Journal of Microbial World
Volume 16, No. 1, June 2023

Original Article

Control of strawberry gray mold fungus with combined application of different species of Trichoderma and salicylic acid

Saghi younesi baneh[1], Mehrdad salehzadeh[2], mohammad javad soleimani pari[3]

[1]MsC, Depertment of plant pathology, Faculty of Agriculture Scince, Bou Ali Sina University, Hamedan, Iran. [2]Ph.D. student, Depertment of plant pathology, Plant Virology research center, Faculty of Agriculture Scince, Shiraz University, Shiraz, Iran. [3]Associate Professor, Depertment of plant Protection, Faculty of Agriculture Scince, Bou Ali Sina University, Hamedan, Iran.

Abstract

Background and Objectives: The rot caused by strawberry gray mold (Botrytis cinerea) is one of the most important rots causing damage in the field and market. The purpose of this research is that biological control agents and compounds inducing plant defense reactions seem to lead to a reduction in the frequency of spraying or not spraying fungicide compounds on the crop.

Materials & Methods: Different isolates of B. cinerea were collected from greenhouses and farms in Kurdistan province, and their morphological and molecular characteristics were determined. In the following, different concentrations of salicylic acid (SA) either individually or in combination with different Trichoderma species were investigated in the laboratory and greenhouse on strawberry gray mold.

Results: In the comparison of averages, the highest percentage of inhibition in the cross-culture between Trichoderma spp and Botrytis sp. is related to T. orientalis (60.82%), the highest percentage of inhibition of the extracellular secretions of Trichoderma isolates on the growth of Botrytis in each two concentrations of 15 and 30% related to T. ceramicum was 85.57% and the effect of volatile compounds of different Trichoderma species on the growth of B. cinerea showed that the highest percentage of inhibition was related to the treatment of T. asperellum isolate with 63.70%. Investigating the effect of salicylic acid in preventing the mycelium growth of botrytis fungus in the laboratory showed that with increasing concentration of salicylic acid from 1 to 2 millimolar, the inhibition percentage of Botrytis cinera increased to 61%.

Conclusion: The results of the experiment showed that the use of some Trichoderma species along with salicylic acid increases the resistance and control of strawberry to gray mold disease in the field and laboratory.

Keywords: Biological control, strawberry gray mold, Trichoderma sp., Kurdistan.

Received: 5 January 2023 Revised: 13 March 2023 Accepted: 19 May 2023

Correspondence to: Saghi younesi baneh
Tel: +98 9188786427
E-mail: Saghiyounesi000@gmail.com
Journal of Microbial World 2023, 16(1): 72 - 88
DOI:10.30495/jmw.2023.1968386.2037

Copyright © 2019, This article is published in Journal of Microbial World as an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License. Non-commercial, unrestricted use, distribution, and reproduction of this article is permitted in any medium, provided the original work is properly cited.

مجله دنیای میکروب‌ها
سال شانزدهم شماره اول (پیاپی ٥٤) بهار ١٤٠٢
صفحات ٨٨-٧٢

Original Article

کنترل قارچ عامل کپک خاکستری توت‌فرنگی با کاربرد تلفیقی گونه‌های مختلف تریکودرما و سالیسیلیک‌اسید

ساقی یونسی بانه[1*]، مهرداد صالح زاده[2]، محمدجواد سلیمانی پری[3]

[1]کارشناسی ارشد، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران. [2]دانشجوی دکتری، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، مرکز تحقیقات ویروس‌شناسی گیاهی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران. [3]دانشیار، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.

چکیده

سابقه و هدف: پوسیدگی ناشی از کپک خاکستری توت‌فرنگی (B. cinerea) یکی از مهم‌ترین پوسیدگی‌های خسارت‌زا روی این محصول از مزرعه تا بازار فروش است. هدف این پژوهش شناسایی عوامل کنترل بیولوژیک و ترکیبات القاءگر واکنش‌های دفاعی گیاه است که می‌توانند سبب کاهش یا قطع سم‌پاشی با ترکیبات قارچ‌کش روی محصول توت‌فرنگی شوند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش جدایه‌های مختلف B. cinerea ازگلخانه و مزارع استان کردستان جمع‌آوری و خصوصیات مورفولوژی و مولکولی آن‌ها تعیین شد. غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید (SA) به‌صورت منفرد و همچنین به‌صورت کاربرد تلفیقی با گونه‌های مختلف تریکودرما در آزمایشگاه و گلخانه روی قارچ کپک خاکستری توت‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در مقایسه میانگین‌ها، بیشترین درصد بازدارندگی در کشت متقابل بین تریکودرما و بوتریتیس، مربوط به جدایه T. orientalis (٦٠/٨٢ درصد) و و بیشترین درصد بازدارندگی ترشحات خارج‌سلولی جدایه‌های تریکودرما بر روی رشد پرگنه بوتریتیس در هر دو غلظت ١٥ و ٣٠ درصد، مربوط به T. ceramicum (٨٥/٥٧ درصد) بود. بررسی تاثیر ترکیبات فرار گونه‌های مختلف تریکودرما بر روی رشد پرگنه B. cinerea نشان داد بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به تیمار جدایه T. asperellum با ٦٣/٧٠ درصد است. بررسی تاثیرسالیسیلیک‌اسید در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ بوتریتیس در آزمایشگاه نشان داد که با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید از ١ به ٢ میلی‌مولار درصد بازدارندگی از قارچ افزایش تا ٦١ درصد می‌یابد.

نتیجه‌گیری: کاربرد برخی گونه‌های تریکودرما به‌همراه سالیسیلیک‌اسید باعث افزایش مقاومت توت‌فرنگی به بیماری کپک خاکستری در مزرعه و آزمایشگاه می‌شود.

کلمات کلیدی: کنترل بیولوژیک، کپک خاکستری توت‌فرنگی، تریکودرما، کردستان.

دریافت مقاله: ١٤٠١/١٠/١٥ ویرایش مقاله: ١٤٠١/١٢/٢٢ پذیرش مقاله: ١٤٠٢/٢/٢٩

مقدمه

توت‌فرنگی از جنس فراگاریا (*Fragaria* sp) و تیره رزاسه (*Rosaceae*) است که عموما گیاهانی علفی باساقه‌های رونده یا استولون هستند. مهم‌ترین ارقام توت‌فرنگی که در ایران کشت می‌شوند عبارتند از: گورلا، آلیسو، تیوگو، رد گانتلت، اسیتا، کاتس‌کیل و فرسنا (١). در سال ١٣٩٨سطح برداشت توت‌فرنگی در ایران حدود ٦٠ هزار تن تخمین زده شد (٢) و استان کردستان با کشت حدود ٣ هزارو ٤٠٠ هکتار و تولید ٤٦ هزار تن، ٨٠ درصد از تولید این محصول و رتبه اول را به‌خود اختصاص داده است (١). قارچ بیمارگر *B. cinerea*

* آدرس برای مکاتبه: گروه بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران.
تلفن: ٠٩١٨٨٧٨٦٤٢٧ پست الکترونیک: Saghiyounesi000@gmail.com

حقوق نویسندگان محفوظ است. این مقاله با دسترسی آزاد و تحت مجوز مالکیت خلاقانه (http://creativecommons.org/licenses/bync/4.0/) در فصلنامه دنیای میکروب‌ها منتشر شده است. هرگونه استفاده غیرتجاری فقط با استناد و ارجاع به اثر اصلی مجاز است.

یک بیمارگر مهم بوده و در مزرعه، انبار و در زمان حمل و نقل به سبزیجات، محصولات زینتی و نهال‌ها آسیب می‌زند. این قارچ در بیشتر مناطق دنیا از نواحی نیمه‌معتدل و سرد تا نیمه‌حاره به محصولات مختلف خسارت زده و علائمی از زخم‌های کوچک محدود تا پوسیدگی‌های خشک یا پوسیدگی‌های نرم با ظاهر آشکار کلونی‌های اسپورزای قارچ نشان می‌دهد (۳). بررسی این قارچ در تولید محصولات گلخانه‌ای از اهمیت فراوانی برخوردار است و قسمت‌های مختلف گیاه بخصوص برگ‌ها، گل، میوه، غده و ریزوم را در محصولات مهم مورد حمله قرار داده و مسئول خسارت‌های مهم قبل و پس از برداشت توت‌فرنگی است (٤). کنترل شیمیایی کپک خاکستری بسیار مشکل است و هنوز مقاومت طبیعی علیه این بیماری در ارقام توت‌فرنگی مشاهده نشده است. هزینه‌های جهانی برای کنترل *B. Vinerea* به راحتی از ۱ میلیارد یورو در سال فراتر می‌رود و با این‌حال، انتظار می‌رود که با وجود تمام اقدامات کنترلی، تأثیر کاهش کیفیت محصول بسیار بیشتر از این باشد (۵). علاوه‌بر این، پیامدهای بالقوه مضر مرتبط با استفاده از قارچ‌کش‌ها هم برای انسان و هم برای محیط‌زیست، انگیزه‌ای برای توسعه رویکردهای مدیریت جایگزین و یا مکمل است. این عوامل منجر به ارزیابی عوامل بیوکنترل بالقوه‌ای شده است که قادربه کنترل قابل توجه بیماری در سیستم‌های مدیریت یکپارچه محصول هستند (٦). کنترل شیمیایی به‌عنوان راه‌کار اصلی برای کاهش پیشرفت بیماری در نظر گرفته می‌شود. این قارچ به‌دلیل تنوع ژنتیکی بالا، سیکل کوتاه زندگی و تولیدمثل فراوان پتانسیل زیادی در مقاومت به قارچ‌کش‌ها دارد. قارچ‌کش‌ها منجربه کاهش خسارت قارچ روی محصول می‌شوند اما تکرار استفاده از گروه‌های متعددی از قارچ‌کش‌ها منجربه توسعه مقاومت در قارچ می‌شود. با این‌حال، علاوه‌بر اثرات مخرب آن‌ها بر محیط‌زیست و خطرات بالقوه برای سلامت انسان، افزایش مقاومت به قارچ‌کش‌ها در جمعیت‌های *B. cinerea* مشاهده شده است (۷).

