کنترل تلفیقی کپک سبز مرکبات با استفاده از *Trichoderma virens* و قارچ‌کش ایمازالیل در شرایط آزمایشگاه و سردخانه

مریم زمانی[۱]، عباس شریفی تهرانی[۲] و مسعود احمدزاده[۳]

چکیده

در این پژوهش از بین ۶ جدایه از *Trichoderma* spp.، اثر بیوکنترلی جدایه *T. virens* T12 که در طی کشت متقابل موفق‌تر از سایرین عمل کرده بود، روی *Penicillium digitatum* به تنهایی و در تلفیق با قارچ‌کش ایمازالیل (۱ پی‌پی‌ام) در مقایسه با کاربرد قارچ‌کش‌های ایمازالیل و تیابندازول به تنهایی (۱۰۰۰ پی‌پی‌ام)، در دو دمای ۱ ±۲۰ و ۱ ± ۴ درجه سانتی‌گراد روی میوه‌ها در شرایط اتاقک رشد و سردخانه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تاثیر قارچ‌کش ایمازالیل در غلظت‌های مختلف روی تریکودرما نشان داد که ایمازالیل در غلظت ۱ در هزار باعث ممانعت از رشد تریکودرما روی محیط کشت PDA می‌گردد. جدایه مذکور در شرایط *in vitro* با تولید متابولیت‌های گازی و ترشحات مایع خارج سلولی نیز از رشد و توسعه بیمارگر جلوگیری به‌عمل آورد. کاربرد جدایه آنتاگونیست به تنهایی (در غلظت 10^8اسپور در میلی‌لیتر) باعث ۸۸ درصد کاهش بیماری در دمای ۱± ۴ درجه سانتی‌گراد (سردخانه) و ۸۲/۸۲ درصد در دمای ۱±۲۰ درجه سانتی-گراد (اتاقک رشد) شد. نتایج حاصله از اثر قارچ‌کش‌ها بر بیمارگر نشان داد که اثر کنترلی قارچ‌کش ایمازالیل در شرایط سردخانه نسبت به قارچ‌کش تیابندازول به‌طور معنی‌داری بیشتر می‌باشد. کاربرد تلفیقی جدایه مذکور (در غلظت $10^7 \times 5$ اسپور در میلی‌لیتر) با قارچ‌کش ایمازالیل (۱ پی‌پی‌ام) اثرات بیوکنترلی آن‌ها را بهبود بخشید و منجر به ۹۴/۸ درصد کاهش در میزان پوسیدگی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد گردید.

کلمات کلیدی: *Trichoderma virens*، *Penicillium digitatum*، کنترل بیولوژیکی. کپک سبز، مرکبات

۱، ۲ و۳. به ترتیب دانشجوی دکترای بیماری‌شناسی گیاهی، استاد و استادیار گروه گیاهپزشکی دانشکده علوم باغبانی و گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران، کرج

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

پرتقال (*Citrus sinensis* (L.) Osbock) گیاهی از خانواده Rutaceae می‌باشد که مشابه سایر جنس‌های این خانواده همیشه سبز بوده و با داشتن ارقام متعدد در مناطق زیادی از دنیا پراکنده شده است و بیش از ۵۰ کشور به کاشت و پرورش آن مشغولند. ایران با تولید ۴/۳ میلیون تن در هر سال و سطح زیر کشت ۲۲۲ هزار هکتار مقام هشتم تولید مرکبات را در بین ۱۰ کشور عمده مرکبات خیز دنیا داراست (آمارنامه جهاد کشاورزی مازندران، ۱۳۸۳). پرتقال پس از سیب دومین میوه پر مصرف در جهان است که همواره در معرض خطر آلودگی به عوامل پوسیدگی پس از برداشت می‌باشد. بیماری‌های پس از برداشت سالیانه منجر به از بین رفتن ۱۰ تا ۳۰ درصد از محصول مرکبات می‌شود (اگریوس، ۲۰۰۵)، که این میزان در کشورهای در حال توسعه که از نظر امکانات سردخانه‌ای در وضعیت مطلوبی به‌سر نمی‌برند، گاهی به بیش از ۵۰ درصد هم می‌رسد (ویلسون و همکاران، ۱۹۹۴). با این حال به‌نظر می‌رسد که برآوردهای فعلی از میزان خسارت بیماری‌های پس از برداشت این محصول که به‌طور عمده ناشی از گونه‌های جنس *Penicillium* می‌باشد تا حد زیادی دور از واقعیت باشد، زیرا هیچ‌کس از زیان‌های فزاینده پس از برداشت مرکبات که در طی عملیات برداشت، فرآوری، انبارداری، حمل و نقل و حتی در قفسه مغازه‌ها و خانه‌ها پیش می‌آید اطلاع دقیقی ندارد (ویلسون و همکاران، ۱۹۹۴).

