

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

شهرام نعیمی<sup>۱</sup> و رسول زارع<sup>۲</sup>

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](mailto:naeimi@iripp.ir)

تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۵

۷۴-۵۵(۲)

تاریخ دریافت: ۹۱/۰۷/۰۵

### 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 به فراوانی 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 فرار، تعدادی از تیمارها از نظر کاهش رشد بیمارگر با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند و حداکثر میزان ممانعت از رشد میسلومی 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 میسلومی 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

*Botrytis fruit rot*) است. پوسیدگی خاکستری یکی از مهم‌ترین بیماری‌های توت‌فرنگی در سراسر دنیا است (Hjeljord *et al.*, 2001) و هرچا که توت‌فرنگی کشت می‌شود یک بیماری خطرناک محسوب می‌شود (Wilcox & Seem, 1994). این قارچ، یک بیمارگر

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

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 به کاهش 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 مقاوم 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 به کار 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 بیولوژیک 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

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 به کاربرد متناوب و زیاد قارچ‌کش‌ها، این بیماری دلیل اصلی قرار گرفتن میوه توت‌فرنگی در بین محصولات غذایی پرخطر 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 به سایر اندام‌های گیاه نشان می‌دهند، اما علائم 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 میسلیم و سختینه زمستان‌گذرانی می‌کند و منابع 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 (آب آزاد) توده‌ی خاکستری رنگی متشکل از میسلیم‌ها، 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

توت‌فرنگی، بیماری کپک خاکستری را کاهش داد و بهترین جدایه، به‌اندازه‌ی قارچ کش 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 کارایی 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 محصول شرکت Binab Bio-Innovation AB)، PlantShield (با ماده‌ی مؤثره *T. harzianum* T22 محصول شرکت Bioworks) و

عوامل بیوکنترل قارچی (*Gliocladium*، *Trichoderma* spp.)، *Pythium radiosum* B. Paul، *roseum* Bainer، *Penicillium* sp. و *Ulocladium* sp.)، باکتریایی (*Serratia*)، *Bacillus* spp.، *amarcescens* Bizio و *Pseudomonas* spp.) (متعلق به جنس‌های *Candida* و *Pichia*) 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 پارازیتسم 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 بیولوژیک بیماری‌های گیاهی، با استفاده 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

استریل قرار گرفتند. قطعات در تشک‌های پتری حاوی محیط کشت آب-آگار ۲ درصد کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۲۱ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. قارچ‌های با مشخصات جنس *Botrytis* با روش تک اسپور خالص‌سازی شدند. برای شناسایی *B. cinerea* مشخصات مورفولوژیک جدایه‌ها با توصیف *Commonwealth Mycological Institute (CMI)* شماره‌ی ۴۳۱ (Ellis & Walker, 1974) مطابقت داده شد.

### آزمون اثبات بیماری‌زایی

برای اثبات بیماری‌زایی، برای هر جدایه به‌طور جداگانه، سوسپانسیون اسپورهای قارچ روی میوه‌های توت‌فرنگی سترون با غلظت  $10^6$  کنیدی در میلی‌لیتر پاشیده شد (Sutton & Peng, 1993). سپس ظروف حاوی میوه‌ها به مدت پنج روز در ژرمیناتور با دمای ۲۱ درجه‌ی سلسیوس و تناوب نوری (۱۲/۱۲ L/D) قرار داده شدند. براساس سرعت رشد و تعداد سختینه‌های تشکیل شده و نیز شدت بیماری پوسیدگی خاکستری در گلخانه، بیماری‌زاترین جدایه برای انجام آزمون‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای انتخاب شد.

### جداسازی *Trichoderma spp.*

#### الف) جداسازی از خاک:

جدایه‌های تریکودرما به‌روش کشت سری رقت خاک (dilution plating) و با استفاده از محیط کشت انتخابی مک‌فادن و ساتن (McFadden & Sutton's RB-S-F) جداسازی شدند. برای تهیه‌ی این محیط، یک گرم  $KH_2 PO_4$ ، ۰/۵ گرم  $MgSO_4$ ، پنج گرم پیتون، ۱۰ گرم گلوکز، ۱۷ میلی‌گرم رُز بنگال، ۳۰ میلی‌گرم سولفات استرپتومایسین و ۲۰ گرم آگار در یک لیتر آب حل شد و پس از سترون کردن در اتوکلاو، ۰/۲ میلی‌لیتر فرمالدهید به آن اضافه شد (Davet & Rouxel, 2000). ده گرم خاک (خشک شده در آون) به ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون داخل یک فلاسک ارلن مایر اضافه شد و به مدت ۲۰ تا ۳۰ دقیقه روی دستگاه تکان دهنده‌ی (shaker) قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی‌لیتر از