گونه‌های قارچ تریکودرما (*Trichoderma* spp.) از جمله عواملی به شمار می‌روند که به صورت بالقوه از مهم‌ترین عوامل کنترل بیولوژیکی علیه عوامل بیماری‌زای گیاهی مطرح می‌باشند، به‌طوریکه در حدود ٦۰ درصد از ترکیبات کنترل بیولوژیک بیمارگرهای گیاهی را به خود اختصاص می‌دهند. روش‌های کنترل طبیعی متعددی برای نحوه‌ی عملکرد آنتاگونیستی قارچ تریکودرما در شرایط طبیعی ذکر شده است، به‌طوریکه اثر آنتاگونیستی یک جدایه را می‌توان نتیجه‌ی مجموعهٔ فرآیندهایی دانست که به صورت: اثر مستقیم روی بیمارگر همچنین، به صورت غیرمستقیم با افزایش مقاومت گیاه به بیمارگر در برهمکنش گیاه بیمارگر اعمال می‌شود. با این‌حال در استفاده از قارچ تریکودرما تکیه بیشتری بر تاثیر مستقیم قارچ تریکودرما بر بیمارگر می‌باشد. در این حالت قارچ تریکودرما با تولید آنزیم‌های تجزیه‌کننده و ترکیبات سمی و آنتی‌بیوتیک‌ها منجربه از بین رفتن بیمارگرهای گیاهی هدف قبل از نفوذ به بافت گیاهی می‌شوند. تریکودرما می‌تواند با تولید موادی شبه فیتوهورمونی مانند سیتوکینین، زئاتین، جیبرلین، ایندول استیک اسید و اتیلن سبب افزایش رشد گیاه و بهبود جذب مواد غذایی در گیاه شود؛ از طرفی با القاء مقاومت سیستمیک (ISR و SAR) در گیاه منجربه کاهش گسترش بیماری در گیاه شود. تولید آنزیم‌های مختلف و از بین بردن عوامل بیماری‌زا قبل از نفوذ به درون میزبان جزء مهم‌ترین روش‌های قارچ تریکودرما هستند. از جمله مهم‌ترین این آنزیم‌ها، کیتینازها، پروتئازها، لیپازها و گلوکانازها بوده که سبب از بین بردن دیواره سلولی سلول‌های هدف می‌شوند (۸).

اسیدسالیسیلیک (SA) به‌عنوان یک فنولیک فیتوهورمون نقش‌های متفاوتی در فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله رشد، توسعه، فتوسنتز، تعرق، جذب یون و انتقال دارد. در سیستم ایمنی گیاهان، بیشترین نقش ذکرشده برای SA در پاسخ‌های ایمنی به‌عنوان یک مولکول سیگنال درون‌زا، در درجه اول در ایجاد ایمنی در برابر پاتوژن‌های مختلف و همچنین در ایجاد مقاومت اکتسابی سیستمیک (SAR) با القای بیان پروتین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (PR Proteins) در برابر طیف وسیعی از

عوامل بیماری‌زا است (٤). اگرچه، تمام زوایای مکانیسم مقاومت گیاه با میانجی‌گری SA آشکار نیست ولی به‌طورکلی نقش کلیدی SA در دفاع گیاه در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا پذیرفته شده است. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده خارجی از SA یا آنالوگ‌های عملکردی آن، مانند بنزو- (۱، ۲، ۳)-تیادیازول-۷ -کربوتیوئیک اسید اس متیل استر (BTH) و ۲-٦ دی کلرو ایزونیکوتونیک اسید می‌توانند واکنش دفاعی سیستمیک در گیاه را القاء کنند (۹).

در این تحقیق کاربرد غلظت‌های مختلف سالیسیلیک‌اسید به‌صورت منفرد و یا همراه با گونه‌های مختلف قارچ *تریکودرما* (*Trichoderma* spp.) روی قارچ عامل کپک خاکستری توت‌فرنگی قبل و پس از برداشت در استان کردستان مورد بررسی و نتایج حاصل از آن مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

قارچ *بوتریتیس* عامل کپک خاکستری توت‌فرنگی از مزارع تحت‌کشت هیدروپونیک توت‌فرنگی استان کردستان نمونه‌برداری شد و جدایه‌های مختلف این قارچ روی محیط کشت Potato Dextrose Agar (PDA) کشت شدند. برای تهیه‌ی جدایه‌ی خالص قارچ از روش تک‌اسپور کردن قارچ توسط محیط کشت Water Agar (WA) استفاده شد. جدایه‌های خالص *بوتریتیس* در لوله‌هایی حاوی محیط کشت PDA سربسته درون انکوباتور قرار گرفتند و پس از رشد قارچ در دمای ٤ درجه سلسیوس نگهداری شدند. برای شناسایی جدایه‌های مختلف قارچ، تمام جدایه‌ها به‌مدت ۷ روز در روشنایی کامل در محیط کشت PDA در دمای ۲۰ الی ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند (۱۰). در ادامه طول کنیدیوفور، ابعاد کنیدی، شکل و رنگ پرگنه قارچ، اندازه‌ی اسکلروت و نحوه‌ی پراکندگی اسکلروت روی پرگنه قارچ مورد بررسی قرار گرفت. آزمون بیماری‌زایی مطابق روش ریگوتی (Rigotti) و همکاران در سال ۲۰۰۷ (۱۰) روی میوه‌ها با سه تکرار (هر تکرار شامل ٦ میوه درون یک جعبه) و شش جدایه‌ی مختلف قارچی انجام شد (شکل ۱).

الف) استخراج DNA به روش اصلاح‌شده موری و تامپسون: برای استخراج DNA از جدایه‌های خالص‌شده قارچ *بوتریتیس* از روش مورای و تامسون (Murray و Thompson) در سال ۱۹۸۰ (مشابه استخراج DNA از سلول‌های گیاهی با کمی تغییرات) استفاده شد (۱۱). میسلیوم منجمد به کمک ازت مایع پودر و میزان ۰/۲ گرم از آن به لوله‌های ۲ میلی‌لیتری منتقل شد. مقدار ۸۰۰ میکرولیتر از بافر استخراج NaCl ،CTAB3 % (W/V) ،%2 PVP- 40 , EDTA 20mM ،1/4M Tris-HCl mM و ۰/۲ درصد مرکاپتواتانول به هر نمونه اضافه شد و در حمام آبگرم به‌مدت ۳۰ دقیقه در ٦۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. ٦۰۰ میکرولیتر از مخلوط کلروفرم‌ایزوامیل الکل (۱:۲٤) به هر لوله اضافه و چندین مرتبه به‌آرامی تکان داده شدند. پس از اختلاط کامل، به‌مدت ۱۵ دقیقه با شتاب g ۲۷۸۰۰ در ٤ درجه سلسیوس سانتریفوژ شده، سپس مایع فوقانی برداشته شده و درون لوله سترون جدیدی ریخته شد. سپس به اندازه حجم محلول به آن ایزوپروپانول سرد (۲۰°C-) اضافه و به‌آرامی محلول داخل لوله‌ها مخلوط شدند تا کلاف DNA تشکیل شود. سپس ۲۰ دقیقه در دمای ۲۰- درجه سلسیوس قرار داده شده و در g ۲۷۸۰۰ در ٤ درجه سلسیوس برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد تا DNA در پایین لوله‌ها رسوب کند. به لوله‌های محتوی رسوب DNA، ۳۰۰ میکرولیتر الکل اتانول سرد اضافه و به‌مدت ۵ دقیقه در ٤ درجه سلسیوس در ۱۳۰۰ دور سانتریفوژ شدند تا رسوب DNA شستشو داده شود. آغازگرهای مورد استفاده در واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز (PCR) از شرکت Metabion international AG کره جنوبی تهیه شدند (C729+:) 5'-AGCTCGAGAGAGATCTCTGA-3' و (C729-:5'-CTGCAATGTTCTGCGTGGAA- 3'). واکنش زنجیره‌ای پلی‌مراز در واکنش‌های ۲۵ میکرولیتری در دستگاه PCR شرکت Techne با مدل FTGENE2D و یا مدل FFG02HSD انجام شد. مواد لازم برای انجام یک واکنش ۲۵ میکرولیتری شامل۰/۵میکرولیتر dNTPs ۱۰میلی‌مولار، ۱ میکرولیتر آغازگر شروع (۱۰ میکرومولار)، ۱ میکرولیتر آغازگر

برگشتی(۱۰ میکرومولار)، ۲/۵ میکرولیتر بافر (10x)، ۰/۷۵ میکرولیتر منیزیم کلراید (50 mM) و ۰/۲۵ میکرولیتر *Taq* DNA polymerase (5 U/µl) انجام و در نهایت حجم کل واکنش توسط آب دیونیزه به ۲۵ میکرولیتر رسانده شد. چرخه‌ی واکنش شامل یک چرخه ۵ دقیقه‌ای واسرشتگی اولیه (Initial denaturation) در دمای ۹۴ درجه‌ی سلسیوس، ۳۰ چرخه شامل: ۱ دقیقه واسرشتگی (Denaturation) در دمای ۹۴ درجه سلسیوس، ۲دقیقه مرحله‌ی اتصال (Annealing) در دمای ۵۵ درجه‌ی سلسیوس، ۳ دقیقه مرحله‌ی سنتز در دمای ۷۲ درجه‌ی سلسیوس و درنهایت سنتز نهایی به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. تفاوت در منطقه ITS در DNA ریبوزومی برای تشخیص گونه‌ها بسیار سودمند است اما در جنس بوتریتیس تفاوت در این ناحیه کم بوده و برای طراحی آغازگر اختصاصی مناسب نیست. آغازگرهای اختصاصی مناسبی وجود دارند که در ردیابی و شناسایی جدایه‌های *B. cinerea* استفاده می‌شوند. در این پژوهش به‌منظور تائید قطعی و اطمینان از شناسایی جدایه‌های قارچ مورد نظر (۱۹ جدایه) از آغازگرهای اختصاصی CV۲۹ برای شناسایی ۱۹ جدایه *بوتریتیس* استفاده شد (۹). انتظار می‌رفت با این آغازگرها قطعاتی به اندازه ۷۰۰ جفت‌باز که مختص گونه‌های *B. cinerea* هستند، تکثیر شوند (جدول ۱).