یکی از رایج‌ترین و پرخسارت‌ترین بیماری‌های پس از برداشت که به انواع مرکبات آسیب می‌رساند، *Penicillium digitatum* (Pers) Sacc. عامل کپک سبز میوه پرتقال است. *P. digitatum* حتی در دماهای پایین و نزدیک به صفر هم فعالیت دارد و گذشته از خسارت پوسیدگی، مایکوتوکسین‌های خطرناکی از جمله پاتولین تولید می‌نماید که به اندام‌های داخلی و سیستم عصبی آسیب رسانده و سرطان‌زا نیز می‌باشند (هیچ و گروندول، ۱۹۹۵). تا به حال قارچ‌کش‌های موثری برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت در میوه‌ها شناخته شده‌اند، اما به‌دلیل ظهور نژادهای مقاوم بیمارگرها به این قارچ‌کش‌ها و نیز اثر سوء این ترکیبات روی سلامت مصرف‌کنندگان و محیط زیست مصرف آن‌ها محدود و ضرورت دستیابی به روش‌های جایگزین برای این ترکیبات را طلب می‌کند (اکرت، ۱۹۹۰). در سال‌های اخیر شیوه مدیریت بیماری‌های پس از برداشت تغییر کرده و سلامت مواد غذایی جزء کلیدی در برنامه‌های کنترلی پس از برداشت قرار گرفته است. از این‌رو کنترل بیولوژیک به عنوان یک راه حل امیدوارکننده در کنترل بیمارگرهای پس از برداشت مطرح شده است و تاثیر و کارایی این روش در کنترل بیماری‌های پس از برداشت هسته‌دارها، دانه‌دارها و مرکبات نیز گزارش شده است (جنشیویکز و جفر، ۱۹۹۷). هر چند آنتاگونیست‌های میکروبی دارای محدودیت‌هایی در شرایط متعدد اکولوژیکی هستند، اما انتظار می‌رود که به عنوان بخش مهمی از شیوه‌های کنترلی چه تنها و چه در تلفیق با سایر روش‌ها باعث کاهش مصرف سموم شوند. گزارش‌های متعددی از استفاده از سویه‌های مختلف باکتری‌ای و قارچ‌های آنتاگونیست در کنترل بیماری‌های پس از برداشت در سیب، هسته‌داران و مرکبات وجود دارد. اباگو و کورستن در سال ۲۰۰۳ با استفاده از استرین‌هایی از باکتری *Bacillus subtilis* توانستند خسارت کپک سبز مرکبات را تا بیش از ۷۰ درصد کاهش دهند. زمانی و همکاران (۱۳۸۷) خسارت کپک سبز مرکبات را با استفاده از استرینی از باکتری *Pantoea agglomerans* به میزان ۸۴/۴ درصد در دمای ۲۰ درجه کاهش دادند. یکی از مهم‌ترین قارچ‌های آنتاگونیست متعلق به جنس *Trichoderma* می‌باشد که اثرات کنترلی آن روی بسیاری از عوامل بیماری‌زا نظیر *Botrytis*، *Rhizoctonia*، *Sclerotinia*، *Pythium* و *Fusarium* روی محصولات زراعی به اثبات رسیده است (باتا، ۱۹۹۹و ۲۰۰۴b). قارچ *T. harzianum* در کنترل برخی از بیماری‌های پس از برداشت نظیر کپک آبی سیب (*Penicillium expansum* Link) موثر تشخیص داده شده است (باتا، ۲۰۰۴a).

Archive of SID

www.SID.ir

هدف از این پژوهش، بررسی کارایی قارچ تریکودرما و قارچ‌کش ایمازالیل به تنهایی و در تلفیق با هم در کنترل بیماری کپک سبز مرکبات است.

مواد و روش‌ها

الف) میوه

میوه‌های مورد استفاده در این پژوهش همه از رقم تامسون و فاقد هرگونه عارضه فیزیولوژیک یا زخم بوده و قبل از هرگونه تیمار شیمیایی مورد استفاده قرار گرفتند.

ب) تهیه زاد مایه قارچ *P. digitatum*

جدایه *P. digitatum* M121 به‌دست آمده از سطح میوه گریپ فروت، که قبلا ازمیان ۷ جدایه دیگر به عنوان مهاجم‌ترین جدایه شناسایی شده بود (زمانی و همکاران، ۱۳۸۷)، برای انجام آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. به کشت‌های یک هفته‌ای قارچ *P. digitatum* روی محیط کشت PDA ، نگهداری شده در دمای ۲۰ درجه، ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد تریتون X-۱۰۰ افزوده شد و سطح تشتک پتری به کمک یک لوله خمیده شیشه‌ای سترون تراشیده شده و سوسپانسیون حاصله از پارچه ململ ۴ لایه سترون جهت جدا کردن میسلیوم‌های همراه و کنیدیوفورها عبور داده شد. میزان اسپور در سوسپانسیون حاصله به کمک هماسیتومتر یا توسط اسپکتروفتومتر با جذب ۰/۱ در ۴۲۵ نانومتر به غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر رسید که این غلظت حالت معمول و توصیه شده در آزمایش‌های پس از برداشت است (اوباگو و کورستن، ۲۰۰۳).

ج) آماده سازی قارچ آنتاگونیست

در این آزمایش از ۶ جدایه آنتاگونیست که نام و محل جداسازی آن‌ها در جدول ۱ آمده است، استفاده گردید. با افزودن آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد تریتون X-۱۰۰ به کشت ۱۰ روزه جدایه‌ها روی محیط کشت PDA، غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر از جدایه‌های تریکودرما در حجم کلی ۶ لیتر آماده گردید.

