Archive of SID

کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۵، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۵ (۲۳-۱۳)

کنترل زیستی بیماری کپک خاکستری در سه رقم توت‌فرنگی با استفاده از استرین‌های *Bacillus*

۱. جهانشیر امینی*؛ ۲. ساسان فیضی؛ ۳. سهیلا میرزایی
۱. دانشیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کردستان
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه کردستان
۳. استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا همدان

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۹/۲۷ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۱/۹)

چکیده

در این تحقیق تأثیر سویه (استرین)های باسیلوس روی جوانه‌زنی اسپور و رشد میسلیوم *Botrytis cinerea* به منظور کنترل زیستی (بیولوژیک) پوسیدگی میوه در سه رقم توت‌فرنگی شامل Quineliza، Paros و Kurdistan در شرایط آزمایشگاه بررسی شد. از تأثیر سی‌ودو سویهٔ جنس باسیلوس روی قارچ بیمارگر در کشت چهار نقطه‌ای، ده سویه که بیشترین بازدارندگی را از رشد داشتند برای کارهای بعدی انتخاب شدند. تأثیر ناهمسازی (آنتاگونیستی) ده سویه روی قارچ بیمارگر با استفاده از آزمون کشت متقابل، سوخت‌وسازگر (متابولیت)های فرّار و تولید مایع خارج یاخته‌ای در شرایط آزمایشگاه انجام شد. نتایج نشان داد که همهٔ سویه‌های باسیلوس در هر سه آزمون، رشد قارچ بیمارگر را کاهش دادند و این کاهش در جدایه‌های مختلف متفاوت است. درصد کاهش رشد در کشت متقابل، سوخت‌وسازگرهای فرّار و تولید مایع خارج یاخته‌ای به ترتیب بین ۶۷/۱-۳۰/۵، ۸۶/۲-۲۷/۵ و ۸۲-۴۱ متغیر بود. افزون بر این، تأثیر سویه‌های باسیلوس روی جوانه‌زنی اسپور و رشد میسلیوم قارچ بیمارگر روی میوه‌های سه رقم توت‌فرنگی نشان داد که همهٔ سویه‌های باکتری می‌توانند جوانه‌زنی و رشد میسلیوم قارچ بیمارگر را کاهش دهند و این کاهش در جدایه‌های مختلف متفاوت بود. همچنین شدت بیماری پوسیدگی میوهٔ توت‌فرنگی در میوه‌های تیمارشده با سویه‌های باسیلوس کاهش شایان‌توجهی در مقایسه با تیمار شاهد نشان دادند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که ترکیبات تولیدشده به‌وسیلهٔ سویه‌های باسیلوس توانایی زیادی در کنترل زیستی بیماری کپک خاکستری دارند و نیاز است تحقیقات بیشتری در شرایط مزرعه روی آن‌ها صورت گیرد.

کلیدواژگان: پوسیدگی میوهٔ توت‌فرنگی، کنترل زیستی، گونه‌های باسیلوس.

مقدمه

توت‌فرنگی (*Fragaria ananassa* Duch.) گیاهی دولپه از خانوادهٔ Rosaceae است، میوه آن افزون بر مصرف تازه‌خوری نقش زیادی در صنایع غذایی و دارویی دارد. استان کردستان با کشت حدود ۲۳۰۰ هکتار مزارع توت‌فرنگی و تولید بیش از ۶۵ درصد توت‌فرنگی کشور (۲۱۰۰۰ تن) مقام اول را در سطح کشور دارد. فراوانی رقم‌های مورد کشت در استان کردستان به ترتیب رقم کردستان، پاروس، سلوا و کوین الیزا است.

آفات و بیماری‌های زیادی به این گیاه آسیب و زیان

* تلفن ۰۸۷۳۳۶۲۰۵۵۲
E-mail: jamini@uok.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

می‌زنند و باعث کاهش عملکرد (راندمان) محصول می‌شوند. یکی از بیماری‌های مهم توت‌فرنگی که باعث پوسیدگی میوه پیش و پس از برداشت محصول می‌شود، بیماری کپک خاکستری است که توسط قارچ *Botrytis cinerea* Pres: Fr. سبب می‌شود (Williamson *et al.* 2007, Huang *et al.* 2011). بیماری کپک خاکستری میوهٔ توت‌فرنگی یکی از مهم‌ترین بیماری‌های توت‌فرنگی در کل جهان است (Hjeljord *et al.* 2001) و در بیشتر مناطق کشت توت‌فرنگی جهان گسترش دارد (Wilcox and Seem 1994). در ایران آسیب و زیان بیماری روی رقم کردستان بیشتر از دیگر رقم‌های توت‌فرنگی است. عامل بیماری همه‌جازی و افزون بر توت‌فرنگی به دیگر گیاهان سبزی و صیفی، گیاهان زینتی و به میوهٔ گیاهان در باغ‌ها و مزارع و انبارها هم آسیب و زیان می‌زند (Barka *et al.* 2002, Rosslenbroich and Stuebler 2000). آب‌وهوای معتدل و مرطوب در زمان گل‌دهی و برداشت محصول، پیشرفت بیماری و پوسیدگی میوه‌های آلوده را تشدید می‌کند (Bulger *et al.* 1987). عامل بیماری به همهٔ قسمت‌های هوایی توت‌فرنگی مانند برگ، گل و میوه‌ها حمله کرده و سبب سوختگی برگ‌ها و گل‌ها و پوسیدگی میوهٔ توت‌فرنگی می‌شود (Agrios 1997, Yu *et al.* 2006, Mertely *et al.* 2002). مرحلهٔ گل‌دهی حساس‌ترین مرحلهٔ گیاه در برابر بیماری است، زیرا گل‌ها به دلیل باز بودن به عامل بیماری آلوده شده، پیشرفت بیماری روی میوهٔ توت‌فرنگی در مزرعه، در حین حمل‌ونقل و انبار ادامه می‌یابد و منجر به پوسیدگی و کاهش ماندگاری آن‌ها در انبار می‌شود (Bulger *et al.* 1987, Blacharski *et al.* 2001, Wszelaki and Mitcham 2003). قارچ عامل بیماری نکروترف، به‌صورت میسلیوم و سختینه (اسکلروت) در روی بقایای گیاهی، میوه‌های مومیایی‌شده و علف‌های هرز زمستان گذرانی کرده، دوام و بقای خود را در شرایط نامساعد حفظ می‌کند (Sutton 1995, Williamson *et al.* 2007).