ب) خالص‌سازی محصول PCR: محصول PCR در ژل آگاروز یک درصد الکتروفورز شد و قطعات مورد نظر با استفاده از کیت استخراج از ژل (QIAGEN) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده خالص‌سازی صورت گرفت.

ج) بررسی خواص ضدقارچی گونه‌های مختلف تریکودرما: برای بررسی خواص ضدقارچی *تریکودرما*، ۱۰ گونه *تریکودرما* شامل گونه‌هایی که توسط نظمی و همکاران در سال ۹۵ به کمک روش‌های مورفولوژیکی و مولکولی شناسایی شده بود بازکشت شد (۱۳). گونه‌های مختلف تریکودرمای موجود در این تحقیق عبارت بودند از: *T.orientalis, T. ceramicum, T. koningii, T. koningiopsisi, T. virens, T. viridiscense, T. atroviridae, T. asperellum, T. harzianum, T. brevicompactum*

برهمکنش این گونه‌ها با SA روی قارچ *بوتریتیس* مورد سنجش قرار گرفت.

د) آزمون کشت متقابل: آزمون کشت متقابل مطابق روش دینگ (Ding) و همکاران در سال۲۰۰۲ انجام شد (۵). برای هر جدایه از *تریکودرما* ٤ تکرار در نظر گرفته شد. میزان رشد پرگنه‌ی قارچ *بوتریتیس* ٤٨-٧٢ ساعت بعد از کشت با معادله ۱ محاسبه شد. در این پژوهش توانایی جدایه‌های *تریکودرما* در استقرار روی هیف، تولید اسپور قارچی، ایجاد یا عدم ایجاد هاله‌ی بازدارنده، عبور از هاله و استقرار روی قارچ نیز مورد بررسی قرار گرفت.

ه) بررسی تاثیر ترکیبات خارج‌سلولی قارچ تریکودرما: برای بررسی تاثیر ترکیبات خارج‌سلولی قارچ *تریکودرما* در بازدارندگی از رشد قارچی *بوتریتیس* از محیط کشت PDA استفاده شد. سه حلقه‌ی میسلیومی به قطر یک سانتی‌متر از محیط کشت PDA سه‌روزه از جدایه‌های *تریکودرما* در ارلن‌های حاوی محیط کشت PDA در داخل شیکر چرخان (۱۰٤ دور در دقیقه) به‌مدت ۱۵ روز در دمای ۲۳-۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از ۱۵ روز محتویات ارلن به وسیله‌ی میلی‌پور و میکرو خلاء و با استفاده از میکروفیلترهای ۰/۲۲ صاف شده و عصاره‌ی *تریکودرما* تهیه شد. عصاره‌ی *تریکودرما* در این تحقیق با غلظت‌های ۱۵ درصد و ۳۰ درصد استفاده شد. محیط در پتری‌های استریل ریخته شد و بعد از گذشت ٢٤ ساعت و اطمینان از عدم آلودگی محیط‌ها، حلقه‌های میسلیومی به قطر ۵ میلی‌متر از محیط کشت ۵ روزه *بوتریتیس* در مرکز پتری‌های حاوی جدایه‌های مختلف تریکودرما قرار گرفت. برای هر گونه *تریکودرما* ۳ تکرار در نظر گرفته شد. این آزمایش در قالب طرح فاکتوریل دوعاملی (گونه‌های *تریکودرما* و غلظت عصاره‌ها) با سه تکرار، ۷۲ ساعت پس از کشت قارچ *بوتریتیس* انجام شد. تمامی تیمارها با آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ ثبت و اندازه‌گیری شد. در هر مورد سطح بازدارندگی با رابطه ۱ محاسبه شد. بررسی تاثیر مواد خارجی فرار عصاره‌ی *تریکودرما* روی رشد قارچ عامل *بوتریتیس* در قالب یک طرح کاملا تصادفی با سه تکرار بر

اساس روش راسل و فیدمن (Rossle و Feedman) در سال ۱۹۹۳ انجام شد (۱۳). نتایج ٦ روز بعد از رشد قارچ با معادله ۲ ثبت و اندازه‌گیری شد.

معادله ۱: درصد بازدارندگی = (رشد قارچ در پتری حاوی تیمار– رشد قارچ در پتری شاهد) / رشد قارچ در پتری شاهد ۵ میلی‌متر×۱۰۰

معادله ۲: درصد بازدارندگی روی *بوتریتیس* = (قطر پرگنه تیمار– قطر پرگنه شاهد)/ قطر پرگنه شاهد – ۵ میلی‌متر × ۱۰۰

و) بررسی تاثیر جدایه‌های تریکودرما در شرایط مزرعه: پتری حاوی پرگنه‌های تازه‌کشت از جدایه‌های *تریکودرما* با ٤ تکرار از هر جدایه به غلظت 4×10^{5} spore/ ml با روش براون (Braun) و همکاران در سال ۱۹۸۷ تلقیح شد (١٤). برای بررسی تاثیر هر جدایه کرت‌هایی به مساحت ۳ ×٦ متر مربع انتخاب و قبل از تلقیح گیاهان با تیمار، میوه‌های آلوده و آسیب‌دیده از مزرعه خارج شدند. محلول‌پاشی کل کانوپی گیاه با سوسپانسیون *تریکودرما* انجام شد. این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار (برای هر تیمار سه کرت)، هر تکرار شامل ۳۰ بوته و ۱۲ تیمار شامل ۱۰ جدایه‌ی قارچی و شاهد سالم و آلوده انجام شد. بعد از گذشت ۵ روز، تعداد میوه‌های سالم و آلوده‌ی هر کرت شمارش و داده‌ها با نرم افزار SAS مورد ارزیابی قرار گرفت.

ز) بررسی تاثیر تیمارهای SA بر روی کنترل بوتریتیس در شرایط مزرعه: برای بررسی اثر SA از سه غلظت ۱، ۲ و ٤ میلی‌مولار SA با pH: ۲/۵ استفاده شد. محلول‌پاشی روی بوته‌ها در حد خیس شدن کامل زمانی‌که ۷۵ درصد سطح میوه رنگ قرمز گرفته بود (رسیدگی تجاری) انجام شد. سه روز پس از تیمار، حفره‌هایی به عمق و عرض ۳ میلی‌متر ایجاد و سوسپانسیون کنیدی قارچ عامل بیماری در حفره‌های ایجاد شده تزریق شد. از روش وینل (Vinale) و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۱۵) برای تیمار قبل از برداشت وتلقیح میوه‌ها استفاده شد. فراوانی بیماری با شمارش میوه‌های آلوده پس از گذشت ٤ روز در هر تیمار تعیین و ثبت شد. این آزمایش در قالب طرح بلوک کامل تصادفی با سه تکرار (سه کرت مزرعه) برای هر تیمار و هر تکرار شامل سی بوته (یک میوه در هر بوته) و پنج تیمار (غلظت‌های آزمایش ۱، ۲ و ٤ میلی‌مولار سالیسیلیک اسید، شاهد سالم و شاهد آلوده) در مزرعه انجام شد. تهیه محلول‌های سالیسیلیک اسید بر طبق معادله ۳ انجام شد:

معادله ۳: غلظت مورد نظر= مقدار مول / حجم

ح) بررسی تاثیر کاربرد تلفیقی پس از برداشت تیمارهای SA و تریکودرما در کنترل بیماری: میوه‌های توت‌فرنگی از مزرعه برداشت و به آزمایشگاه منتقل شدند. میوه‌ها با اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شده و روی کاغذ استریل کاملا خشک شد. در ادامه میوه‌ها در تیمار SA با غلظت ۱، ۲ و ٤ میلی‌مولار به‌مدت ۵ دقیقه غوطه‌ور شدند. بر روی میوه‌ها پس از خشک شدن حفره‌هایی به قطر و عمق ۳ میلی‌متر ایجاده شد و سپس با ۱۵ میکرولیتر از کشت تازه‌ی جدایه‌ی *T. harzianum* و قارچ *بوتریتیس* هر کدام با غلظت 4×10^{5} spore/ ml تلقیح شد. نمونه‌های تیمارشده در ۲۲ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از ۷۲ ساعت میزان رشد قارچ *بوتریتیس* و شدت بیماری روی میوه با سه درجه‌ی ۰، ۱ و ۲ (صفر: عدم رشد قارچ; ۱: رشد قارچ فقط در محدوده‌ی زخم و ۲: رشد قارچ فراتر از محدوده‌ی زخم) اندازه‌گیری شد. این آزمایش با ٤ تیمار (غلظت‌های SA و جدایه‌ی *T. harzianum*) و ۳ تکرار هر کدام شامل ۱۰ عدد میوه انجام شد. رابطه‌ی شدت بیماری با رابطه‌ی $b\times a / k\times N$ محاسبه شد که در آن a تعداد میوه آلوده، b درجه آلودگی، k بالاترین درجه آلودگی و n تعداد کل میوه‌های مربوط به هر تیمار بود (۱۰).

ط) بررسی تاثیر مستقیم SA روی قارچ عامل بیماری در آزمایشگاه: در این روش محلول SA تهیه‌شده با غلظت‌های ۱، ۲ و ٤ میلی‌مولار SA در ۳ میلی‌لیتر آب حل، با ۹۷ میلی‌لیتر محیط PDA ترکیب و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. این محیط درون پتری‌های استریل ریخته شد و 4×10^{5}spore/ ml قارچ عامل بیماری در مرکزپتری قرار گرفت. پتری شاهد حاوی PDA بدون تیمار SA بود. پتری‌ها به انکوباتور با دمای ۲۲ درجه‌ی سلسیوس منتقل شدند و قطر پرگنه قارچ ٤٨، ۷۲، ۹٦ و ۱۲۰ ساعت بعد اندازه‌گیری شد. این آزمایش با ٤

تیمار (۳ غلظت SA و تیمار شاهد) و ٦ تکرار طبق معادله ٤ انجام شد.