جدول ۱: نام و منابع جداسازی جدایه‌های آنتاگونیست

جدایه‌های آنتاگونیست	محل جداسازی
Trichoderma sp. TR12	خاک مزرعه لوبیا. محمدشهر کرج
Trichoderma sp. TE	جداشده از سطح شاخ و برگ درختان آنشو. نشتارود
Trichoderma sp. TR	جدا شده از سطح شاخ و برگ درختان لیموشیرین. عیسی خندق
Trichoderma sp. TS12	خاک مزرعه کلم. محمدشهر کرج
Trichoderma sp. TH3	خاک مزرعه سیب زمینی. ورامین
Trichoderma sp. T12	خاک باغ مرکبات. تنکابن

د) انتخاب جدایه آنتاگونیست

جدایه‌های تریکودرما با بررسی سرعت رشد، قدرت کلونیزاسیون و اسپورزایی آن‌ها روی پرگنه بیمارگر در شرایط آزمایشگاه (از طریق کشت متقابل و کشت جدایه‌های تریکودرما در حاشیه پرگنه پنیسیلیوم) مورد مقایسه قرار گرفتند و در نهایت یک جدایه برای انجام آزمایش‌های نهایی انتخاب شد. کشت متقابل قارچ بیمارگر و هر یک از جدایه‌های آنتاگونیست به روش سیواکومار و همکاران (۲۰۰۰) صورت گرفت. برای کشت جدایه‌های تریکودرما در حاشیه پرگنه بیمارگر، از کشت یک هفته‌ای قارچ *P. Digitatum* درون آب مقطر سترون سوسپانسیون اسپور تهیه گردید. در حدود یک میلی‌لیتر از این سوسپانسیون به درون ارلن‌مایرهای حاوی محیط PDA اتوکلاو شده دارای دمای ۴۰ درجه اضافه گردید، به نحوی که غلظت نهایی، 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر محیط کشت باشد. در آخر پس از ریختن

Archive of SID

www.SID.ir

محیط حاصله درون تشتک‌های پتری و منعقد شدن آن و نگهداری در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت، حلقه‌ای به قطر ۸ میلی‌متر از کشت ۴ روزه جدایه‌های تریکودرما، در حاشیه تشتک‌های پتری محیط کشت PDA حاوی اسپورهای *P. digitatum* کشت داده شد. با بازدید روزانه تشتک‌ها توانایی جدایه‌های مختلف آنتاگونیست از نظر میزان رشد میسلیومی، سرعت پیشروی روی پرگنه بیمارگر و اسپورزایی روی آن مورد بررسی قرار گرفتند.

ر) بررسی غلظت‌های مختلف قارچ‌کش‌های ایمازالیل و تیابندازول روی رشد *P. digitatum*

اثر بازدارندگی دو قارچ‌کش ایمازالیل و تیابندازول روی قارچ عامل بیماری با به‌دست آوردن غلظت موثره ۵۰ درصد آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت. رقت‌های 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}، 10^{-5}، 10^{-6} از هریک از قارچ‌کش‌ها تهیه گردید و برای هر کدام از رقت‌ها، سه لوله آزمایش حاوی ۱۸ میلی‌لیتر از محیط کشت H25 حاوی ۴۰ گرم PDA، ۲ گرم نئوپپتون، ۲ گرم عصاره مخمر در حجم نهایی ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آماده و اتوکلاو گردید و در نهایت با افزودن ۲ میلی‌لیتر از هرکدام از رقت‌های قارچ‌کش غلظت‌های مختلف قارچ‌کش در محیط کشت به‌دست آمد. مخلوط‌های به‌دست آمده پس از به هم زدن به تشتک‌های پتری انتقال یافت و متعاقبا حلقه‌هایی به قطر ۸ میلی‌متر از قارچ بیمارگر روی آن‌ها کشت گردید و پس از نگهداری به مدت ۱ هفته در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، قطر پرگنه‌ها اندازه گیری شد و آزمایش با ۵ تیمار در سه تکرار، در قالب طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه آماری قرار گرفت (هولمز و اکرت، ۱۹۹۹).

ز) بررسی تاثیر قارچ‌کش ایمازالیل در جلوگیری از رشد جدایه تریکودرما در شرایط آزمایشگاه

این آزمایش دقیقا مشابه آزمایش قبلی و به منظور تعیین غلظت‌های کم تاثیر یا بی‌تاثیر قارچ‌کش ایمازالیل و نیز بررسی میزان تحمل جدایه آنتاگونیست T12 نسبت به این قارچ‌کش و انتخاب غلظت مناسب برای انجام آزمایش‌های تلفیقی صورت گرفت.