کاربرد قارچ‌کش‌ها بر علیه بیماری افزون بر اختلال در عمل گرده‌افشانی و وجود باقی‌ماندهٔ سم روی میوه، ظهور پدیدهٔ مقاومت در قارچ بیمارگر در برابر قارچ‌کش‌ها را سبب شده، باعث محدودیت این روش می‌شود و لازم است از دیگر روش‌ها برای مدیریت بیماری استفاده کرد (Huang *et al.* 2011, Chen *et al.* 2007, Rabolle *et al.* 2006). یکی از روش‌های ایمن و سالم برای کاهش آسیب و زیان بیماری‌های پس از برداشت از جمله بیماری پوسیدگی میوهٔ توت‌فرنگی کنترل زیستی و استفاده از عامل‌های بیوکنترل برای این مهم است. کاربرد عامل‌های کنترل زیستی روی محصولات پس از برداشت به دلیل وجود شرایط مطلوب برای استقرار و پایداری آن‌ها منجر به کنترل بهتر بیمارگرها توسط آن‌ها می‌شود (Janisiewicz and Korsten 2002). مخمرها و باکتری‌های زیادی به‌عنوان کنترل‌کنندهٔ زیستی بیماری‌های پس از برداشت گیاهان سیب (Torres *et al.* 2005)، درختان هسته‌دار (Zhou *et al.* 2008)، گیلاس و انگور (Schena *et al.* 2003)، مرکبات (Nunes *et al.* 2009) و توت‌فرنگی (Huang *et al.* 2011) گزارش و معرفی شده‌اند. تحقیقات نشان داده که عامل‌های زیستی مانند *Candida oleophila*، *Trichoderma* spp.، *Aurebasidium pullulans*، *Pichia guilliermondii*، *Ulocladium atrum*، *Candida oleophila* و گونه‌های باسیلوس به ترتیب سبب کنترل و کاهش بیماری کپک خاکستری توت‌فرنگی در شرایط پس از برداشت می‌شوند (Tronsmo and Dennis 1977, Lima *et al.* 1997, Boff *et al.* 2002, Wszelaki and Mitcham 2003, Nguyen *et al.* 2005, Kim *et al.* 2007, Naeimi and Zare 2014). توانایی گونه‌های باسیلوس در کنترل بیماری‌های قارچی پس از برداشت در میوه‌های گیاهان به‌صورت تجاری توسط محققان زیادی معرفی و گزارش شده است (Arrebola *et al.* 2010, Casals *et al.* 2010, Obagwu and Korsten 2003, Osman *et al.* 2011). گونه‌های جنس باسیلوس توانایی تولید آنتی‌بیوتیک‌های متنوع و زیادی دارند (Katz and Demain 1977) که علیهٔ عامل‌های بیماری‌زای قارچی رورست (اپی‌فیت) و درون‌رست (آندوفیت) هوازی و خاکزی به کار می‌روند (Walker *et al.* 1998, Chen *et al.* 2008). سازوکار کنترلی باکتری‌های باسیلوس عبارت‌اند از رقابت برای غذا و زیستگاه (Afsharmanesh *et al.* 2014, Munimbazi and Bullerman 1998)، عامل پادزیستی (آنتی‌بیوز) با تولید پادزی مانند لیپوپتیدها شامل

www.SID.ir

Archive of SID

خانوادهٔ fengycin، iturin و surfactin (Stein 2005, Ongena *et al.* 2009) است که نقش زیادی در کنترل عامل‌های بیماری‌زای قارچی دارند. افزون بر این باکتری‌های باسیلوس با ایجاد مقاومت القایی در گیاهان باعث کاهش شدت بیماری یا کنترل بیماری‌های گیاهان می‌شوند (Thomashow and Weller 1998). گونه‌های باسیلوس با تولید سوخت‌وسازگر (متابولیت)های فرّار نقش زیادی در کنترل عامل‌های بیماری‌زای گیاهان مانند *Botrytis cinerea*، *Cercospora kikuchii*، *Alternaria solani* و *Colletotrichum gloesporioides* روی درخت انبه در شرایط آزمایشگاه و مزرعه دارد (Zheng *et al.* 2013). جدایه‌های *B. subtilis* (CL27) و *B. pumilu* (CL45) با تولید پادزی می‌توانند از فعالیت قارچ *B. cinerea* جلوگیری کنند (Leifert 1995). به دلیل محدودیت کاربرد دیگر روش‌های کنترل بیماری کپک خاکستری توت‌فرنگی مانند روش‌های زراعی و شیمیایی، استفاده از عامل‌های کنترل زیستی در مدیریت این بیماری یک ضرورت است.