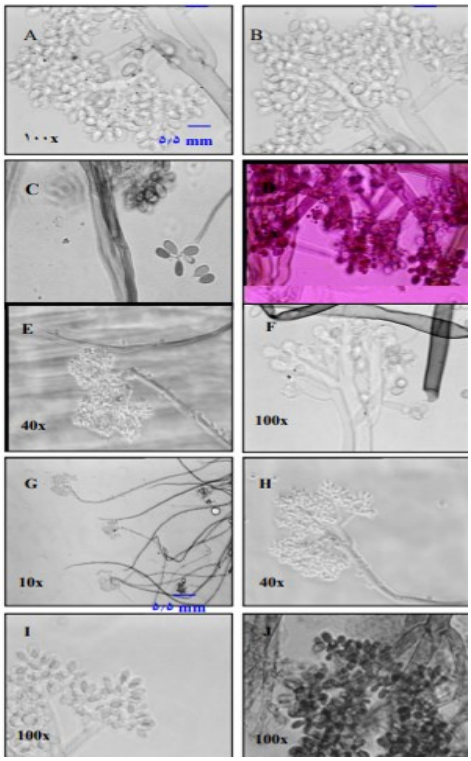
معادله ٤: میزان جلوگیری از رشد قارچ = قطر پرگنه تیمار – قطر پرگنه شاهد/ قطر پرگنه شاهد × ۱۰۰

یافته‌ها

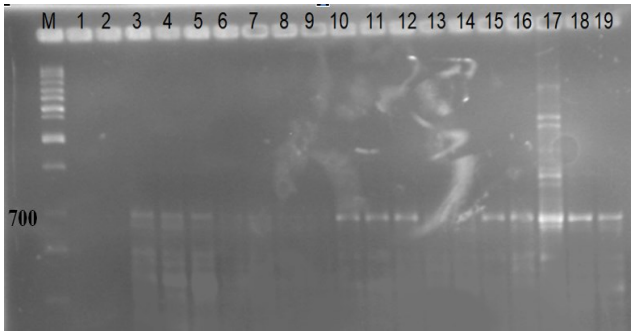
الف) شناسایی مورفولوژیک قارچ B. cinerea: در جدایه‌های جمع‌آوری شده، فرم‌های رشد مختلف از لحاظ اسپوردهی متعدد و انبوه، رشد میسلیومی بسیار زیاد و اسپوردهی بسیار کم، حالت حد واسط بین این دو فرم رشد وپرگنه‌های با اشکال مختلف دیده شد.

اسکلروت‌ها به‌طور مجتمع در یک بخش از محیط کشت، به‌صورت دوایر متحدالمرکز و یا منظم روی یک دایره، یا به‌طور پراکنده و نامنظم، در محیط کشت تشکیل شده و اسکلروت‌های کوچک یا بزرگ و بی‌شکل، قلوه‌ای شکل، بسیارکوچک و دایره‌ای شکل، سیاه‌رنگ یا تیره و به رنگ سبز لجنی بودند. کنیدیوفورها منشعب و باریک، شفاف و در انتها بیرنگ بودند. هیف‌های قارچ صاف، قهوه‌ای رنگ و گاهی در برخی از جدایه‌ها، در نقاطی از هیف فرورفتگی وجود داشت. طول کنیدیوفورها به طور متوسط ۲٦/۲٤ میکرومتر بود. کنیدی‌ها به رنگ روشن تا قهوه‌ای بود. متوسط ابعاد کنیدی در جدایه‌ها ٦/۷٦ × ۸/٦۹ میکرومتر بود. برطبق خصوصیات مورفولوژیکی، جدایه‌های موجود در محدوده گونه بوتریتیس‌سینرا بودند (شکل ۱).

ب) الکتروفورز محصولات PCR: از بین ۱۹ جدایه، دو جدایه ۱ و ۲ باند نداشتند، جدایه ۱۷ علاوه‌براین باند، باندهای کاذب دیگر را هم تکثیر کرد و سایر جدایه‌ها باند ۷۰۰ bp را به‌صورت تک‌باند واضح یا باند ضعیف تکثیر کردند (شکل ۲). این آزمایش دوباره انجام شد و در جدایه‌هایی که قبلا باند نداشتند این قطعه تکثیر شده و عدم حضور باند مذکور ناشی از خطای آزمایش بود.



شکل ۱: قسمت‌های مختلف *B. cinerea*، (A-J) کنیدی و کنیدیوفور و دسته‌های اسپور روی بخش‌های متورم آمپولا در جدایه‌ها، و (F) بخش‌های متورم آمپولا و استریگما در انتهای کنیدیوفور قارچ.



شکل ۲: نتیجه واکنش PCR جدایه‌های قارچ *B. cinerea* با آغازگرهای اختصاصی ۷۲۹ ± ۱C تا ۱۹ DNA جدایه‌های مختلف قارچ *B. cinerea*. M: مارکر Kb ۱.

ج) آزمون بیماری‌زایی جدایه‌ها: پس از خالص‌سازی و نگهداری جدایه‌ها، تست بیماری‌زایی جدایه‌های موجود بر طبق روش ریگوتی (Rigotti) و همکاران در سال ۲۰۰۲ (۱۰) در روی میوه انجام شد. در این آزمون براساس مقایسه میانگین‌ها و محاسبه میانگین قطر لکه‌های بافت‌مرده حاصل از آلوده‌سازی میوه توت‌فرنگی با جدایه‌های مختلف قارچی،

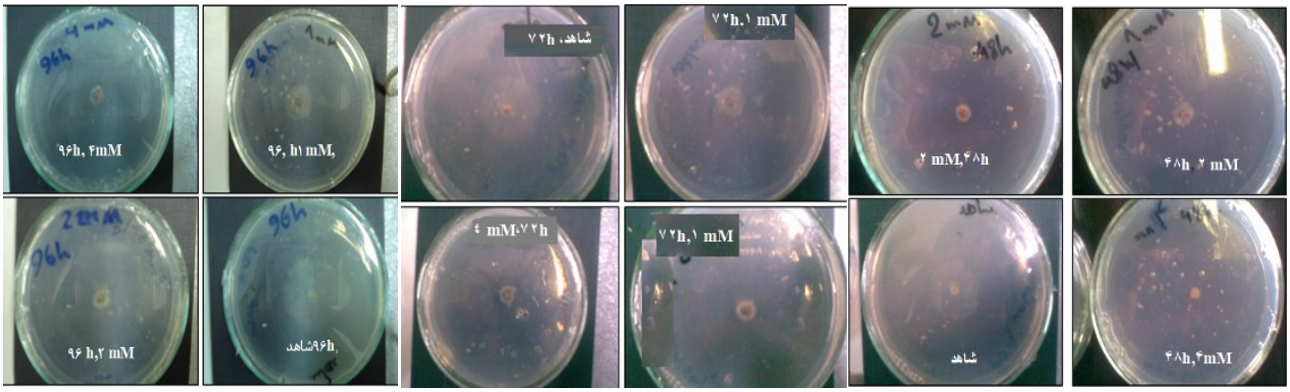
بیماری‌زایی جدایه‌های مورد آزمایش مقایسه شده و قوی‌ترین جدایه از نظر بیماری‌زایی برای انجام آزمایشات بعدی انتخاب شد. در این آزمایش جدایه R10 بیشترین اندازه لکه بافت مرده (۳/۰۸ سانتی‌متر) را ایجاد کرده و بنابر میانگین قطر لکه‌های بافت‌مرده ایجادشده، بیشترین شدت بیماری‌زایی را داشت (جدول ۱). با توجه به این‌که در ابتدای آزمایشات انجام‌شده، جدایه‌های موجود فقط شامل شش جدایه مزرعه‌ای و یک جدایه گلخانه‌ای (R6) بود.

میانگین قطر لکه بافت‌مرده روی میوه توت‌فرنگی که در این بررسی با جدایه‌های جمع‌آوری شده از مزارع توت‌فرنگی و یک جدایه از گلخانه، انجام شد شامل: R11 (۱/۹۱)، R10 (۳/۰۸)، R13 (۳)، R16 (۲/۲۵)، R17 (۲)، R19 (۲/۳) سانتی‌متر بود. بر طبق داده‌های به‌دست‌آمده، جدایه R10 با بیشترین شدت بیماری‌زایی برای انجام آزمایشات بعدی انتخاب شد. داده‌های آزمایش میانگین سه تکرار و هر تکرار با ۱۲ عدد میوه انجام شد.

د) اثر بازدارندگی ماده سالیسیلیک اسید در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ بوتریتیس در آزمایشگاه: نتایج آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید از ۱ به ۲ میلی‌مولار درصد بازدارندگی این ماده افزایش می‌یابد و در غلظت ٤ میلی‌مولار، میزان درصد بازدارندگی این ماده نسبت به ۲ میلی‌مولار، تفاوتی مشاهده نشد. بر اساس نتایج تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد. در مقایسه میانگین‌ها تفاوت معنی‌داری بین تیمار ۱ و ۲ میلی‌مولار وجود داشت و تیمار ۲ و ٤ میلی مولار اختلاف معنی‌داری نداشتند. به‌طوریکه، در غلظت ۱ میلی‌مولار (T1)، کمترین درصد بازدارندگی (۷۰/۸۹) و در غلظت ۲ و ٤ میلی‌مولار (۸۲/۸۹) T2 و (۸۹/۹۹) T3 درصد بازدارندگی مشابه بود. میانگین قطر رشد پرگنه با افزایش غلظت سالیسیلیک‌اسید کاهش یافته T1 (۱۵/۹۵) میلی‌متر، T2 (۸/۰۵ میلی‌متر)، T3 (۷/۸۳ میلی‌متر) و کنترل (۳۸/۵۸ میلی‌متر) و درصد بازدارندگی سالیسیلیک‌اسید افزایش می‌یابد.