TRICHODEX (با ماده‌ی مؤثره *T. harzianum* T39) محصول شرکت (Makhteshim) برای کنترل پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی در گلخانه و انبار در دسترس می‌باشد. این فرآورده‌های تجاری برای استفاده در گلخانه‌ها و نیز پس از برداشت محصول به کار می‌روند؛ جایی که شرایط پایدار و کنترل شده‌ی محیطی، امکان بروز فعالیت آنتاگونیستی آفت‌کش زیستی (biopesticide) را می‌دهد (Elad & Stewart, 2004).

به دلیل مصرف بالای قارچ‌کش‌های مختلف برای کنترل بیماری پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی در ایران به‌ویژه در استان مازندران و مشکلات مربوط به وجود باقیمانده‌ی سموم و تهدید سلامت مصرف‌کنندگان، تحقیق در زمینه‌ی شناسایی و به‌کارگیری عوامل کنترل بیولوژیک این بیماری ضروری است. این پروژه با هدف جداسازی و شناسایی جدایه‌های بومی از جنس تریکودرما به‌منظور ارزیابی کارایی آن‌ها در کنترل *B. cinerea* در آزمایشگاه و گلخانه انجام شد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه برداری

از ۱۲ مزرعه‌ی توت‌فرنگی در استان مازندران نمونه‌برداری انجام شد. خاک اطراف ریشه (ریزوسفر) به‌همراه اندام‌های هوایی توت‌فرنگی (برگ، گل و میوه) جمع‌آوری شدند و به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌های خاک داخل کیسه‌های پلاستیکی و در دمای اتاق (۲۵-۲۰ درجه‌ی سلسیوس) و اندام‌های هوایی در یخچال با دمای حدود چهار درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند.

#### جداسازی عامل بیماری

برای جداسازی *B. cinerea* میوه‌های آلوده‌ی توت‌فرنگی در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی سطحی شدند و پس از سه بار آب‌کشی با آب مقطر استریل، به قطعات نیم تا یک سانتی‌متری تقسیم شدند و برای جذب آب اضافی در بین دو لایه کاغذ صافی

تاریکی در محیط کشت مالت-آگار ۲٪ انجام شد. به‌منظور مشاهدات و اندازه‌گیری‌های میکروسکوپی، پریاراسیون‌ها در اسید لاکتیک ۲۵٪ و نیز محلول کاتن بلو لاکتوفنل تهیه شدند. از میکروسکوپ نوری آلیمپوس (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 اشتباه‌آمیز است (Samuels, 2006). برای حل مشکلات مربوط به شناسایی جدایه‌های تریکودرما، *Druzhinina et al.* (2005) یک سیستم بارکد 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 *TrichOKEY 2.0* به‌صورت آنالاین 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 *TrichOKEY 2* استفاده شد. توالی‌های ITS در بانک ژن ذخیره شدند و به‌ازای هر توالی، یک شماره‌ی دستیابی (accession number) اخذ شد.

### تعیین جمعیت جدایه‌های تریکودرما

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

سوسپانسیون حاصل، به ۹۰ میلی‌لیتر 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، ۱/۰ میلی‌لیتر 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 به‌لوله‌های 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 قرار گرفتند و سپس در شرایط دمای اتاق و نور طبیعی (نور غیرمستقیم در آزمایشگاه) نگهداری شدند. برای هر جدایه سه تکرار در نظر گرفته‌شد. رشد خطی جدایه‌ها با اندازه‌گیری قطر پرگنه، چهار روز پس از قرار گرفتن آن‌ها در انکوباتور در دمای  $20 \pm 1$  درجه‌ی سلسیوس و در شرایط