هدف از اجرای این تحقیق بررسی تأثیر و توانایی سویه (استرین)های باکتری جنس باسیلوس روی بیماری کپک خاکستری به منظور کاهش بیماری در شرایط آزمایشگاه و روی میوهٔ توت‌فرنگی است.

مواد و روش‌ها

قارچ بیمارگر و باکتری آنتاگونیست

گیاهان و میوهٔ آلوده به قارچ عامل کپک خاکستری در مزرعه گردآوری و برای جداسازی قارچ عامل بیماری به آزمایشگاه منتقل شد. در آزمایشگاه میوه‌ها و بافت گیاهی آلوده پس از شستشو با جریان آب ملایم، ضدعفونی با هیپوکلریت سدیم ۲ درصد به مدت دو دقیقه، شستشو با آب مقطر سترون و خشک کردن با کاغذ صافی سترون روی محیط غذایی سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) در دمای ۲۲ درجهٔ سلسیوس کشت شد. جدایه‌های قارچ بیماری با روش تک‌اسپور خالص‌سازی و در دمای ۴ درجهٔ سلسیوس در دمای یخچال نگهداری شد. شناسایی قارچ بیمارگر با استفاده از مشخصات ریخت‌شناختی (مرفولوژیکی) اندام‌های قارچ روی محیط کشت غذایی PDA با استفاده از شاخص‌هایی مانند شکل و رنگ پرگنهٔ قارچ، اندازه و شکل اسپورها و کنیدیوفور و سختینه انجام شد (Hennebert 1973, Ellis and Walker 1974).

سویه‌های باکتری جنس باسیلوس از کلکسیون گروه گیاه‌پزشکی دانشکدهٔ کشاورزی دانشگاه کردستان تهیه شد. این باکتری‌ها پیشتر از خاک‌های مزارع توت‌فرنگی و ناحیهٔ ریزوسفر گیاهان سالم استان کردستان جداسازی شده‌اند.

تهیهٔ مایه

برای تهیهٔ زادمایهٔ، قارچ عامل بیماری را روی محیط کشت PDA درون پتری دیش‌های به قطر ۹ سانتی‌متری کشت و به مدت دو هفته در دمای ۲۲ درجهٔ سلسیوس در اتاقک رشد (انکوباتور) نگهداری شد. پس‌ازآن با اضافه کردن ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر پتری دیش، دروایهٔ (سوسپانسیون) مایهٔ تلقیح قارچ بیمارگر تهیه و با هماسیتومتر غلظت آن تعیین و غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

برای تهیهٔ مایهٔ تلقیح باکتری، سویه‌های باکتری روی محیط کشت نترینت آگار (NA) در پتری دیش‌های ۹ سانتی‌متری کشت و در دمای ۲۹-۲۷ درجهٔ سلسیوس نگهداری شد. پس از ۷۲ ساعت با اضافه کردن ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به هر پتری دیش دروایهٔ باکتری تهیه شد. غلظت اسپور باکتری با استفاده از دستگاه طیف‌سنج نوری (اسپکروفتومتر) در طول‌موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری و غلظت ۱×۱۰^{۸} cfu/ml برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد (Zakira Naureen *et al.* 2009).

گیاه توت‌فرنگی

سه رقم گیاه توت‌فرنگی شامل Quineliza، Paros و Kurdistan در این تحقیق استفاده شد. گیاهان مادری هر سه رقم از مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کردستان تهیه شد. گیاهان در گلخانه در دمای ۲۶-۲۴ درجهٔ سلسیوس و رطوبت نسبی ۷۰-۶۰ درصد و شانزده ساعت روشنایی و هشت ساعت تاریکی قرار داده شد. گیاهان هر ۳-۲ روز یک‌بار بسته به نیاز آبی آبیاری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

آزمون بیماری‌زایی

برگ توت‌فرنگی

به منظور انجام آزمون بیماری‌زایی، در آغاز برگ‌های توت‌فرنگی سالم رقم کردستان از مزارع به آزمایشگاه منتقل، با آب مقطر سترون شستشو و زیر هود خشک شد. سپس با استفاده از الکل۷۰ درصد سطح برگ‌ها ضدعفونی و بلوک‌های میسلیومی از کشت هفت روزهٔ قارچ بیمارگر با قطر ۵ میلی‌متر روی برگ توت‌فرنگی قرار داده شد. تیمار شاهد تنها با محیط کشت تلقیح شد. برگ‌ها در کف پتری دیش حاوی کاغذ صافی سترون مرطوب‌شده با آب مقطر سترون قرار داده تا در حین نگهداری (انکوباسیون) برگ توت‌فرنگی رطوبت موردنیاز برای ایجاد آلودگی فراهم شود. پتری دیش‌ها در دمای ۲۲ درجهٔ سلسیوس برای مدت ده روز قرار داده شدند. در پایان آزمایش برای جداسازی دوبارهٔ قارچ بیمارگر، بافت برگ‌های مایه‌زنی‌شدهٔ آلوده روی محیط غذایی PDA کشت شد. پس از ده روز میانگین قطر لکه‌های بافت‌مردگی (نکروتیک) ایجادشده روی برگ‌ها در هر تیمار محاسبه شد (Rigotti *et al.* 2006).