در بررسی تاثیر سالیسیلیک‌اسید بر روی رشد میسلیومی قارچ با زمان، میانگین درصد بازدارندگی با افزایش زمان انکوباسیون، به‌تدریج کاهش یافت. اگرچه این میزان کاهش درصد بازدارندگی زیاد چشمگیر نبوده و پس از گذشت ٤ روز، میزان بازدارندگی این ماده روی رشد قارچ ۷۵ درصد بود. چنان‌که نتایج آزمایش نشان می‌دهد این ماده تاثیر ضدقارچی مستقیم داشته و افزایش غلظت آن تا غلظت ۲ میلی‌مولار از این ماده باعث افزایش این اثر می‌شود و پس از آن، افزایش غلظت بیشتر از ۲ میلی‌مولار تاثیری در کاهش رشد قارچ و افزایش بازدارندگی ندارد (شکل ۳).

داده‌های آزمایش بر حسب میانگین ٦ تکرار می‌باشند. آنالیز تجزیه واریانس در این آزمایش و آزمایشات بعدی با احتمال خطای $\alpha < ۰/۰۰۰۱$ و مقایسه میانگین‌ها برمبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT2) با احتمال خطای کمتر از ۵ درصد محاسبه شد.



شکل ۳: تاثیر غلظت‌های سالیسیلیک اسید در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *B. cinerea* در محیط کشت PDA پس از ٤٨ ساعت.

ه) بررسی تاثیر کاربرد سالیسیلیک‌اسید در شرایط مزرعه: در بررسی تاثیر سالیسیلیک‌اسید در مزرعه با سه تیمار شامل غلظت‌های ۱، ۲ و ٤ میلی‌مولار محلول سالیسیلیک‌اسید، در میزان بازدارندگی کپک خاکستری در روی میوه‌های توت‌فرنگی روی بوته، پس از گذشت ۳ روز از محلول‌پاشی بوته‌ها و ٤ روز پس از تلقیح میوه‌ها، میزان فراوانی بیماری در کرت‌های مربوط به هر تیمار با شمارش میوه‌های آلوده در تیمارها و شاهد آلوده و سالم، ارزیابی و ثبت شد. براساس نتایج به‌دست‌آمده و بر اساس نتایج تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد. در مقایسه میانگین فراوانی بیماری، تیمار ۱ با تیمارهای ۲ و۳ و گیاهان شاهد تفاوت معنی‌دار داشت. بیشترین فراوانی مربوط به تیمار شاهد آلوده بود و پس از آن تیمار ۱ میلی‌مولار سالیسیلی‌اسید فراوانی بیشتری نسبت به بقیه موارد داشت. تیمار ۲ و ۳ در این آزمایش با غلظت‌های ۲ و ٤ میلی‌مولار در میزان فراوانی بیماری مربوطه تفاوت معنی‌دار نداشتند. با افزایش غلظت سالیسیلیک اسید فراوانی بیماری کاهش یافت اما در سطح ۲ میلی‌مولار، افزایش غلظت سالیسیلیک اسید باعث کاهش بیماری نشد.

و) بررسی اثر جدایه‌های تریکودرما در کنترل کپک خاکستری در مزرعه: بررسی تاثیر جدایه‌های *تریکودرما* بر روی کپک خاکستری میوه توت‌فرنگی روی بوته در مزرعه با ۱۰ تیمار شامل ۱۰ جدایه *تریکودرما* انجام شد. تلقیح گیاهان پس از ۲٤ ساعت و شمارش و اندازه‌گیری فراوانی بیماری برحسب درصد میوه‌های آلوده در بین میوه‌های تلقیح شده ٤ روز پس از تلقیح میوه‌ها، صورت گرفت. بر اساس نتایج تجزیه واریانس، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد به طوری‌که در مقایسه میانگین‌ها، میانگین فراوانی بیماری مربوط به گیاهان شاهد آلوده از سایر تیمارها بیشتر بود. در مقایسه میانگین‌ها، ٦ گروه میانگین فراوانی با تفاوت معنی‌دار از یکدیگر مشاهده شد. در این میان بیشترین فراوانی بیماری متعلق به تیمار *T. harzianum* و کمترین میزان فراوانی بیماری متعلق به تیمارهای *T. atroviridae* و *T. koningii* بود (جدول ۱).

ز) بررسی اثر کشت متقابل تریکودرما بر رشد میسلیومی قارچ B. cinerea در آزمایشگاه: بر اساس نتایج تجزیه واریانس تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد. اثر تیمارها و اثر زمان و اثر متقابل هردو عامل در بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ معنی‌دار بود. با گذشت زمان درصد بازدارندگی جدایه‌های *تریکودرما* بر رشد قارچ افزایش یافت. در مقایسه میانگین‌ها بیشترین درصد بازدارندگی (در ۷۲ ساعت) مربوط به جدایه *T. orientalis* (۶۰/۸۲ درصد) و کمترین درصد بازدارندگی مربوط به جدایه‌های *T. brevicompactum* (۳۲/٤۰ درصد) و *T. atroviridae* (۳۲/۹۵ درصد) بود (جدول ۱). سایر جدایه‌ها حد متوسطی از بازدارندگی نشان دادند ولی در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌داری نداشتند. با گذشت زمان رشد و پیشروی جدایه‌ها در روی پرگنه قارچ بوتریتیس مشاهده شد. در تمام گونه‌های *تریکودرما* به غیر از *T. brevicompactum* کلونیزاسیون و پیشروی قارچ بعد از هاله بازدارنده مشاهده شد. در *T. brevicompactum* هاله بازدارنده ضعیفی تشکیل شد و تا روز ششم، رشد و پیشروی *تریکودرما* از هاله بازدارنده مشاهده نشد. در *T. atroviridae* رشد و پیشروی از هاله بازدارنده از روز ششم شروع شد در حالی‌که در سایر گونه‌ها تا روز ششم قارچ آنتاگونیست کاملا در روی پرگنه بوتریتیس رشد کرد. در *T. viridiscence* سرعت پیشروی و کلونیزاسیون بیشتری نسبت به *T. virense* مشاهده شد. کلونیزاسیون و پیشروی از هاله بازدارنده در گونه‌های *T. harzianum*، *T. asperellum*، *T. virens* و *T. viridiscence* در سطح پرگنه بوتریتیس بهتر از سایر گونه‌ها بود.

ح) تاثیر ترشحات خارج سلولی جدایه‌های تریکودرما در رشد پرگنه B. Cinerea: این آزمایش با ۹ جدایه تریکودرما و دو غلظت ۱۵ درصد و ۳۰ درصد ازعصاره‌های خارج‌سلولی *تریکودرما* انجام شده و ٤۸ و ۷۲ ساعت پس از کشت، قطر پرگنه قارچ اندازه‌گیری و داده‌ها بر اساس درصد بازدارندگی عصاره‌ها بر رشد پرگنه قارچ بوتریتیس محاسبه شد. نتایج آزمایش با نرم‌افزار SAS ارزیابی شد. تاثیر تیمارها، غلظت و زمان و اثر متقابل آن‌ها با یکدیگر معنی‌دار بود. میانگین درصد بازدارندگی گونه‌های *تریکودرما* با افزایش غلظت عصاره‌ها از

۳٤/۸٤ درغلظت ۱۵ درصد به ۵۳/۲۳ درصد در غلظت ۳۰ درصد از عصاره، افزایش یافت. همچنین با گذشت زمان، درصد بازدارندگی گونه‌های *تریکودرما* از ۳۷/٦۰ به ۵۰/۹٦ درصد به‌طور متوسط افزایش یافت. در مقایسه میانگین تیمارها در رابطه با غلظت‌های استفاده شده، بیشترین درصد بازدارندگی جدایه‌ها بر روی رشد پرگنه در هر دو غلظت ۱۵ و ۳۰ درصد مربوط به*T. ceramicum* به میزان ۸۵/۵۷ درصد بود (جدول ۱).

جدول ۱: میانگین فراوانی جدایه‌ها، تاثیر *تریکودرما* و ترشحات خارج سلولی گونه‌های مختلف آن بر روی رشد پرگنه *B. cinerea* بر حسب درصد بازدارندگی.

تیمار	میانگین فراوانی بیماری (درصد)	درصد بازدارندگی ترشحات مایع خارج سلولی گونه‌های *تریکودرما* روی کپک خاکستری توت فرنگی	درصد بازدارندگی گونه‌های *تریکودرما* روی کپک خاکستری توت‌فرنگی
T.brevicompactum	۱۰^{de}	٥٦/۳٥^{b}	۳۸/۸۳^{bc}
T. viridiscence	۲٦/٦^{b}	٤۷/۷۲^{bc}	۳۸/۱۱^{bc}
T. ceramicum	۱۰^{de}	۷۸/۱٦^{a}	٤۹/٤٦^{ab}
T. atroviridae	٦/٦^{e}	۳٦/۲٥^{c}	٦۲/٤٥^{bc}
T. harzianum	۳٦/٦^{a}	٦۱/۲۹^{ab}	۳۲/۹٥^{c}
T. orientalis	٦^{e}	۳۲/۲٤^{de}	٤۲/۷٦^{bc}
T. virens	۱۳/۳^{d}	۱٦/٦۱^{de}	۳۲/٤۰^{c}
T. asperellum	۲٦/٦^{b}	۹/۱۱^{e}	٦۰/۸۲^{a}
T. koningiopsis	۱۰^{de}	۵۷/۰۹^{b}	۳۵/٦۱^{bc}

اعداد جدول میانگین ۳ تکرار می‌باشند. میانگین‌های دارای حروف یکسان اختلاف معنی‌دار ندارند. اعداد میانگین جدول بر اساس درصد بازدارندگی گونه‌های تریکودرما بر رشد میسلیومی قارچ از سه تکرار به‌دست آمده‌اند. اعداد جدول میانگین درصد بازدارندگی هر تیمار در هر دو غلظت ۱۵ و ۳۰ درصد عصاره‌های استفاده شده است.