### بررسی تأثیر تریکودرما در تجزیه کردن سختینه‌های

#### *B. Cinerea*

برای تشکیل سختینه، حلقه‌ای از حاشیه‌ی کشت تازه *B. cinerea* در وسط تشتک‌های پتری حاوی PDA کشت داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۱۵ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. سختینه‌های تشکیل شده با پنس استریل به‌ظروف پتری حاوی پرگنه‌های شش روزه جدایی‌های تریکودرما در محیط کشت PDA قرار داده شدند (نه سختینه در هر تشتک و سه تکرار برای هر جداییه). تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۱ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از یک ماه سختینه‌ها با هیپوکلریت سدیم ۱۰ درصد ضدعفونی سطحی شدند و به محیط کشت آب-آگار منتقل شدند. بعد از ۲۴ ساعت، جوانه‌زنی و رشد میسلومی 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 فرآر تریکودرما در رشد

#### *B. cinerea*

این آزمایش طبق روش Dennis & Webster (1971) انجام شد. قرص‌هایی به قطر 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 به جداییه‌های 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 پارافیلیم 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 جداییه‌های تریکودرما با استفاده از رابطه

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

### بررسی اثر جداییه‌های 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 نه 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 هر جداییه سه تکرار در نظر گرفته شد. در تشتک پتری شاهد فقط قرص میسلومی 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 جداییه‌های 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 نه روز مورد مشاهده و بازبینی قرار گرفتند. براساس سیستم فوق، جداییه‌ای از تریکودرما «آنتاگونیست» در نظر گرفته شد که میانگین نمره آن جداییه، مساوی یا کوچک‌تر از ۲ بود.



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 پست استریل به‌میزان شش و یک میلی‌لیتر از عصاره‌ی هر یک از جدایه‌های تریکودرما به محیط PDA درون لوله‌های آزمایش ریخته شد تا حجم آن‌ها به ۲۰ میلی‌لیتر برسد. محتویات لوله‌ها، پس از این که به‌خوبی مخلوط شد، در تشتک‌های پتری ۹ سانتی‌متری ریخته شد. برای هر غلظت از عصاره سه تکرار در نظر گرفته شد. 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 میسلیمی بیمارگر پس از ۴۸ و ۷۲ ساعت اندازه‌گیری شد. درصد بازدارداری از رشد میسلیمی *B. cinerea* با استفاده از رابطه‌ی  $A-B/A \times 100$  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 ۳-۴ روز

$A-B/A \times 100$  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 میسلیمی *B. cinerea* مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این آزمایش، محیط مایعی با ترکیب یک گرم  $Ca(NO_3)_2$ ، ۰/۲۵ گرم  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ، ۰/۲۵ گرم  $KH_2PO_4$ ، یک گرم  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ، 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، به هر یک از فلاسک‌ها، یک میلی‌لیتر از سوسپانسیون اسپور جدایه‌های تریکودرما (۱۰<sup>۷</sup> 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 میسلیمی قارچ تشکیل شد، برای افزایش تحریک تولید کیتینازها و گلوکانازها، پلت‌های (pellets) قارچ بیمارگر در شرایط استریل به فلاسک‌ها اضافه شد. فلاسک‌ها مجدداً در شیکر انکوباتور قرار گرفتند. برای تهیه‌ی گلوله (حبه)‌های میسلیمی *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، به هر یک از فلاسک‌ها، یک میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور *B. cinerea* (۱۰<sup>۶</sup> 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 میسلیمی *B. cinerea* به فلاسک‌های ارلن مایر حاوی تریکودرما، محیط مایع درون هر فلاسک با استفاده از

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

برای تهیه‌ی سوسپانسیون کنیدی‌های بیمارگر و آنتاگونیست‌ها، ابتدا آن‌ها در محیط SPDA (PDA حاوی ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر سولفات استریتومایسین) 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. محلول پاشی با محلول پاش کوچک دستی انجام شد.

تأثیر قارچ کش 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 به تعیین تعداد واحدهای پرگنه‌ساز (cfu) اقدام شد و از سوسپانسیون ۱۰ در هزار آن برای محلول پاشی استفاده گردید.