میوه

میوه‌ها را با اتانل ۷۰ درصد به مدت سه ثانیه ضدعفونی و پس از شستشو با آب مقطر سترون با کاغذ صافی سترون خشک شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از دروایهٔ اسپور قارچ بیمارگر (1×10^{6} اسپور در میلی‌لیتر) به هر میوهٔ سالم تلقیح شد و میوه‌ها به مدت یک ساعت زیر هود در شرایط سترون خشک شدند. تیمار شاهد تنها با آب مقطر سترون تلقیح شد. همهٔ میوه‌ها در ظرف یک‌بار مصرف مشابه روش بالا نگهداری و شدت بیماری پس از پنج روز محاسبه شد (Sutton and Peng 1993, Huang *et al.* 2011). هر دو آزمون فوق در قالب طرح کامل تصادفی و در چهار تکرار (هر تکرار سه برگ و یا میوه) انجام شد.

بررسی توانایی آنتاگونیستی سویه‌های باسیلوس روی عامل بیماری

کشت متقابل

در مرحلهٔ اول برای غربال کردن سویه‌های مؤثر باکتری، یک بلوک ۰/۵ سانتی‌متری از کشت پنج روزهٔ قارچ بیمارگر در وسط پتری دیش (۹ سانتی‌متری) کشت و در چهار نقطهٔ پتری دیش به فاصلهٔ ۴ سانتی‌متر از بلوک قارچ بیمارگر، ۵ میکرولیتر از دروایهٔ هر سویهٔ باکتری ناهمساز (آنتاگونیست) (1×10^{8} cfu/ml) کشت و پتری دیش‌ها در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس قرار داده و پس از هفت روز سویه‌هایی که بازدارندگی بیشتری داشتند برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شدند (Keel *et al.* 1996).

در مرحلهٔ دوم، ۵ میکرولیتر از دروایهٔ کشت پنج روزهٔ هر سویهٔ باکتری (1×10^{8} cfu/ml) از سویه‌های انتخاب‌شده را به‌وسیلهٔ لوپ سترون به‌صورت خطی در یک‌سو تشتک پتری (۹ سانتی‌متری) حاوی محیط کشت PDA به‌صورت خطی کشت شد و پتری دیش‌ها در دمای ۲۸ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. پس از ۴۸ ساعت بلوکی به قطر ۰/۵ سانتی‌متر از حاشیهٔ کشت پنج روزهٔ قارچ بیمارگر در طرف دیگر تشتک‌ها به فاصلهٔ ۱ سانتی‌متر از لبه قرار داده شد. در تشتک‌های پتری شاهد به‌جای کشت باکتری از آب مقطر سترون استفاده شد. همهٔ تشتک‌ها در دمای ۲۸-۲۶ درجهٔ سلسیوس در اتاقک رشد نگهداری شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی شامل یازده تیمار (ده سویه باکتری و شاهد) در چهار تکرار انجام شد (Erdogan and Benlioglu 2010). پس از هفت روز درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر در مقایسه با شاهد برای هر جدایه با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{Mycelial Growth Inhibition (MGI)\%} = \frac{dC - dT}{dC} \times 100$$

C= میانگین قطر پرگنهٔ قارچ بر حسب میلی‌متر در شاهد

T= میانگین قطر پرگنهٔ قارچ بر حسب میلی‌متر در تیمار موردنظر

درصدهای به‌دست‌آمده با استفاده از فرمول $Arc\sin\sqrt{\%}$ تبدیل به اعدادی شد که به توزیع نرمال نزدیک‌تر باشند و سپس اعداد به‌دست‌آمده در محاسبات آماری منظور شد (Little and Hill 1978).

متابولیت‌های فرار

در این آزمایش تأثیر متابولیت‌های فرّار سویه‌های باکتری روی جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر بررسی شد (Fiddaman and Rossall 1993). مقدار

www.SID.ir

Archive of SID

۲۰۰ میکرولیتر از درواية سویهٔ باکتری (1×10^8 cfu/ml) روی سطح محیط کشت نترینت آگار (NA) کشت و در دمای ۲۸-۲۶ درجهٔ سلسیوس برای ۴۸ ساعت قرار داده شد. در پتری دیش دیگر حاوی محیط کشت PDA یک بلوک به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیهٔ کشت جوان سه روزهٔ *B. cinerea* قرار داده شد. سپس در زیر هود و در کنار شعله و در شرایط سترون درهای تشتک‌های پتری حاوی قارچ بیمارگر و باکتری آنتاگونیست برداشته و تشتک پتری حاوی قارچ بیمارگر به‌طور وارونه روی تشتک پتری حاوی باکتری آنتاگونیست قرار داده شد و با پارافیلم دور آن‌ها به‌طورکلی مسدود شد تا متابولیت‌ها فرّار از درون پتری دیش خارج نشوند. تشتک‌های پتری در اتاقک رشد در دمای ۲۸-۲۶ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. پس از یک هفته درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر مشابه روش بالا اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی شامل یازده تیمار (ده سویهٔ باکتری و شاهد) در چهار تکرار انجام شد.