س) بررسی اثر جدایه تریکودرما به تنهایی یا در تلفیق با قارچ‌کش ایمازالیل و تیابندازول به تنهایی در کنترل *P. digitatum* در دمای اتاق (۱°C±۲۰) و شرایط سردخانه (۱°C ± ۴)

در بررسی اثر تلفیق قارچ‌کش ایمازالیل با جدایه T12، از سوسپانسیون حاوی 5×10^{7} اسپور جدایه تریکودرما در هر میلی‌لیتر آب مقطر و غلظت 5×10^{-5} از ماده موثره ایمازالیل استفاده شد. میوه‌های آلوده شده به *P. digitatum* پس از گذشت ۲۴ ساعت به مدت ۱ دقیقه درتیمارهای: ۱) سوسپانسیون جدایه آنتاگونیست با غلظت 10^{8} اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون، ۲) محلول ایمازالیل با غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام، ۳) سوسپانسیون حاوی 5×10^{7} اسپور جدایه تریکودرما در هر میلی‌لیتر آب مقطر سترون و غلظت ۱ پی‌پی‌ام ایمازالیل، ۴) تیابندازول با غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام غوطه‌ور گردیدند و تیمار شاهد در دو شکل: ۱- میوه‌های بدون آلودگی و غوطه‌ور شده در آب مقطر سترون (شاهد سالم) ۲- میوه‌های آلوده شده با بیمارگر و غوطه‌ور شده در آب (شاهد آلوده) مورد بررسی قرار گرفت. میوه‌ها در سردخانه تنظیم شده روی دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد و اتاق رشد تنظیم شده روی دمای ۱± ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری، و تعداد میوه‌های آلوده تا ۴ هفته، هر هفته یک‌بار شمارش شدند. برای هر تیمار ۳ تکرار و هر تکرار، ۱۵ میوه در نظر گرفته شد و داده‌ها در قالب طرح بلوک کامل تصادفی مورد تجزیه آماری قرار گرفت.

ش) بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. digitatum* در شرایط آزمایشگاه

بررسی جدایه تریکودرما از نظر تولید و ترشح مایع خارج سلولی به روش ابالوا و اوتی (۲۰۰۷) با کمی تغییرات صورت گرفت. محیطی محتوی (۱ گرم $Ca(NO_3)_2$ ۰/۲۵۰ گرم $MgSO_4.7H_2O$، ۰/۲۵ گرم KNO_3، ۰/۱۲۵ گرم KH_2PO_4، ۱ گرم $CaCl_2$، ۵۰ میلی‌گرم Citric acid، ۳ گرم ساکاروز در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) تهیه گردید. در شرایط سترون به ارلن‌های محتوی ۵۰۰ میلی‌لیتر از محیط کشت ذکر

Archive of SID

www.SID.ir

شده، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور جدایه آنتاگونیست با غلظت ۲×۱۰^{۸} اسپور در هر میلی‌لیتر اضافه، و به ارلن شاهد به جای اسپور قارچ آنتاگونیست ۱ میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه گردید. ارلن‌ها پس ۸ روز نگهداری روی شیکر با ۷۰ تکان در دقیقه در محیط آزمایشگاه، جداگانه توسط پمپ خلا و صافی‌های میکروبیولوژیک با قطر روزنه ۰/۲۲ میکرون (ساخت کارخانه میلی‌پور) فیلتر گردیدند و عصاره حاصل از جدایه مذکور در غلظت نهایی ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد برای جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ بیمارگر به‌کار برده شدند. داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی مورد تجزیه آماری قرار گرفتند.

ص) بررسی اثر متابولیت‌های فرار تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *P. digitatum* در شرایط آزمایشگاه

به روش مامپونی و همکاران (۱۹۹۸) صورت گرفت. در این آزمایش حلقه‌هایی به قطر ۸ میلی‌متر از *P. digitatum* در تشتک‌های محتوی محیط کشت PDA کشت داده شدند و در مرحله اول پس از گذشت ۲۴ ساعت و در مرحله دوم پس از گذشت ۷۲ ساعت، حلقه‌هایی به قطر ۸ میلی‌متر از جدایه تریکودرما روی PDA کشت داده شدند و سپس در شرایط سترون درهای پتری‌های حاوی بیمارگر و جدایه تریکودرما برداشته و پتری حاوی پنیسیلیوم به صورت وارونه روی پتری حاوی آنتاگونیست قرار گرفت و دور تشتک‌ها به‌وسیله پارافیلم کاملا مسدود گردید. تشتک‌ها به دمای ۲۷ درجه انتقال داده شد و اندازه‌گیری قطر حلقه رشدی بیمارگر در نوبت به فواصل ۴۸، ۹۶، ۱۲۰ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت صورت گرفت. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام و داده‌ها (درصد ممانعت از رشد پرگنه بیمارگر) مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

م) تجزیه داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده-های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار آماری SAS (V6.12) انجام گردید. میانگین داده‌ها بر حسب ضرورت با استفاده از آزمون دانکن در سطح یک یا ۵ درصد و آزمون t-student مقایسه شدند. از نرم‌افزار POLO-PC برای تجزیه پروبیت و برآورد غلظت‌های موثر ۵۰ درصد استفاده شد.