در مرحله‌ی گل‌دهی، ابتدا سوسپانسیون اسپور آنتاگونیست‌ها و فرآورده‌ی تجاری و ۴۸ ساعت بعد، سوسپانسیون اسپور *B. cinerea* روی بوته‌ها محلول پاشی 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. محلول پاشی 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 قرار گرفتند 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 به هر 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 قرار داده‌شدند. 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 محلول پاشی، 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 قرار داده شدند. ۰/۵ میلی‌لیتر از سوسپانسیون حاصل (سری رقت)



به تشک‌های 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 تشک پتری 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

### تعیین جمعیت جدایه‌های تریکودرما

به‌جز از دو نمونه، همه‌ی نمونه‌های خاک مربوط به مزارع توت‌فرنگی استان مازندران حاوی پروپاگول‌های تریکودرما بودند و جمعیت  $10^2 \times 1-7$  cfu/g را تشکیل دادند. از کل نمونه‌های مربوط به اندام‌های هوایی، فقط پنج جدایه تریکودرما به‌دست‌آمد که مربوط به دو 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 آنتاگونیست *B. cinerea* محسوب شدند که ۷۵ درصد آن‌ها از گونه‌ی *T. harzianum* بودند. هیچ کدام از جدایه‌های تریکودرما در کلاس‌های ۴ و ۵ قرار نگرفتند. فقط در مورد بعضی از تیمارها (MS12-4 و MS11-2، MS8-4، MS8-3، MS5-1) در داخل تشک‌های پتری، سختینه‌های بیمارگر تشکیل شد.

جدول ۱- جدایه‌های تریکودرما به دست 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.
<i>T. harzianum</i> MS1-1	Soil	Bahnamir	EU821780	<i>T. harzianum</i> MS10-2	Soil	Kiakola	EU821781
<i>T. harzianum</i> MS1-2	Soil	Bahnamir	EU821780	<i>T. harzianum</i> MS10-2	Soil	Kiakola	EU821788
<i>T. harzianum</i> MS3-1	Soil	Kiakola	EU821780	<i>T. harzianum</i> MS10-3	Soil	Kiakola	EU821780
<i>T. harzianum</i> MS3-2	Soil	Kiakola	EU821780	<i>T. harzianum</i> MS10-4	Soil	Babolsar	EU821780
<i>T. harzianum</i> MS3-3	Phyllosphere	Kiakola	EU821780	<i>T. harzianum</i> MS12-1	Soil	Babolsar	EU821780
<i>T. harzianum</i> MS5-1	Soil	Amol	EU821787	<i>T. harzianum</i> MS12-2	Phyllosphere	Babolsar	EU821780
<i>T. harzianum</i> MS5-2	Phyllosphere	Amol	EU821787	<i>T. harzianum</i> MS12-3	Soil	Anarmarz	EU821795
<i>T. harzianum</i> MS6-1	Soil	Jooybar	EU821786	<i>T. virens</i> MS7-3	Soil	Kiakola	EU821796
<i>T. harzianum</i> MS6-2	Soil	Jooybar	EU821792	<i>T. virens</i> MS8-1	Soil	Kiakola	EU821796
<i>T. harzianum</i> MS6-21	Soil	Jooybar	EU821792	<i>T. virens</i> MS8-5	Phyllosphere	Amol	EU821795
<i>T. harzianum</i> MS7-1	Soil	Anarmarz	EU821787	<i>T. virens</i> MS5-3	Phyllosphere	Babolsar	EU821795
<i>T. harzianum</i> MS8-2	Soil	Kiakola	EU821790	<i>T. virens</i> MS12-4	Soil	Chamestan	EU821798
<i>T. harzianum</i> MS8-3	Soil	Kiakola	EU821790	<i>T. hamatum</i> MS11-2	Soil	Chamestan	EU821797
<i>T. harzianum</i> 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.

موفق نبودند و جدایه *T. atroviride* MS11-1 پس از گذشت ۹۶ ساعت تا حدودی از رشد میسلیمی بیمارگر جلوگیری به عمل آورد (۲۷٪ درصد).

جدول ۲- تأثیر جدایه‌های تریکودرما در تجزیه کردن سختینه‌های *B. cinerea* در داخل تشک‌های پتری.