تولید ترشحات مایع بیرون یاخته‌ای

هدف از این آزمایش بررسی ترشحات مایع بیرون یاخته‌ای سویه‌های *Bacillus* در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *B. cinerea* است. برای انجام آزمایش از پوشش ورقه‌های سلوفان (Cellophane overlays, 0.2 µm) استفاده شد (Zakira Naureen *et al.* 2009). آزمایش روی محیط کشت PDA در تشتک‌های ۹۰ میلی‌متری انجام شد. ورقه‌های سلوفان سترون به قطر ۹۰ میلی‌متر بریده و در روی تشتک‌های پتری دیش حاوی محیط کشت PDA قرار داده شدند و سپس ۲۰۰ میکرولیتر از درواية سویهٔ باکتری (1×10^8 cfu/ml) در مرکز پتری دیش قرار داده و کشت شد. در تشتک‌های پتری دیش شاهد تنها از آب مقطر سترون استفاده شد. همهٔ تشتک‌ها در دمای ۲۸-۲۶ درجهٔ سلسیوس قرار داده شد. پس از ۷۲ ساعت لایهٔ سلوفان همراه باکتری از روی محیط کشت برداشته شد و یک بلوک ۵ میلی‌متری از کشت پنج روزهٔ قارچ بیمارگر در وسط پتری دیش کشت شد. پس از یک هفته درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر مشابه روش بالا اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی شامل یازده تیمار (ده سویهٔ باکتری و شاهد) در چهار تکرار انجام شد.

تأثیر سویه‌های باکتری روی رشد میسلیوم قارچ بیمارگر در میوه‌های سه رقم توت‌فرنگی پس از برداشت

در این آزمون در آغاز میوهٔ سالم و بالغ توت‌فرنگی رقم‌های کردستان، کوین الیزا و پاروس سالم به ابعاد (طول و عرض) ۴-۳/۵×۳-۲/۵ سانتی‌متر و وزن ۱۷-۱۵ گرم از مزارع گردآوری و به آزمایشگاه انتقال داده شد. میوه‌ها را با اتانول ۷۰ درصد به مدت سه ثانیه ضدعفونی و پس از شستشو با آب مقطر سترون با کاغذ صافی سترون خشک شد. پس‌ازآن یک بلوک ۵ میلی‌متری از حاشیهٔ کشت پنج روزهٔ قارچ بیمارگر روی سطح هر میوه قرار داده شد. در تیمار شاهد (بدون بیمارگر) تنها از محیط کشت PDA بدون قارچ بیمارگر استفاده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از درواية تهیه‌شدهٔ باکتری ناهمساز (1×10^8 cfu/ml) به سطح هر میوه روی و اطراف بلوک قارچ بیمارگر مایه‌زنی شد. در تیمار شاهد (بیمارگر) به‌جای درواية باکتری، میوه‌ها با آب مقطر سترون مایه‌زنی شد. نمونه‌ها در ظرف یک‌بار مصرف سترون در دمای ۲۸-۲۶ درجهٔ سلسیوس، رطوبت ۷۵ درصد و شانزده ساعت نور و هشت ساعت تاریکی قرار داده شد. سرانجام پس از پنج روز شدت بیماری بر پایهٔ شاخص ۵-۰ به شرح زیر بنابر روش اصلاح‌شدهٔ هانگ و همکاران محاسبه شد: صفر، میوهٔ سالم و بدون آلودگی؛ ۱) پوسیدگی میوه کمتر از ۲۰درصد؛ ۲) پوسیدگی میوه بین ۴۰-۲۰/۱ درصد؛ ۳) پوسیدگی میوه بین ۶۰-۴۰/۱ درصد؛ ۴) پوسیدگی میوه بین ۸۰-۶۰/۱ درصد؛ ۵) پوسیدگی میوه بین ۱۰۰-۸۰/۱ درصد (Huang *et al.* 2011).

تأثیر سویه‌های باکتری روی جوانه‌زنی اسپورهای قارچ بیمارگر در میوه‌های توت‌فرنگی پس از برداشت

میوهٔ رقم‌های توت‌فرنگی مشابه روش بالا تهیه و پس از ضدعفونی، ۵۰ میکرولیتر از درواية اسپور قارچ بیمارگر (1×10^6 اسپور در میلی‌لیتر) به هر میوه تلقیح شد و میوه‌ها به مدت یک ساعت زیر هود در شرایط سترون خشک شدند. تیمار شاهد تنها با آب مقطر سترون تلقیح

www.SID.ir

Archive of SID

شد. سپس مشابه روش بالا ۵۰ میکرولیتر از دروایهٔ باکتری به سطح هر میوه روی و اطراف اسپور قارچ بیمارگر تلقیح شدند. تیمار شاهد هم با آب مقطر سترون بدون باکتری تلقیح شد. همهٔ میوه‌ها در ظرف یک‌بار مصرف مشابه روش بالا نگهداری و شدت بیماری پس از پنج روز مشابه روش یادشده محاسبه شد. هر دو آزمون بالا در قالب طرح کامل تصادفی و در چهار تکرار (هر تکرار سه میوه) انجام شد. و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد.