نتایج

الف) انتخاب جدایه آنتاگونیست

تمام جدایه‌های تریکودرمای مورد بررسی ضمن رشد و برخورد با میسلیوهای بیمارگر مانع رشد و توسعه آن شده و سپس شروع به پیشروی، کلونیزاسیون و اسپورزایی روی هیف‌های *P. digitatum* نمودند. سرعت رشد، پیشروی و کلونیزاسیون و اسپورزایی جدایه‌های تریکودرما با هم متفاوت بود و در نهایت جدایه *T. virens* T12 که در آزمایشگاه موفق‌تر از سایرین عمل کرد، برای انجام آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

ب) بررسی اثر قارچ‌کش‌های ایمازالیل و تیابندازول در ممانعت از رشد میسلیومی *P. digitatum* در شرایط آزمایشگاه

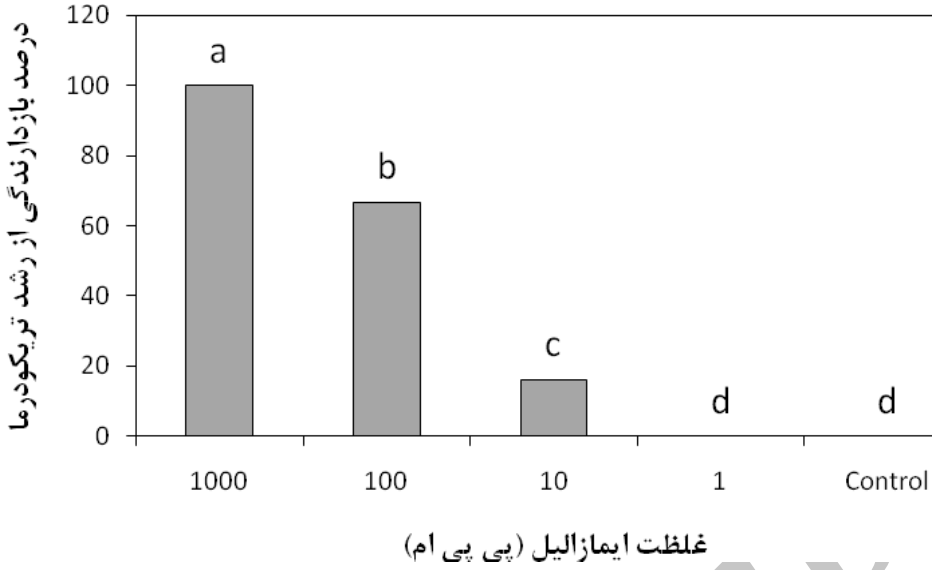
نتایج حاصل از داده‌های زیست‌سنجی تعیین غلظت موثر بازدارندگی ۵۰ درصد (EC_{50}) نشان داد که ایمازالیل با EC_{50} برابر با ۷/۷۱ پی‌پی‌ام با تیابندازول با EC_{50} برابر با ۹۴۳/۹۸ اختلاف معنی‌داری در سطح ۱ درصد نشان داد. بنابراین همچنان که از مقادیر غلظت موثر بازدارندگی ۵۰ درصد مشخص می‌شود، برای ممانعت از رشد قارچ در شرایط آزمایشگاه به مقدار ماده موثر ایمازالیل بسیار کمتری (بیش از ۱۲۰ برابر کمتر) در مقایسه با تیابندازول نیاز بود، لذا قارچ‌کش ایمازالیل به عنوان ترکیب موثرتر در ادامه آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

ص) بررسی تاثیر قارچ‌کش‌های ایمازالیل در جلوگیری از رشد جدایه تریکودرما در شرایط آزمایشگاه

نتایج نشان داد که قارچ‌کش ایمازالیل در غلظت توصیه شده (۱۰۰۰ پی‌پی‌ام)، از رشد جدایه آنتاگونیست قارچی صددرصد ممانعت به‌عمل می‌آورد و طبق نتایج حاصل، غلظت نهایی ۱ پی‌پی‌ام از ایمازالیل برای انجام آزمایش‌های بعدی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۳).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱: اثر غلظت‌های مختلف قارچ‌کش ایمازالیل در جلوگیری از رشد میسلیومی جدایه تریکودرما پس از یک هفته نگهداری در شرایط آزمایشگاه

ت) بررسی اثر جدایه تریکودرما به تنهایی یا در تلفیق با قارچ‌کش ایمازالیل در کنترل *P. digitatum* در دمای اتاق (۲۰ ± ۱°C) وشرایط سردخانه (۴ ± ۱ °C)

در بررسی‌های صورت گرفته درباره مقایسه اثر کاربرد جدایه آنتاگونیست در غلظت 10^{8} اسپور در هر میلی‌لیتر با کاربرد ایمازالیل در غلظت توصیه شده 10^{-3}، بین تیمارها اختلاف معنی‌دار در دمای سردخانه وجود داشت. با کاربرد توام قارچ‌کش و جدایه آنتاگونیست، میزان کنترل در مقایسه با کاربرد جدایه به تنهایی افزایش یافت (جدول۴).