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

Isolate	Degree of lysis	Isolate	Degree of lysis
<i>T. harzianum</i> MS1-1	+++ <sup>a</sup>	<i>T. harzianum</i> MS10-2	+++
<i>T. harzianum</i> MS1-2	+++	<i>T. harzianum</i> MS10-3	++
<i>T. harzianum</i> MS3-1	+	<i>T. harzianum</i> MS10-4	+++
<i>T. harzianum</i> MS3-3	+	<i>T. harzianum</i> MS12-1	-
<i>T. harzianum</i> MS5-1	-	<i>T. harzianum</i> MS12-3	+
<i>T. harzianum</i> MS5-2	-	<i>T. virens</i> MS5-3	-
<i>T. harzianum</i> MS6-1	+++	<i>T. virens</i> MS7-3	++
<i>T. harzianum</i> MS6-2	+++	<i>T. virens</i> MS8-1	+
<i>T. harzianum</i> MS7-1	-	<i>T. virens</i> MS12-4	+
<i>T. harzianum</i> MS8-2	++	<i>T. hamatum</i> MS11-2	+++
<i>T. harzianum</i> MS8-3	+++	<i>T. atroviride</i> MS11-1	+++
<i>T. harzianum</i> MS8-4	+++		

<sup>a</sup> شدت لیز شدن سختینه‌های بیمارگر: شدید (+++), متوسط (++)، ضعیف (+) و عدم لیز شدن (-).

<sup>a</sup> Degree of lysis of sclerotia: high (+++), moderate (++)، weak (+) and no lysis (-).

### بررسی تأثیر تریکودرما در تجزیه کردن 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 فرار 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 میسلیمی بیمارگر توسط جدایه‌های تریکودرما حداکثر ۵۵ درصد بود. جدایه‌های *T. harzianum* MS6-2 و *T. harzianum* MS1-1 به ترتیب 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 به گونه‌های *T. hamatum* و *T. virens* در این آزمایش چندان

**بررسی تأثیر عصاره‌ی کشت (culture filtrate)**

**جدایه‌های تریکودرما در رشد *B. cinerea***

بر اساس 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 میسلیمی *B. cinerea* توسط جدایه‌های تریکودرما قابل توجه بود به طوری که این کاهش به بیش از ۷۱ درصد (غلظت یک

میلی‌لیتر عصاره‌ی کشت) رسید. در آزمایشی که یک میلی‌لیتر عصاره‌ی کشت تریکودرما به تشتک‌های پتری اضافه شد (غلظت ۵ درصد) پس از ۹۶ ساعت، جدایه‌های *T. harzianum* MS6-2 و *T. harzianum* MS8-4 هر کدام به میزان ۷۱/۴ درصد و جدایه‌های *T. harzianum* MS10-2، *T. harzianum* MS10-4، *T. virens* MS8-1 و *T. harzianum* MSI-I به ترتیب به میزان ۷۰، ۶۶/۷، ۶۶ و ۶۲/۶ درصد از رشد میسلیمی بیمارگر ممانعت نمودند.

جدول ۳- تأثیر متابولیت‌های فرار جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیمی *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
<i>T. harzianum</i> MS1-1	31.33 m	41.00 m	39.74 a	54.44 a
<i>T. harzianum</i> MS1-2	46.33 ghi	81.33 de	10.90 de	9.63 h
<i>T. harzianum</i> MS3-1	50.33 abc	90.00 a	3.21 hi	0.00 l
<i>T. harzianum</i> MS3-3	51.00 abc	90.00 a	1.92 ij	0.00 l
<i>T. harzianum</i> MS5-1	47.67 efgh	73.00 f	8.33 efg	18.89 f
<i>T. harzianum</i> MS5-2	47.33 fgh	83.33 c	8.97 def	7.41 i
<i>T. harzianum</i> MS6-1	43.33 j	48.67 k	16.67 c	45.93 b
<i>T. harzianum</i> MS6-2	33.67 l	43.67 l	35.26 a	51.48 a
<i>T. harzianum</i> MS7-1	48.00 defg	85.33 b	7.69 efg	5.19 j
<i>T. harzianum</i> MS8-2	47.67 efgh	66.67 g	8.33 efg	25.93 e
<i>T. harzianum</i> MS8-3	49.67 bcde	77.00 e	4.49 gh	14.44 g
<i>T. harzianum</i> MS8-4	39.33 k	64.67 h	24.36 b	28.15 e
<i>T. harzianum</i> MS10-2	45 ij	59.33 i	13.46 cd	34.07 d
<i>T. harzianum</i> MS10-3	45.67 hi	60.67 i	12.18 cde	39.52 d
<i>T. harzianum</i> MS10-4	39.33 k	55.67 j	24.36 b	38.15 c
<i>T. harzianum</i> MS12-1	48.00 defg	80.00 d	7.69 efg	11.11 h
<i>T. harzianum</i> MS12-3	46.67 ghi	72.00 f	10.26 de	20.00 f
<i>T. virens</i> MS5-3	47.33 fgh	80.33 d	8.97 def	10.74 h
<i>T. virens</i> MS7-3	49.33 cdef	90.00 a	5.13 fgh	0.00 l
<i>T. virens</i> MS8-5	45.00 ij	71.67 f	13.46 cd	20.37 f
<i>T. virens</i> MS12-4	51.67 ab	90.00 a	0.64 jk	0.00 l
<i>T. hamatum</i> MS11-2	50.00 abcd	88.67 a	3.85 hi	1.48 k
<i>T. atroviride</i> 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 ( $P = 0.01$ ).