همهٔ آزمایش‌ها در قالب طرح کامل تصادفی انجام شد. تجزیه‌وتحلیل داده‌های به‌دست‌آمده با نرم‌افزار SPSS انجام گرفت و مقایسهٔ میانگین‌ها بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan) در سطح احتمال ۵درصد صورت گرفت.

نتیجه و بحث

بیماری‌زایی و شناسایی قارچ بیمارگر

هجده جدایهٔ قارچ بیمارگر *B. cinerea* از بوته‌های بیمار توت‌فرنگی جداسازی و شناسایی شد. مشخصات ریخت‌شناختی جدایه‌های قارچ بیمارگر با مشخصات توصیف‌شده در منابع اریک و والکر و هنبرت همخوانی داشت (Hennebert 1973, Ellis and Walker 1974).

جدایه‌ها توانایی متفاوتی از بافت‌مردگی و پوسیدگی روی برگ‌ها و میوه‌های توت‌فرنگی را نشان دادند. جدایهٔ B7 بر اساس قطر لکهٔ بافت مردهٔ تشکیل‌شده در سطح بافت برگ و میزان پوسیدگی میوه، بیشترین بیماری‌زایی را روی برگ و میوهٔ توت‌فرنگی نسبت به دیگر جدایه‌ها ایجاد کرد و برای ادامهٔ بررسی‌ها انتخاب شد.

بررسی تأثیر سویه‌های باکتری روی قارچ بیمارگر در شرایط آزمایشگاه

نتایج آزمون چهار نقطه‌ای نشان داد که از میان ۳۲ جدایهٔ باکتری، ده جدایه بازدارندگی بیشتری نسبت به دیگر جدایه‌ها داشتند (بیشتر از ۳۰ درصد). بنابراین برای کارهای بعدی انتخاب شدند. اسامی جدایه‌های انتخاب‌شده شامل: B1، B2، B3، B14، B16، B18، B20، B23، B28 و B32 است. این نتایج با تحقیقات دیگر محققان همخوانی دارد (Das and Annapurna 2008).

نتایج آزمون کشت متقابل نشان داد که سویه‌های *Bacillus* موجب بازدارندگی از رشد پرگنهٔ قارچ بیمارگر به میزان ۶۷/۱-۳۰/۵ درصد شدند. جدایه‌های B16، B20 و B23 بیشتر از ۵۰ درصد از رشد پرگنهٔ قارچ بیماری بازدارندگی ایجاد کردند. جدایهٔ B20 با ۶۷/۱ درصد بازدارندگی بیشترین تأثیر را در جلوگیری از رشد میسلیوم عامل بیماری داشت. سویه‌های B3، B1 و B2 به ترتیب با ۳۰/۵، ۳۲/۹ و ۳۶/۶ درصد کمترین بازدارندگی در رشد قارچ بیمارگر داشتند (جدول ۱). تحقیقات نشان داده که گونه‌های *Bacillus subtilis* S1-0210 و *B licheniformis* N1 به‌طور شایان‌توجهی از رشد میسلیوم قارچ *B. cinerea* در شرایط آزمایشگاه جلوگیری می‌کنند (Nguyen *et al.* 2005, Kim *et al.* 2007).

بین سویه‌های باکتری از نظر تأثیر و تولید متابولیت‌های فرّار در جلوگیری از رشد میسلیوم عامل بیماری در سطح ۵ درصد اختلاف معنی‌دار وجود داشت. نتایج به‌دست‌آمده از مقایسهٔ میانگین‌ها در جدول ۱ مشاهده می‌شود. از این نظر سویه‌های B1، B28، B2 و B32 به ترتیب بیشترین تأثیر را در کاهش بازدارندگی رشد میسلیوم قارچ بیمارگر داشتند (۸۶/۲-۷۵ درصد). سویه‌های B1 و B3 در آزمون متابولیت‌های فرّار به ترتیب بیشترین و کمترین تأثیر را در جلوگیری از رشد بیمارگر داشتند (جدول ۱).

جدول ۱. درصد بازدارندگی از رشد *B. cinerea* با سویه‌های باکتری باسیلوس در شرایط آزمایشگاه پس از یک هفته

Table 1. Mycelial growth inhibition percent of *B. cinerea* by *Bacillus* strains *in vitro* after 7 days

Bacillus isolates	Dual culture	Volatile compounds	Extracellular compounds
B1	32.9^{gh}	86.2^{a}	73.0^{b}
B2	36.6^{f}	80.0^{b}	60.2^{d}
B3	30.5^{h}	27.5^{h}	80.7^{a}
B14	34.1^{g}	40.0^{g}	41.0^{f}
B16	52.4^{c}	55.0^{f}	71.7^{bc}
B18	40.2^{e}	38.7^{g}	82.0^{a}
B20	67.1^{a}	61.2^{d}	73.0^{b}
B23	57.3^{b}	57.5^{e}	61.5^{d}
B28	45.1^{d}	82.5^{b}	70.5^{c}
B32	45.1^{d}	75.0^{c}	53.8^{e}

در هر ستون داده‌هایی که حروف مشترک دارند از نظر دانکن در سطح احتمال ۵درصد معنی‌دار نیستند.