جدول ۴: بررسی اثر تلفیقی جدایه تریکودرما و قارچ‌کش ایمازالیل درکنترل کپک سبز پرتقال پس از ۴ هفته نگهداری در دمای اتاق و سردخانه

تیمار	درصد میوه‌های سالم* و گروه‌بندی آن‌ها**	
	۴ ± ۱ °C	۲۰ ± ۱ °C
T12 (10^{8} اسپور در میلی‌لیتر)	۸۸b	۸۲/۸۲ab
ایمازالیل (۱۰۰۰پی‌پی‌ام)	۹۵/۵a	۸۷/۲۵a
T12 (10^{7} ×۵ اسپور در میلی‌لیتر) + ایمازالیل (۱پی پی ام)	۹۴/۸a	۸۶/۶۶a
تیابندازول (۱۰۰۰ پی‌پی‌ام)	۶۶/۷c	۸۴/۲۵a
شاهد غیر آلوده	۸۶/۶b	۷۷/۹b
شاهد آلوده	۰d	۰c

* برای هر تیمار سه تکرار، هر تکرار شامل ۱۵ میوه در نظر گرفته شد، میوه‌های سالم تا ۴ هفته، هر هفته یکبار شمارش گردید. ** تیمارها در سطح ۵ درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. مقایسه میانگین‌ها توسط ازمون دانکن صورت گرفته است.

Archive of SID

www.SID.ir

ش) بررسی اثر ترشحات مایع خارج سلولی جدایه تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم *P. digitatum* در شرایط آزمایشگاه

در گروه‌بندی بر اساس غلظت‌ها، بین همه غلظت‌ها (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ درصد) اختلاف معنی‌دار در سطح یک درصد وجود داشت و میزان بازدارندگی با افزایش غلظت افزایش یافت و بهترین نتیجه در غلظت ۳۰ درصد با ۳۴/۷ درصد کاهش در رشد میسلیوم بیمارگر مشاهده شد.

ص) بررسی اثر متابولیت‌های فرار تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *P. digitatum* در شرایط آزمایشگاه

در هر دو مرحله بین تیمارها در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت (جدول ۶).

جدول ۶: تاثیر متابولیت‌های فرار تریکودرما در جلوگیری از رشد قارچ *P. digitatum* پس از ۶ روز*

تیمار	مرحله اول*		مرحله دوم**	
	درصد بازدارندگی	میانگین قطر رشد	درصد بازدارندگی	میانگین قطر رشد
T12	۱۵/۱۱a	۵۱/۱	۴۵/۷۳a	۲۳/۶۷
شاهد	۰b	۶۰/۲	۰b	۶۰/۲

* جدایه تریکودرما ۲۴ ساعت بعد از *P. digitatum* کشت داده شد. **جدایه تریکودرما ۷۲ ساعت بعد از *P. digitatum* کشت داده شد.
تیمارها در سطح ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند. آزمایش در سه تکرار صورت گرفته است.

بحث

در این پژوهش اثرات بیوکنترلی جدایه‌ای از *T. virens* بر علیه قارچ مولد کپک سبز مرکبات مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاصله نشان داد که این جدایه قادر به جلوگیری از رشد بیمارگر هم در دمای اتاق و هم در دمای سردخانه می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که مایکوپارازیتیسم و تولید ترکیبات خارج سلولی و متابولیت‌های فرار از مکانیسم‌های دخیل در فعالیت آنتاگونیستی جدایه‌های تریکودرما بر علیه کپک سبز مرکبات می‌باشد، که این با نتایج کار سایر پژوهشگران مطابقت دارد (ترونسمو و دنیس، ۱۹۷۷؛ سیواکومار و همکاران، ۲۰۰۰؛ اوبالوا و اوتی، ۲۰۰۷). قارچ تریکودرما با تولید آنزیم‌های متعددی باعث تخریب دیواره سلولی قارچ‌های بیمارگر می‌شود، که از این میان می‌توان از بتاگلوکوزیدازها به عنوان یکی مهم‌ترین آنزیم‌های تولیدی توسط جدایه‌های آنتاگونیست تریکودرما نام برد. بتاگلوکان هموپلیمر خطی از واحد-های دی‌گلوکز است که با پیوندهای بتاگلیکوزیدی به یه‌کدیگر متصل شده‌اند. این ترکیب یکی از اجزاء اصلی تشکیل دهنده دیواره سلولی قارچ‌ها است و به‌همراه ترکیباتی هم‌چون کیتین و انواع پروتئین‌ها باعث حفظ استحکام دیواره سلولی قارچ‌ها می‌شود. آنزیم‌های بتاگلوکاناز این پلیمر را با شکستن اتصالات بتاگلیکوزیدی میان زیر واحدها، به اجزاء سازنده آن تجزیه می‌کنند و قارچ تریکودرما به‌دلیل ترشح آنزیم بتا ۱و ۳ گلوکاناز، به‌عنوان عاملی قوی در کنترل بیولوژیک بیماری‌های قارچی مطرح می‌باشد (بیک و همکاران، ۱۹۹۹؛ هاول، ۲۰۰۳؛ بهرام‌سری و همکاران، ۱۳۸۴؛ هاول، ۲۰۰۳؛ وو و همکاران، ۲۰۰۶). علاوه بر این آنزیم، آنزیم‌های دیگری نظیر سلوبیوهیدرولاز، اندوگلوکاناز و کیتیناز نیز توسط این قارچ تولید می‌شود که در این بین فعالیت کیتینازی این قارچ با اثر فوق‌العاده آن در تخریب دیواره سلولی از اهمیت زیادی در کنترل بیولوژیک برخوردار است (پاپاویاز، ۱۹۸۵؛ هاول، ۲۰۰۳؛ وو و همکاران، ۲۰۰۶؛ قجقی و همکاران، ۱۳۸۴؛ دجونوی و همکاران، ۲۰۰۷). از دیگر مکانیسم‌های آنتاگونیستی تریکودرما می‌توان به القاء مقاومت در میزبان بر علیه حمله بیمارگر اشاره نمود (هاول و همکاران، ۲۰۰۰؛ ویبریو و همکاران، ۲۰۰۷)