در بررسی تاثیر مواد فرار *تریکودرما* بر روی رشد میسلیومی قارچ *بوتریتیس*، ۱۰ جدایه تریکودرما استفاده شده و ٦ روز پس از کشت، نتایج آزمایش بررسی شد. براساس نتایج تجزیه واریانس در سطح احتمال کمتر از $\alpha <$ ۰/۰٤۵، تاثیر تیمارها در روی بازدارندگی رشد پرگنه *B. cinerea* معنی‌دار بود. در مقایسه میانگین‌ها بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد، تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد و بیشترین درصد بازدارندگی مربوط به تیمار جدایه *T. asperellum* با ٦۳/۷۰ درصد و کمترین درصد بازدارندگی مربوط به *T. brevicompactum* به میزان ۲/۹٦درصد بود (جدول ۲).

جدول ۲: تاثیر تیمارهای پس از برداشت *تریکودرما* و سالیسیلیک اسید روی شدت و فراوانی بیماری بر روی توت‌فرنگی در آزمایشگاه.

تیمار	شدت بیماری	فراوانی بیماری
تریکودرما و ۱/SA	۰/۳۰^{dc}	۰/۳۰^{dc}
تریکودرما و ۲/ SA	۰/۱۳^{d}	۰/۱٦^{d}
تریکودرما و ٤/SA	۰/۱٦^{d}	۰/۱۵^{d}
تریکودرما بدون تلقیح	۰/٤۰^{bdc}	۰/٤۰^{bdc}
تریکودرما با تلقیح استفاده شود	۰/٤۳^{bdc}	۰/۳۸^{bdc}
۱ /SA	۰/۸۳^{a}	۰/۷۳^{a}
۲ / SA	۰/۷۳^{ab}	۰/٦۱^{ab}
٤ / SA	۰/٦۳^{abc}	۰/٤۸^{abc}
شاهدسالم	۰/٤۰^{bdc}	۰/٤۰^{bdc}
شاهد آلوده	۰/۷۰^{ab}	۰/۵۳^{abc}

بحث

گیاهان توسط طیف متنوعی از موجودات در محیط اطراف خود احاطه شده‌اند، از جمله باکتری‌ها، قارچ‌ها، اوومیست‌ها، نماتدها، حشرات و ویروس‌ها. اگرچه برخی از این موجودات ممکن است تأثیر منفی بر روی گیاه داشته باشند، برخی دیگر ممکن است به‌صورت غیرمستقیم از راه کمک به سیستم دفاعی گیاه، یا با سرکوب مستقیم بیمارگرهای گیاهی اثرات مفیدی داشته باشند (۱٦). تحقیقات روی این گونه ارگانیسم‌های مفید در کنترل زیستی (BCOs) در دهه‌های اخیر تشدید شده و اهمیت آن‌ها به‌عنوان بخشی از شیوه‌های مدیریت یکپارچه برای کاهش استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی افزایش یافته است (۱۷). تحقیقات اولیه کنترل زیستی عمدتاً بر روی BCOs متمرکز بود که از طریق تعامل مستقیم با پاتوژن‌ها و ایجاد یک

اثر محافظتی عمل می‌کردند. جنس *تریکودرما* شامل تعداد زیادی از گونه‌های قارچی با ظرفیت BCO است. این گونه‌ها با شرایط محیطی متنوع سازگار هستند و اغلب از خاک جدا شده‌اند (۱۸). این موجودات تولیدکنندگان پرکار پروتین‌های خارج‌سلولی، از جمله آنزیم‌هایی هستند که سلولز و کیتین را تجزیه می‌کنند و به‌طور گسترده در صنعت استفاده می‌شوند (۱۹). علاوه‌بر این، ظرفیت آن‌ها برای کاهش بیماری‌های گیاهی با اثرات مستقیم و غیرمستقیم بر پاتوژن‌های گیاهی بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است (۲۰). ظرفیت تولیدمثلی بالا، توانایی زنده ماندن در شرایط نامساعد و راندمان بالای استفاده از مواد مغذی به موفقیت آن‌ها به‌عنوان BCO کمک می‌کند (۲۱). بسیاری از سویه‌های *تریکودرما* می‌توانند در ریشه‌های گیاهان دو لپه‌ای و تک‌لپه‌ای کلونیزه شوند و سیستم دفاعی القایی (ISR) در گیاه را تحریک کنند که در برابر طیف وسیعی از عوامل بیماری‌زا مؤثر است. با توجه به اینکه *Trichoderma* spp. همچنین قادربه زندگی آزادانه در خاک هستند، به‌عنوان همزیست‌های گیاهی فرصت‌طلب درنظر گرفته می‌شوند (۱۸) کاربرد *Trichoderma* spp. دربرابر یکی از مهم‌ترین پاتوژن‌های اقتصادی، قارچ نکروتروف *B. Vinerea*، مشاهدات جالبی را نشان داده است. این پاتوژن باعث بیماری در بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی، از جمله گیاهان زراعی متعدد شده و به اندام‌هایی مانند برگ، ساقه، میوه‌ها و گل‌ها، قبل و بعد از برداشت حمله می‌کند (٦). وقوع پوسیدگی نرم، همراه با فروپاشی بافت‌های پارانشیم، و متعاقب آن ظهور سریع توده‌های خاکستری قارچ نشان‌دهنده‌ی معمول‌ترین علائم روی برگ‌ها و میوه‌ها است که به آن کپک خاکستری می‌گویند (۲۱). این قارچ یک سبک زندگی نکروتروف غالب دارد، به این معنی که با تولید ترکیبات فیتوتوکسیک متنوع و آنزیم‌های تخریب‌کننده دیواره سلولی (CWDEs)، سلول‌های گیاه میزبان را می‌کشد و پس از آن از مواد مغذی سلول‌های مرده تغذیه می‌کند (۲۲). کنترل *Botrytis cinerea* به دلیل حالت‌های مختلف حمله، بقا در شرایط نامساعد برای دوره‌های طولانی مانند اسکلروت و توسعه سویه‌های مقاوم به قارچ‌کش‌ها دشوار است (۲۳). یکی از عوامل میکروبی مهم و کلیدی که پتانسیل زیادی برای کنترل بیماری *B.cinerea* نشان می‌دهد، جنس *تریکودرما* است. که به صورت مستقیم و غیرمستقیم (القای واکنش‌های دفاعی گیاه به کمک SA) به کنترل *B.cinerea* کمک می‌کند.

کورولف (Korolev) و همکاران در سال ۲۰۰۸ (۲٤) تاثیر سالیسیلیک‌اسید را روی رشد میسلیومی قارچ در محیط PDA-SA بررسی و مشاهده کردند سالیسیلیک‌اسید در غلظت ۲mM روی رشد میسلیومی قارچ *Monilia fructicola* اثر بازدارندگی مؤثری دارد. این میزان بازدارندگی با افزایش زمان انکوباسیون به تدریج کاهش یافت که به‌ترتیب پس از ٤٨، ۷۲ و ۹٦ ساعت، درصد بازدارندگی آن روی این قارچ، ٦٤/١ درصد، ٦٢/١ درصد و ٦٠/٥ درصد بود. نتایج آزمایش آن‌ها با نتایج حاصل از این پژوهش تقریبا مشابه بود. موران-دیز (Moran-Diez) و همکاران در سال ۲۰۰۹ (۲۵) اثر ضدقارچی سالیسیلیک‌اسید را بر روی رشد قارچ *Eutypa lata* بررسی کردند. نتایج بررسی‌های آن‌ها نشان داد که این ترکیب در غلظت ۱ میلی‌مولار فقط خاصیت ضدقارچی دارد و تغییراتی در داخل ساختارهای هیفی قارچ مشاهده نشد اما در غلظت ۲ میلی‌مولار یا بالاتر علاوه بر خاصیت ضدقارچی، هیف قارچ خالی از هر نوع اندامک قارچی (دیواره، واکوئل، میتوکندری و هسته) بود و خاصیت اسیدی بودن هم به خواص ضدقارچی آن افزوده شد. در تحقیقی که به‌طور مشابه در شرایط گلخانه توسط Bae و همکاران (۲۰۱۱) انجام شده بود، کاربرد سالیسیلیک‌اسید روی توت‌فرنگی در مراحل مختلف رشد گیاه، قبل از برداشت و پس از برداشت به صورت ترکیبی از سه غلظت ۱، ۲ و ٤ میلی‌مولار سالیسیلیک‌اسید صورت گرفت و شاخص پوسیدگی قارچی با درجه‌بندی پوسیدگی میوه در محدوده ۱ تا ۵ اندازه‌گیری شد. مقایسه میانگین‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد بررسی شد. شاخص پوسیدگی میوه به‌طور محسوس در توت‌فرنگی‌های تیمارشده با غلظت‌های ۱ و ۲ میلی‌مولار کاهش یافت و غلظت ۲ و ٤ میلی‌مولار از لحاظ شدت پوسیدگی قارچی تفاوتی با هم