Mean values within a column head followed by the same letter are not significantly different at 5% by Duncan's test.

www.SID.ir

Archive of SID

متابولیت‌های فرّار ترکیباتی با وزن مولکولی پایین و فعالیت ضدمیکروبی دارند (Fernando *et al.* 2005, Gu *et al.* 2007, Kai *et al.* 2007)، به‌طوری‌که توانمندی بسیار بالایی در مدیریت بیماری‌های پس از برداشت دارند (Mercier and Smilanick 2005, Schnabel and Mercier 2006). ترکیبات فرّار تولیدشده به‌وسیلهٔ مخمر *Candida intermedia* و باکتری *Streptomyces platensis* F-1 باعث جلوگیری و کاهش بیماری پوسیدگی میوهٔ توت‌فرنگی ناشی از قارچ *B. cinerea* می‌شوند (Huang *et al.* 2011, Wan *et al.* 2008).

نتایج آزمون ترشحات مایع بیرون یاخته‌ای نشان داد که سویه‌های B18 و B3 به ترتیب با مقدار ۸۲ و ۸۰/۷ درصد بیشترین تأثیر و سویهٔ B14 با میزان ۴۱ درصد کمترین تأثیر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ داشتند (جدول ۱).

تأثیر سویه‌های باکتری روی رشد میسلیوم و جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر در میوه‌های توت‌فرنگی

تأثیر ده سویهٔ باکتری روی رشد میسلیوم قارچ بیمارگر در روی میوهٔ سه رقم توت‌فرنگی نشان داد که سویهٔ B2 روی رقم Quineliza، دوسویهٔ B2 و B16 روی رقم Kurdistan و سویهٔ B3 روی رقم Paros به ترتیب با ۸۹/۶، ۸۵/۱ و ۸۶/۱ درصد بیشترین بازدارندگی از رشد میسلیوم روی میوه ایجاد کردند (جدول ۲). همچنین سویه‌های B14، B16، B18 و B28 شدت بیماری را روی هر سه رقم توت‌فرنگی بیشتر از ۶۰ درصد کاهش دادند (جدول ۲).

نتایج آزمون تأثیر بازدارندگی سویه‌های باکتری ناهمساز روی جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر نشان داد، سویه‌های باکتری از جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر روی میوه‌های توت‌فرنگی به‌طور شایان‌توجهی جلوگیری کردند، به‌طوری‌که بیشتر سویه‌های باکتری سبب کاهش شدت بیماری بیشتر از ۷۵ درصد در مقایسه با شاهد شدند و از جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر روی میوهٔ توت‌فرنگی جلوگیری کردند (جدول ۳). تیمار شاهد بیمارگر در هر سه رقم و در هر دو آزمون بین ۱۰۰-۸۵ درصد آلودگی نشان دادند (جدول‌های ۲ و ۳).

تحقیقات نشان داده که ترکیبات فرّار تولیدشده از مخمر *Candida intermedia* موجب کنترل بیماری پوسیدگی میوهٔ توت‌فرنگی ناشی از قارچ *B. cinerea* با جلوگیری از رشد میسلیوم و جوانه‌زنی کنیدی‌های آن می‌شود (Huang *et al.* 2001). شناسایی ترکیبات تولیدشده به‌وسیلهٔ مخمر *C. intermedia* نشان داد که از میان چهل‌ونه ترکیب شناسایی‌شده، دو ترکیب 1,3,5,7-cycooctatetraene و 3-methyl-1butanol بیشترین تأثیر در بازدارندگی از رشد میسلیوم و جوانه‌زنی قارچ *B. cinerea* دارند (Huang *et al.* 2011, Liang and Chi 2002). همچنین بررسی‌ها نشان داده که ترکیبات ضدمیکروبی تولیدشده به‌وسیلهٔ دو گونهٔ *Bacillus pumilu* و *B. subtilis* (CL27) به‌طور شایان‌توجهی از فعالیت قارچ *B. cinerea* عامل کپک خاکستری در گیاهان جلوگیری می‌کند (Leifert 1995).

جدول ۲. تأثیر سویه‌های باسیلوس روی رشد میسلیوم *B. cinerea* در میوهٔ سه رقم توت‌فرنگی پس از پنج روز

Table 2. Effect of *Bacillus* strains on mycelial growth of *B. cinerea* on strawberry fruit in three cultivars after 5 days