جدول ۴- تأثیر عصاره‌ی کشت جدایه‌های تریکودرما در جلوگیری از رشد میسلیم *B. cinerea*.

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

Isolate	Growth inhibition <sub>1</sub> (%) <sup>a</sup>		Growth inhibition <sub>6</sub> (%) <sup>b</sup>	
	After 48 h	After 96 h	After 48 h	After 96 h
<i>T. harzianum</i> MS1-1	51.14 abc	67.41 ab	63.51 ab	72.77 bc
<i>T. harzianum</i> MS1-2	42.11 abcd	61.16 ab	59.86 b	59.38 d
<i>T. harzianum</i> MS3-1	7.53 ij	4.02 fg	13.87 ij	5.81 j
<i>T. harzianum</i> MS3-3	11.29 hij	7.15 efg	10.23 j	4.02 jk
<i>T. harzianum</i> MS5-1	9.04 ij	10.72 de	14.60 ij	11.16 i
<i>T. harzianum</i> MS5-2	21.06 fg	7.15 efg	11.69 j	10.72 i
<i>T. harzianum</i> MS6-1	40.61 bcd	22.77 c	44.53 cd	26.79 ef
<i>T. harzianum</i> MS6-2	54.14 ab	70.54 a	76.64 a	79.02 ab
<i>T. harzianum</i> MS7-1	30.84 def	18.31 cd	33.58 def	20.54 gh
<i>T. harzianum</i> MS8-2	37.60 cd	51.79 b	51.83 bc	55.81 d
<i>T. harzianum</i> MS8-3	33.09 de	21.88 c	28.47 efgh	32.15 e
<i>T. harzianum</i> MS8-4	57.90 a	69.20 ab	78.10 a	85.71 a
<i>T. harzianum</i> MS10-2	52.64 abc	71.43 a	78.83 a	82.14 ab
<i>T. harzianum</i> MS10-3	43.62 abcd	53.57 ab	51.10 bc	58.04 d
<i>T. harzianum</i> MS10-4	51.14 abc	65.18 ab	64.24 ab	64.29 cd
<i>T. harzianum</i> MS12-1	21.82 efg	8.93 ef	30.66 efg	12.50 i
<i>T. harzianum</i> MS12-3	16.55 gh	6.25 efg	19.71 hi	4.47 jk
<i>T. virens</i> MS5-3	6.78 j	3.13 g	8.77 j	3.13 k
<i>T. virens</i> MS7-3	13.55 ghi	4.47 fg	10.23 j	6.25 j
<i>T. virens</i> MS8-5	53.39 abc	66.07 ab	75.18 a	79.02 ab
<i>T. virens</i> MS12-4	21.82 efg	16.52 cd	24.09 fgh	19.20 h
<i>T. hamatum</i> MS11-2	21.82 efg	7.59 efg	22.63 gh	12.95 i
<i>T. atroviride</i> 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. <sup>a, b</sup> 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 ( $P = 0.01$ ). <sup>a, b</sup> One and six milliliter of culture filtrate, respectively.

تریکودرما در محیط کشت، تأثیر آن‌ها در ممانعت از رشد میسلیمی بیمارگر بیشتر بود.