نداشتند که این مطلب مشابه یافته‌های ما بود. به نظر می‌رسد که SA ملکول سیگنال اصلی در مسیر پیام‌رسانی مقاومت سیستمیک اکتسابی (ISR) باشد. علاوه‌بر این ترکیبات شیمیایی مشابه SA نیز توسعه یافته‌اند که به‌طور تجاری نیز مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۲۶و۲۷). به نظر می‌رسد که مقاومت‌های القایی حداقل در القای پروتین‌های وابسته به بیماری‌زایی سیستمیک نقش دارند (۲۷و۲۸). در این آزمایش کاربرد خارجی سالیسیلیک‌اسید در مرحله قبل از برداشت توت‌فرنگی در کنترل بیماری براساس فراوانی میوه‌های بیمار یعنی میوه‌هایی با رشد میسلیومی مشهود قارچ در سطح میوه، در بین ۳۰ بوته مورد بررسی قرار گرفت و هر سه تیمار در کاهش فراوانی بیماری در مقایسه با گیاهان تیمار نشده و شاهد آلوده موثر بودند و در مقایسه میانگین تیمارها با یکدیگر، تیمار ۲ و ٤ میلی‌مولار با یکدیگر اختلاف معنی‌دار نداشتند. این نتایج با مطالعات قبلی مبنی‌بر این‌که کاربرد خارجی سالیسیلیک اسید و مشتقات آن سیستم مقاومت گیاه را بر علیه بیماری‌ها راه‌اندازی می‌کند، منطبق می‌باشد. فرمن (Ferrman) و همکاران در سال ۲۰۰٤ (۲۹) تاثیر سه جدایه از *تریکودرما* را روی کپک خاکستری در شرایط گلخانه مورد بررسی قرار دادند و اثر کنترلی آن‌ها بر روی قارچ *B. cinerea* و *Colletotricum acutatum* را گزارش کردند. سالاس- مارینا (Salas-Marina) و همکاران در سال ۲۰۱۱ (۳۰) تست‌های بیوکنترلی را روی برگ‌های توت‌فرنگی انجام دادند. برگ‌های توت‌فرنگی به *B. cinerea* آلوده شده، ۲ تا ۵ هفته بعد با قارچ‌های آنتاگونیست شامل *Trichoderma viridae*، *Gliocladium roseum* و *Penecillium sp.* محلول‌پاشی شدند. آن‌ها تعداد کنیدیوفورهای *B. cinerea* را ۹۷ تا ۱۰۰ درصد کاهش دادند. همچنین اسپورزایی *بوتریتیس* روی برگ‌های زمستان‌گذران پیر در مزرعه را ٤۸ درصد و در برگ‌های سبز در مزرعه به میزان ۸۷-۵۳ درصد کاهش دادند. در تحقیقی که توسط امین (Amin) و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۳۱) در بررسی کنترل بیولوژیک عامل بیماری پوسیدگی طوقه و ریشه آفتابگردان (*Sclerotinia sclerotiorum*) در شرایط آزمایشگاهی انجام شده بود، در زمینه بررسی رقابت ساپروفیتی جدایه‌های مختلف *تریکودرما* روی این قارچ، سرعت و پیشروی جدایه‌های *T. harzianum* و *T. virens* زیاد و بیش از سایر جدایه‌ها بود به‌طوری‌که *T. virens* ۵ روز پس از کشت و *T. harzianum* ٦ روز پس از کشت متقابل به‌طور کامل سطح پرگنه *Sclerotinia* را پوشانده و از تشکیل اسکلروت نیز جلوگیری کردند. سایر جدایه‌ها نیز از لحاظ عملکرد در حد واسط این دو گروه بودند. در محدوده جدایه‌های استفاده شده در این آزمایش، تا اندازه‌ای نتایج حاصل با نتایج تحقیق نامبرده مشابه بود. هوانگ (Huang) و همکاران در سال ۲۰۱۰ (۳۲) برای کشت متقابل قارچ *B. cinerea* از جدایه‌های قارچی *T. hamatum*، *T. harzianum*، *T. viride* و *T. virens* و جدایه‌های قارچی دیگری غیر از تریکودرما ازجمله *Coniothyrium minitans*، *Talaromyces*، *Epicoccum*، *Gliocladium roseum*، *Penecillium aurantiogriseum*، *Penicillium griseofulvum* و جدایه‌های باکتریایی مختلف برای کنترل بیولوژیکی بیماری *بلایت* ساقه و جوانه در عدس، استفاده کردند و درصد بازدارندگی عوامل فوق ٦۵-۰ درصد بود. از عوامل قارچی و باکتریایی ذکرشده در مقیاس وسیع در مزرعه به صورت اسپری شاخ و برگ گیاه استفاده شد. سه جدایه باکتریایی و قارچ *T. hamatum* بیماری را کاهش داده و عملکرد محصول را افزایش داد. از بین جدایه‌های باکتریایی موثر و *T. hamatum*، گونه *T. hamatum* به‌عنوان عامل بیوکنترل سازگارتر و پایدارتر، معرفی شد. نتیجه تحقیق آن‌ها تاثیر موفقیت‌آمیز اسپری میکروبی بر شاخ و برگ گیاه به‌عنوان روشی موثر در کنترل این بیماری بود. متیس (Mathys) و همکاران در سال۲۰۱۲ (۳۳) اثر متقابل قارچ *B. cinerea* و *T. harzianum* جدا شده از بستر کشت گیاه توت‌فرنگی را برای کنترل بیولوژیک کپک خاکستری در توت‌فرنگی مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که رشد قارچ *بوتریتیس* توسط *تریکودرما* محدود شده و درصد بازدارندگی آن بر رشد شعاعی قارچ ۵۱ درصد است. هرموزا (Hermosa) و همکاران در سال۲۰۱۲ (۳٤) تاثیر عصاره کشت قارچ *تریکودرما*

T. harzianum را به‌طور مستقیم و با خالص‌سازی آنزیم پروتئاز از این عصاره و استفاده از آن به‌صورت آمیخته با محیط‌کشت روی رشد قارچ *Botrytis fabae* بررسی کردند. این عصاره با غلظت ۴۰u/ml، ۵۶ درصد و با غلظت ۱۲۰u/ml، ۱۰۰ درصد از رشد قارچ *Botrytis* جلوگیری کرد. در این تحقیق تاثیر این آنزیم در کاهش شدت بیماری لکه قهوه‌ای ناشی از *B. fabae* و کاهش اسپورزایی آن روی برگ‌های باقلا تاکید شد. متاآنالیز تاثیر جدایه‌های *T.harzianum* و *T.atroviridae* بر اساس یافته‌های ۱۵ پژوهش مختلف بر روی کنترل زیستی کپک خاکستری گوجه‌فرنگی نشان داد که این جدایه‌ها باعث افزایش بیان ژن‌های دفاعی PR-P2 و PR-B1 می‌شوند (۳۶). در پژوهش‌های مشابه بازدارندگی از رشد میسلیوم‌های قارچ بیمارگر *فوزاریوم* توسط جدایه‌های *تریکودرما* و باسیلوس در محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار مورد ارزیابی قرار گرفت. همچنین قابلیت کلونیزاسیون این جدایه‌ها نیز بررسی شد. تأثیر کاربرد مجزا و توأم جدایه‌های آنتاگونیست بر شاخص شدت بیماری پژمردگی آوندی *فوزاریومی* وبرخی از عوامل رشد گوجه‌فرنگی تعیین گردید. همچنین پتانسیل جدایه‌های یاد شده در القای آنزیم دفاعی فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز در گیاهچه‌های آلوده به بیمارگر *فوزاریوم* بررسی شد. جدایه‌های *تریکودرما* با بازدارندگی قابل‌توجه (۷۲/۰۶ درصد و ۶۹/۱۶ درصد)، در مهار بیمارگر موفق‌تر عمل کردند. سطح فعالیت آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیالیاز نیز در تیمارهای *تریکودرما* در مقایسه با شاهد (فوزاریوم) افزایش یافت. کاربرد هم زمان این جدایه‌ها در مقایسه با تیمار مجزا در القای آنزیم موثرتر بود (۳۵). در یک پژوهش چهار باکتری جداشده از خاک ریزوسفر گیاهان لوبیا در مزارع استان لرستان، در شرایط آزمایشگاهی به‌عنوان آنتاگونیست بالقوه پاتوژن قارچی مورد بررسی قرار گرفت. سویه‌های آنتاگونیست متعلق به گونه‌های *سودوموناس ائروژینوزا*، *سودوموناس پوتیدا*، *سودوموناس ماندلی* بودند و بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ ریزوکتونیا سولانی توسط باکتری‌های ریزوسفر در شرایط آزمایشگاهی مورد آزمایش قرار گرفت. درجه بازدارندگی با اندازه‌گیری میزان هاله در اطراف سویه‌های باکتریایی تعیین شد. و نتایج نشان داد که تمامی سویه‌ها اثر کنترلی قابل توجهی در مهار قارچ *ریزوکتونیا سولانی* داشته و منجر به کنترل بیش از ۴۰ درصد در PDA شدند. نتایج نشان داد که بیش‌ترین بازدارندگی مربوط به *سودوموناس پوتیدا* و کم‌ترین مربوط به *سودوموناس ائروژینوسا* بود (۳۶). کپک خاکستری ناشی از *Botrytis cinerea* یکی از بیماری‌های مهم انگور تازه در مزرعه و در دوره پس از برداشت است. برای کنترل این بیماری از قارچ‌کش‌های زیادی استفاده می‌شود. در یک آزمایش کشت متقابل، اکثر جدایه‌های *تریکودرما* روی کلنی جدایه A91 رشد کردند و در بین آن‌ها، جدایه T39 با مهار ۷۲/۴۷ درصد بیشترین قدرت بازدارندگی را از خود نشان داد. با توجه به اثر متابولیت‌های فرار، حداکثر نرخ مهار توسط جدایه G2 آنتاگونیست *T. harzianum* ۶۳/۶۵ درصد بود (۳۸). علاوه‌بر این، ترکیبات میکروبی گیاهی مبتنی‌بر *تریکودرما* توانایی‌های چندمنظوره در حفاظت از گیاهان در برابر بیمارگرهای انگل، افزایش دسترسی گیاهان به مواد مغذی و تحریک رشد گیاه را دارند و از این ویژگی‌ها می‌توان برای افزایش عملکرد کلی زراعی انواع محصولات استفاده کرد. در یک مطالعه، پتانسیل دوسویه *تریکودرما* بومی برزیل (*T. asperelloides* CMAA 1584 و *T. lentiforme* CMAA 1585) برای کنترل قارچ پوسیدگی *اسکلروتیومی* پنبه ناشی از *Sclerotinia sclerotiorum*، بررسی شد. هر دو سویه توانستند فسفر معدنی (CaHPO4) را حل کنند، ترکیبات آلی فراری را آزاد کنند که رشد میسلیوم *S. sclerotiorum* را مختل کنند و رشد گیاهان پنبه را در شرایط گلخانه‌ای افزایش دهند. در کشت دوگانه، سویه‌های *تریکودرما* سرعت رشد و تعداد اسکلروت‌های تشکیل شده توسط *S. sclerotiorum* را کاهش دادند (۳۹).