Archive of SID

www.SID.ir

در بررسی میکروسکوپی نحوه تاثیر جدایه تریکودرما روی قارچ *P. digitatum* در مورد جدایه T12 مشاهده گردید که قبل از برخورد میسلیوم‌های دو قارچ با یکدیگر، میسلیوم‌های بیمارگر لیز شده و محتویات سلولی خود را به بیرون رها می‌کند و در نهایت قارچ آنتاگونیست با تراکم فراوانی روی کلونی پنیسیلیوم رشد و به فراوانی اسپورزایی می‌نماید.

ایمازالیل یکی از قارچ‌کش‌های سیستمیک بسیار متداول در کنترل پوسیدگی‌های پس از برداشت بوده و این پژوهش نشان می‌دهد که جدایه‌های مذکور می‌توانند جای‌گزین مناسبی برای این قارچ‌کش در کنترل کپک سبز مرکبات باشند. بررسی تاثیر غلظت-های مختلف سم روی رشد جدایه‌های آنتاگونیست نشان داد که غلظت توصیه شده برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت (۱ در هزار) از رشد جدایه‌های تریکودرما ممانعت به‌عمل آورده و دارای خاصیت قارچ‌کشی روی قارچ آنتاگونیست تریکودرما می‌باشد، اما در غلظت‌های پایین روی رشد آن بی‌تاثیر بوده و در کنترل تلفیقی بیماری‌های گیاهی موثر عمل می‌کند و قابل توصیه است، که این با نتایج سایر پژوهشگران مطابقت دارد (روکو و همکاران، ۱۹۹۶). نتایج به‌دست آمده از کاربرد تلفیقی جدایه‌های آنتاگونیست با غلظت حداقل ایمازالیل نشان می‌دهد که با تلفیق یک آنتاگونیست موفق با غلظت‌های مشخص از ترکیبات شیمیایی خاص می‌توان کارایی آنتاگونیست را با تضعیف بیمارگر و حساس شدن آن نسبت به حمله آنتاگونیست افزایش داد.

نتایج این پژوهش نشان داد که کنترل بیولوژیکی کپک سبز مرکبات در طی دوره انبارداری امکان‌پذیر است. کنترل موفق بیماری‌های پس از برداشت بدون شناخت دقیق از فیزیولوژی پس از برداشت میوه‌ها و مکانیسم‌های تاثیر عوامل آنتاگونیست و نیز عکس‌العمل-های متقابل بیمارگر و آنتاگونیست امکان‌پذیر نیست. در دنیا پژوهش‌های زیادی درباره استفاده هم‌زمان از اتمسفر کنترل شده و عوامل آنتاگونیست در سردخانه‌ها صورت گرفته است، که انجام آن در تکمیل این پژوهش ضروری به‌نظر می‌رسد.

سپاسگزاری

میوه‌های مورد استفاده در این آزمایش‌ها، از موسسه تحقیقات مرکبات رامسر در اختیارمان قرار گرفت که به این وسیله از همکاری آنان تشکر می‌گردد.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

بهرام‌سری، ن.، زمانی، م. و مطلبی، م. ۱۳۸۴. بررسی میزان تولید و فعالیت آنزیم بتا ۱و ۳ گلوکاناز در جدایه-های مختلف قارچ تریکودرما. مجله زیست شناسی ایران. ۱۸: ۲۶۱-۲۷۱.

زمانی، م.، شریفی تهرانی، ع.، احمدزاده، م.، علیزاده علی آبادی، ع. و فرزانه، م. ۱۳۸۷. بررسی اثر باکتری *Pantoea agglomerans* در کنترل کپک سبز میوه پرتقال (*Penicillium digitatum*). مجله علوم کشاورزی ایران. زیر چاپ.

سازمان جهاد کشاورزی استان مازندران. ۱۳۸۳. نشریه سیمای باغبانی استان. ۶۸ صفحه.

قجقی، ف.، مطلبی، م. و زمانی، م. ۱۳۸۴. مطالعه تولید آنزیم سلوبیوهیدرولاز در قارچ *Trichoderma reese*. مجله زیست شناسی ایران. ۱۸: ۱-۱۰.

Agrios, G. N. 2005. Plant pathology. Elsevier Academic Press 922 pp.

Baek, J. M., Howell, C. R. and Kenerley. 1999. The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. Current genetics. 35: 41-50.

