comparing to contro. Meanwhile, lowest and highest disease incidence (53.5 and 70.7%) was recorded for *T. harzianum* MS6-2 and TRICHO-MIX HV, respectively.

Key words: Biocontrol, Fruit, Mazandaran, Iran

Archive of SID

www.SID.ir