نتیجه‌گیری

امکان کنترل قارچ بیمارگر *B. cinerea* با استفاده از جدایه‌های *تریکودرما* (*T. oriantalis, T. ceramicum, T.asperellum*) در

شرایط آزمایشگاه و مزرعه با محلول‌پاشی این عوامل بیوکنترل به صورت منفرد یا در ترکیب با اسیدسالیسیلیک حاصل شد. این نتایج همچنین اثربخشی سویه‌های بومی را در کنترل بیولوژیک قارچ کپک خاکستری توت‌فرنگی تأیید کرد چراکه سویه‌ها از قبل در مجموعه میکروبی خاک وجود داشتند. *T. oriantalis, T ceramicum.* دو گونه بسیار جالب و مناسب در کنترل بیولوژیکی بیماری کپک خاکستری توت فرنگی در منطقه هستند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از تمام کسانی که در انجام مراحل مختلف این مقاله یاری رسانده‌اند قدردانی می‌شود.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان تمامی نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف دادها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تعارض منافع

وجود ندارد.

References

1. Dara SK. The new integrated pest management paradigm for the modern age. J Integr Pest Manag. 2019; 10(1): 12.
2. Emadi MH, Rahmanian M. Commentary on challenges to taking a food systems approach within the food and agriculture organization (FAO). In Food Security and Land Use Change under Conditions of Climatic Variability 2020 (pp. 19-31). Springer, Cham.
3. Suárez MB, Sanz L, Chamorro MI, Rey M, González FJ, Llobell A, Monte E. Proteomic analysis of secreted proteins from Trichoderma harzianum: identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. Fungal Genet Biol. 2005; 42(11): 924-934.
4. Liu SY, Lo CT, Shibu MA, Leu YL, Jen BY, Peng KC. Study on the anthraquinones separated from the cultivation of Trichoderma harzianum strain Th-R16 and their biological activity. J Agric Food Chem. 2009; 57(16):7288-7292.

5. Ding CK, Wang C, Gross KC, Smith DL. Jasmonate and salicylate induce the expression of pathogenesis-related-protein genes and increase resistance to chilling injury in tomato fruit. Planta. 2002; 214(6): 895-901.
6. Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N. Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems–an introduction. In Botrytis: Biology, pathology and control 2007 (pp. 1-8). Springer, Dordrecht.
7. Zhao Y, Wei T, Yin KQ, Chen Z, Gu H, Qu LJ, Qin G. Arabidopsis RAP2. 2 plays an important role in plant resistance to Botrytis cinerea and ethylene responses. New Phytol. 2012; 195(2):450-460.
8. Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RN, Valero JR. Antagonistic fungi, Trichoderma spp.: panoply of biological control. Biochemical Engineering Journal. 2007 Oct 15;37(1):1-20.
9. Iizasa EI, Mitsutomi M, Nagano Y. Direct binding of a plant LysM receptor-like kinase, LysM RLK1/CERK1, to chitin in vitro. JBC. 2010; 285(5): 2996-3004.
10. Rigotti S, Gindro K, Viret O. Two new primers highly specific for the detection of" Botrytis cinerea" Pers. Fr. 2006; 1000-1008pp.
11. Murray MG, Thompson W. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res. 1980; 8(19): 4321-4326.
12. Nazmi Roodsari F, Zafari D, Khodaparast SA, Rouhani H. New species of Trichoderma for Iran. Rostaniha. 2007; 8(1): 67-83.
13. Rosslenbroich HJ, Stuebler D. Botrytis cinerea history of chemical control and novel fungicides for its management. Crop prot. 2000; 19(8-10): 557-561.
14. Braun PG, Sutton JC. Inoculum sources of Botrytis cinerea in fruit rot of strawberries in Ontario. Can J Plant Pathol. 1987; 9(1): 1-5.
15. Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Barbetti MJ, Li H, Woo SL, Lorito M. A novel role for Trichoderma secondary metabolites in the interactions with plants. Physiol Mol plant pathol. 2008; 72(1-3): 80-86.
16. Blanco-Ulate B, Vincenti E, Powell AL, Cantu D. Tomato transcriptome and mutant analyses suggest a role for plant stress hormones in the interaction between fruit and Botrytis cinerea. Front Plant sci. 2013; 4: 142.
17. Geng L, Fu Y, Peng X, Yang Z, Zhang M, Song Z, Guo N, Chen S, Chen J, Bai B, Liu A. Biocontrol potential of Trichoderma harzianum against Botrytis cinerea in tomato plants. Biol Control. 2022; 174: 105019.
18. Dutta P, Deb L, Pandey AK. Trichoderma-from lab bench to field application: Looking back over 50 years. Front Agron. 2022; 4: 932839.
19. Harman GE, Shoresh M. The mechanisms and applications of symbiotic opportunistic plant symbionts. InNovel biotechnologies for biocontrol agent enhancement and management 2007 (pp. 131-155). Springer, Dordrecht.

20. Druzhinina IS, Seidl-Seiboth V, Herrera-Estrella A, Horwitz BA, Kenerley CM, Monte E, Mukherjee PK, Zeilinger S, Grigoriev IV, Kubicek CP. Trichoderma: the genomics of opportunistic success. Nat Rev microbiol. 2011; 9(10): 749-759.

21. Cheng CH, Yang CA, Liu SY, Lo CT, Peng KC. L-Amino acid oxidase-induced apoptosis in filamentous Botrytis cinerea. Anal Biochem. 2012; 420(1): 93-95.

22. Łaźniewska J, Macioszek VK, Lawrence CB, Kononowicz AK. Fight to the death: Arabidopsis thaliana defense response to fungal necrotrophic pathogens. Acta Physiol Plant. 2010; 32(1):1-10.

23. Brotman Y, Lisec J, Méret M, Chet I, Willmitzer L, Viterbo A. Transcript and metabolite analysis of the Trichoderma-induced systemic resistance response to Pseudomonas syringae in Arabidopsis thaliana. Microbiology. 2012; 158(1): 139-146.

24. Korolev N, Rav David D, Elad Y. The role of phytohormones in basal resistance and Trichoderma-induced systemic resistance to Botrytis cinerea in Arabidopsis thaliana. BioControl. 2008; 53(4): 667-683.

25. Morán-Diez E, Hermosa R, Ambrosino P, Cardoza RE, Gutiérrez S, Lorito M, Monte E. The ThPG1 endopolygalacturonase is required for the Trichoderma harzianum–plant beneficial interaction. MPMI. 2009; 22(8): 1021-1031.

26. Bae H, Roberts DP, Lim HS, Strem MD, Park SC, Ryu CM, Melnick RL, Bailey BA. Endophytic Trichoderma isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against Phytophthora capsici in hot pepper using multiple mechanisms. MPMI. 2011; 24(3): 336-351.

27. Joo JH, Hussein KA. Biological Control and Plant Growth Promotion Properties of Volatile Organic Compound-Producing Antagonistic Trichoderma spp. Front Plant Sci. 2022; 13.

28. Chavez-Jalk A, Leiva S, Bobadilla LG, Vigo CN, Arce M, Oliva-Cruz M. Effect of endophytic Trichoderma sp. strains on the agronomic characteristics of ecotypes of Theobroma cacao L. under nursery conditions in Peru. . Int J Agron. 2022; 5297706: 1-8.

29. Ashrafi A, Salehzadeh M, Khezrinezhad N. Detection and Identification of Tomato wilt disease in East Azerbaijan Province and Controlling It Using Antagonist Bacteria. Genetic Engineering and Biosafety Journal. 2020 Aug 10;9(1):28-39.

30. Freeman S, Minz D, Kolesnik I, Barbul O, Zveibil A, Maymon M, Nitzani Y, Kirshner B, Rav -David D, Bilu A, Dag A. Trichoderma biocontrol of Colletotrichum acutatum and Botrytis cinerea and survival in strawberry. Eur J Plant Pathol. 2004; 110(4): 361-370

31. Salas-Marina MA, Silva-Flores MA, Uresti-Rivera EE, Castro-Longoria E, Herrera-Estrella A, Casas-Flores S. Colonization of Arabidopsis roots by Trichoderma atroviride promotes growth and enhances systemic disease resistance through jasmonic acid/ethylene and salicylic acid pathways. Eur J Plant Pathol. 2011; 131(1):15-26.

32. Amin F, Razdan VK. Potential of Trichoderma species as biocontrol agents of soil borne fungal propagules. J Phytol. 2010; 2(10): 38-41.

33. Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Chen Z. Functional analysis of the Arabidopsis PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. Plant Physiol. 2010; 153(4):1526-1538.

34. Mathys J, De Cremer K, Timmermans P, Van Kerckhove S, Lievens B, Vanhaecke M, Cammue BP, De Coninck B. Genome-wide characterization of ISR induced in Arabidopsis thaliana by Trichoderma hamatum T382 against Botrytis cinerea infection. Front plant sci. 2012; 3:108.

35. Hermosa R, Viterbo A, Chet I, Monte E. Plant-beneficial effects of Trichoderma and of its genes. Microbiology. 2012; 158(1): 17-25.

36. Aleaghaee S, Rezaee S, Ebadi M, Zamanizadeh H. Biological control of Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici and induction of defensive enzyme of phenylalanine ammonialyse in tomato by Trichoderma and Bacillus antagonist isolates. JMW. 2019; 12(2): 125-138.

37. Omidinasab M, Darvishnia M. Biological control of Rhizoctonia solani by Pseudomonas strains isolated from the rhizosphere. JMW. 2018; 10(4): 386-393.

38. Risoli S, Cotrozzi L, Sarrocco S, Nuzzaci M, Pellegrini E, Vitti A. Trichoderma-Induced Resistance to Botrytis cinerea in Solanum Species: A Meta-Analysis. Plants. 2022; 11(2): 180.

39. De Simone N, Pace B, Grieco F, Chimienti M, Tyibilika V, Santoro V, Capozzi V, Colelli G, Spano G, Russo P. Botrytis cinerea and table grapes: A review of the main physical, chemical, and bio-based control treatments in post-harvest. Foods. 2020; 9(9):1138.

40. Silva LG, Camargo RC, Mascarin GM, NUNES PD, Dunlap C, Bettiol W. Dual functionality of Trichoderma: biocontrol of Sclerotinia sclerotiorum and biostimulant of cotton plants. Plant Sci. 2022; 3:108.