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

بر اساس نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی تعداد شش جدایه تریکودرما شامل پنج جدایه‌ی *T. harzianum* (MS1-1، MS6-2، MS8-4، MS10-2 و MS10-4) به علاوه‌ی 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

در آزمایش 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. harzianum* MS8-1 و *T. virens* MS8-1، *harzianum* MS6-2 به ترتیب 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. hamatum* و *T. atroviride* قابل ملاحظه نبود. لازم به ذکر است که با افزایش غلظت عصاره‌ی کشت جدایه‌های

میوه های آلوده به ترتیب به میزان ۵۳/۵ درصد و ۵۷/۶ درصد (میانگین چهار هفته متوالی) بهتر از تیمارهای دیگر باعث کاهش میزان بیماری پوسیدگی خاکستری میوه ی توت فرنگی در گلخانه شدند. حداکثر میزان کنترل بیماری هم بالطبع به این دو جدایه (به ترتیب با ۲۸/۷۶ و ۲۳/۳۰ درصد) اختصاص داشت.

در هر چهار هفته ارزیابی در سطح احتمال ۱ درصد معنی دار بود. مقایسه ی میانگین تیمارها با استفاده از روش دانکن نشان داد که تعدادی از تیمارها با شاهد اختلاف معنی دار داشتند (جدول ۵). حداقل درصد میوه های آلوده به میزان ۵۰ درصد در هفته دوم بعد از آخرین محلول پاشی سوسپانسیون اسپور جدایه های تریکودرما ثبت گردید. در مجموع جدایه های *T. harzianum* MS6-2 و *T. harzianum* MS8-4 با درصد

جدول ۵- تأثیر چند استرین انتخابی تریکودرما و یک قارچ کش بیولوژیک تجاری در کنترل پوسیدگی خاکستری میوه ی توت فرنگی در گلخانه براساس درصد میوه های 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	1 <sup>st</sup> week	2 <sup>nd</sup> week	3 <sup>rd</sup> week	4 <sup>th</sup> week	All weeks	Control (%)
<i>T. harzianum</i> MS1-1	63.7 c	58.3 bc	61.3 b	63.3 cd	61.7 d	17.84 bc
<i>T. harzianum</i> MS6-2	55.3 d	50.3 d	53.3 c	55.0 e	53.5 f	28.76 a
<i>T. harzianum</i> MS8-4	60.7 cd	55.0 c	56.0 c	58.7 de	57.6 e	23.30 ab
<i>T. harzianum</i> MS10-2	66.0 bc	61.0 b	62.3 b	67.0 bc	64.1 cd	14.65 cd
<i>T. harzianum</i> MS10-4	72.7 b	69.0 a	72.3 a	68.0 bc	70.3 b	6.39 e
<i>T. virens</i> 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 میوه های آلوده توت فرنگی به بیماری پوسیدگی خاکستری می باشد. میانگین های هر ستون که با حروف متفاوت نشان داده شده اند، بر اساس آزمون دانکن در سطح  $P \leq 0.01$  با یکدیگر اختلاف معنی دار 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 استرین های تریکودرما

براساس جداول تجزیه ی واریانس اثر تیمار یک و دو هفته پس از محلول پاشی آخر به ترتیب در سطح احتمال پنج و یک درصد معنی دار بود اما چهار هفته بعد، اختلاف آماری معنی داری مشاهده نشد. جمعیت همه استرین های تریکودرما و نیز استرین موجود در فرآورده تجاری روی سطوح اندام های هوایی توت فرنگی در طول زمان به طور قابل توجهی کاهش پیدا کرد (جدول ۶). یک هفته پس از آخرین محلول پاشی، میزان جمعیت از  $10^7$  به  $10^5$  کنیدی در میلی لیتر تقلیل پیدا کرد و پس از آن، افت جمعیت استرین ها در هفته های بعد شدت

بیش تری گرفت. کم ترین افت میزان جمعیت مربوط به TRICHO-MIX HV، استرین های *T. harzianum* MS6-2 و *T. harzianum* MS10-2 (در یک گروه آماری) و بیش ترین کاهش جمعیت مربوط به *T. harzianum* MS10-4 و *T. harzianum* MS8-4 می باشد. دو هفته بعد، میزان کاهش جمعیت شدت بیشتری یافت که در مورد استرین *T. virens* MS8-1 به کمتر از  $10^2$  رسید. در این زمان، استرین *T. harzianum* MS6-2 و پس از آن TRICHO-MIX HV دارای بیش ترین جمعیت بودند (جدول ۶). بالاخره یک ماه