Batta, Y. A. 1999. Biological effect of two strains of microorganisms on *Botrytis cinerea*: causal organism of gray mold on strawberry. An-Najah Univ. J. Res. A, Nat. Sci. 13: 67-83.

Batta, Y. A. 2004a. Effect of *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. Int. J. Food Microbiol. 69: 281-288.

Batta, Y. A. 2004b. Postharvest Biological control of apple gray mold by *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion. Crop Prot. 23: 19-26.

Djonović, S., Vittone, G., Mendozza-Herrea, A. nad Kenerley, M. 2007. Enhanced biocontrol activity *of Trichoderma virens* transformants constitutively coexpressing β-1, 3- and β-1, 6-glucanase genes. Molecular Plant Pathol. 8(4): 469- 480.

Eckert, J.W.1990. Recent development in chemical control of postharvest diseases. Acta Hort. 296-477.

Hidch, D. P., and Gruenwedel, S. H., 1995. Microbial toxins. In: Chemicals in the human food chain. Van Nostrand Reinhold. Pp. 239- 276.

Holmes, G. J. and Eckert J. W. 1999. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* to postharvest citrus fungicides in California. Phytopathology. 89(90); 716- 721.

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(1): 4-10.

Howell, C. R., Honson, L. E., Stipanovic, R. D. and Puckhaber, L. S. 2000. Induction of Terpenoid Synthesis in Cotton Roots and Control of *Rhizoctonia solani* by Seed Treatment with *Trichoderma virens*. Phytopathology. 90(3): 248-252.

Janisiewicz, W. J. & Jeffers, S.1997**.** Efficacy of commercial formulation of two biofungicides for control of blue mould and gray mould of apples in cold storage .Crop Prot.16: 629-633.

Obagwe, J. and Korsten, L. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. Postharvest Biol. Technol. 28:187-194.

Rocco, M. F., Cristani, C. and Vannaci, G. 1996. Sensetivity of *Trichoderma* isolates and selected resistant motants to DMI fungicides. Crop prot. 15(7): 615-620.

Sivakumar, D., Wilson Wijeratnam, R. S., Wijesundera, R.L.C., Marikar, F.M.T. and Abeyesekere. M. 2000. Anatagonistic effect of *Trichoderma harzianum* on postharvest pathogens of Rambutan (*Nephelium lappaceum*). Phytoparasitica. 28: 1-8.

Tronsmo, A. and Dennis, C. 1977. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. Neth. J. Plant Pathol. 83:449-455.

Ubalua, A. O., and Oti, E. 2007. Antagonistic properties of *Trichoderma viride* on postharvest cassava root rot pathogens. African J. of Biotechnol. 6: 2447-2450. Papavizas, G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biological control. Annu. Rev. Phytopathology. 23:23-54.

Archive of SID

www.SID.ir

Vibrio, A., Wiest, A., Brotman, Y., Chet, I and Kenerley, C. 2007. The 18mer peptaibols from *Trichoderma virens* elicit plant defence responses. Molecular Plant Pathol. 8(6): 737-746.

Wilson, C. L., EL Ghaouth, A., Chaltuze, E., Dorby, S., Stevens, C., Lu, J. Y., Khan, V. and Arul, j. 1994. Potential of induced resistance to control Postharvest diseases of fruits and vegetables. Sci. Hortic. 78: 837-844.

Woo, S. L., Scala, F., Ruocco, M. and Lorito, M. 2006. The Molecular Biology of the Interactions between *Trichoderma* spp., Phytopathogenic Fungi, and Plants. Phytopathology. 96(2): 181-185.

Archive of SID

www.SID.ir

Integrated Control of Citrus Green Mold Using of *Trichoderma virens* in Laboratory and Cold Storage Conditions

Zamani[1], M., Sharifi Tehrani[2], A. and Ahmadzadeh[3], M.

Absteract

In this survey, among 6 isolates of *Trichoderma* spp., biocontrol effect of *Trichoderma virens*, which was more efficient than the other isolates during dual culture assays, was investigated alone and in combination with Imazalil (1 ppm) in comparison with application of imazalil and tiabendazole alone on fruit, in growth chamber and cold storage conditions, at both 20 ±1º C and 4±1º C against*Penicillium digitatum* . Results showed that imazalil prohibits *Trichoderma* growth at the concentration of 1000 ppm on PDA culture medium. Mentioned isolate also inhibited growth and development of the pathogen by producing volatile metabolites and intracellular secretions. Application of antagonistic isolate, alone, resulted in 88% and 82.82% disease reduction at 4±1º C and 20±1º C respectively. Results obtained from the effect of fungicides on pathogen showed that imazalil is significantly more efficient than tiabendazole. Integrated use of the isolate (5×10^7 spores per ml) with imazalil improved its biocontrol efficiency and resulted in 94.8% decay reduction in 4º C.

Keywords: *Trichoderma virens*, *Penicillium digitatum*, biological control, green mold, citrus

Archive of SID

1, 2 and 3. Ph.D student, Professor and Assistant professor respectively, Department. of Plant Protection, University of Tehran, Karaj

www.SID.ir