اگرچه جمعیت استرین MS6-2 *T. harzianum* 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، *TrichoKEY* قابلیت بالایی در شناسایی دقیق و درست جدایه‌های تریکودرما در حد گونه داشته است. به طوری که در سال‌های اخیر، محققین مختلفی در سراسر دنیا از این ابزار جدید شناسایی استفاده کرده‌اند. با کمک این نرم افزار، همه‌ی جدایه‌های به دست 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 به ذکر است که *T. harzianum* فراوان‌ترین گونه‌ی جنس *Trichoderma* در دنیا محسوب می‌شود (Samuels, 2006).

در پژوهش حاضر، جدایه‌های بومی تریکودرما و یک قارچ کش بیولوژیک تجاری ساخت داخل کشور به منظور 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 به تجزیه کردن سختینه‌های بیمارگر بودند. اما متابولیت‌های فرار این استرین‌ها توانستند به خوبی از رشد میسلومی *B. cinerea* جلوگیری نمایند. از طرف دیگر،

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

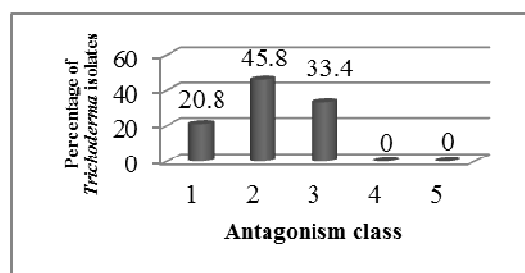
جدول ۶- جمعیت استرین‌های تریکودرما بر حسب تعداد واحدهای پرگنه ساز در هر سانتی‌متر مربع برگ توت‌فرنگی ( $\text{cfu/cm}^2 \text{ leaf area}$ )، دو و چهار هفته پس از محلول‌پاشی آخر در گلخانه.

Table 6- Population of *Trichoderma* strains (in terms of  $\text{cfu/cm}^2 \text{ leaf area}$ ) 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 ( $\times 10$ )
<i>T. harzianum</i> MS1-1	1.7 abc	1.3 c	0.3 a
<i>T. harzianum</i> MS6-2	4.3 a	10.7 a	1.3 a
<i>T. harzianum</i> MS8-4	1.0 bc	1.3 c	0.0 a
<i>T. harzianum</i> MS10-2	3.7 a	2.3 bc	1.0 a
<i>T. harzianum</i> MS10-4	0.7 c	3.3 ab	0.7 a
<i>T. virens</i> 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.



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 Binab، TRICHODEX 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 ضعیف تری نسبت به استرین‌های آنتاگونیست بومی قرار داشت. لازم به ذکر است که بر طبق برجسب 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 خاکری 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 به مواد غذایی، درجه‌ی حرارت و رطوبت مناسب و کاربرد به‌موقع آنتاگونیست اشاره کرد. همچنین گیاه‌میزبان و ترکیبات بازدارنده آن و نیز جمعیت و ترکیب میکروارگانیسم‌های محیط نیز ممکن است اثربخشی آنتاگونیست‌های انتخاب شده را تحت تأثیر قرار دهند

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 مشابه نتایج پژوهش (Alizadeh (995 و Feyzi et al. (2013) است. (Lugauskas (1961 گزارش کرد که متابولیت‌های فرار *T. viride* باعث توقف کامل رشد میسلومی *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 به این 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 به آن مستلزم تحقیقات گسترده و همه‌جانبه 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 تریکودرما 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

کنترل، شاید در مقایسه با قارچ‌کش‌های شیمیایی چندان قابل توجه نباشد. اما با توجه به اهمیت 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.

(Freeman *et al.*, 2004). (Tronsmo & Dennis (1977). 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

## 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.

- 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.

- 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).
- Rosslensbroich, 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.

- 
- 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).

---

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

Shahram Naeimi<sup>1\*</sup> and Rasoul Zare<sup>2</sup>

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

---