	Strawberry cultivars					
	Quineliza		Kurdistan		Paros	
Bacillus isolates	Disease severity	Reduction %	Disease severity	Reduction %	Disease severity	Reduction %
B1	2.9^{i}	40.8	2.6^{e}	44.6	1.2^{c}	71.4
B2	0.5^{a}	89.6	0.6^{a}	85.1	1.7^{e}	59.5
B3	2.3^{h}	53.1	1.3^{d}	72.3	0.6^{a}	86.1
B14	1.9^{f}	61.2	0.8^{b}	82.9	1.0^{b}	76.2
B16	1.9^{f}	61.2	0.6^{a}	85.1	0.9^{b}	78.8
B18	1.6^{e}	67.3	1.3^{d}	70.2	1.0^{b}	76.2
B20	2.2^{g}	55.1	1.1^{c}	76.6	1.4^{d}	66.7
B23	1.1^{c}	79.6	1.1^{c}	76.6	1.9^{f}	54.8
B28	1.4^{d}	72.4	0.8^{b}	82.9	1.2^{c}	71.4
B32	0.7^{b}	85.7	3.1^{f}	34.0	1.5^{d}	64.3
Control	4.9^{j}	-	4.7^{g}	-	4.2^{g}	-

در هر ستون داده‌هایی که حروف مشترک دارند از نظر دانکن در سطح احتمال ۵درصد معنی‌دار نیستند.

شدت بیماری بر اساس شاخص ۵-۰ بر اساس روش اصلاح‌شدهٔ هانگ و همکاران (۲۰۰۵) به شرح زیر محاسبه شد: ۰، میوهٔ سالم و بدون آلودگی؛ ۱، پوسیدگی میوه کمتر از ۲۰ درصد؛ ۲، پوسیدگی میوه بین ۴۰-۲۰/۱ درصد؛ ۳، پوسیدگی میوه بین ۶۰-۴۰/۱ درصد؛ ۴، پوسیدگی میوه بین ۸۰-۶۰/۱ درصد؛ ۵، پوسیدگی میوه بین ۱۰۰-۸۰/۱ درصد (Huang *et al.* 2011).

Mean values within a column head followed by the same letter are not significantly different at 5% by Duncan's test.

Disease severity determined using a scale of 0 to 5, where 0 represent healthy and symptomless of disease, 1, 2, 3, 4 and 5 represent <20, 20.1 to 40, 40.1 to 60, 60.1 to 80, and 80.1 to 100% of the area rotted, respectively (Huang *et al.* 2011).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. تأثیر سویه‌های باسیلوس روی جوانه‌زنی اسپور *B. cinerea* در میوهٔ سه رقم توت‌فرنگی پس از پنج روز

Table 3. Effect of *Bacillus* strains on spore germination of *B. cinerea* on strawberry fruit in three cultivars after 5 days

	Strawberry cultivars					
	Quineliza		Kurdistan		Paros	
Bacillus isolates	Disease severity	Reduction %	Disease severity	Reduction %	Disease severity	Reduction %
B1	0.4[b]	92	1.2[c]	75	0.4[b]	91.8
B2	1.6[e]	68	1.3[d]	72.9	1.7[e]	65.3
B3	0.1[a]	98	0.2[a]	95.8	0.3[b]	93.9
B14	0.1[a]	98	1.3[d]	72.9	0.1[a]	97.9
B16	0.6[c]	88	0.6[b]	87.5	0.7[c]	85.7
B18	0.8[d]	84	0.2[a]	95.8	0.9[d]	81.6
B20	0.3[b]	94	0.6[b]	87.5	0.4[b]	91.8
B23	0.5[c]	90	1.4[d]	70.8	0.7[c]	85.7
B28	0.6[c]	88	0.6[b]	87.5	0.7[c]	85.7
B32	0.8[d]	84	1.4[d]	70.8	0.8[dc]	83.7
Control	5.0[f]	-	4.8[e]	-	4.9[f]	-

در هر ستون داده‌هایی که حروف مشترک دارند از نظر دانکن در سطح احتمال ۵درصد معنی‌دار نیستند.

شدت بیماری مشابه جدول ۲ بر اساس روش اصلاح‌شدهٔ هانگ و همکاران (۲۰۰۵) انجام شد.

Mean values within a column head followed by the same letter are not significantly different at 5% by Duncan's test.
Disease severity determined using method which described previously (Huang *et al.* 2011).

نتایج هر دو جدول ۲ و ۳ نشان داد که سویه‌های باکتری ناهمساز موجب کاهش پوسیدگی میوهٔ توت‌فرنگی ناشی از قارچ *B. cinerea* می‌شوند و رشد میسلیوم و جوانه‌زنی اسپور قارچ بیمارگر روی میوهٔ توت‌فرنگی کاهش می‌دهند. این نتایج با یافته‌های دیگر پژوهشگران همخوانی دارد (Yanez-Mendizabal *et al.* 2012, Ilhan and Karabulut 2013, Nguyen *et al.* 2005, Kim *et al.* 2007). سازوکار کنترل بیماری پوسیدگی میوهٔ توت‌فرنگی و دیگر بیمارگرها محدودیت در جوانه‌زنی کنیدی و جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ بیمارگر (Buck 2002)، رقابت بر سر مواد غذایی و مکان (Liang *et al.* 2002)، تحریک سامانهٔ دفاعی گیاه و افزایش مقاومت در آن (Tian *et al.* 2007) است. نتایج این تحقیق اهمیت متابولیت‌های فرّار و ترشحات بیرون یاخته‌ای در کنترل بیماری کپک خاکستری توت‌فرنگی و بیماری‌های پس از برداشت را نشان می‌دهد. بررسی‌ها نشان داده که مادهٔ اصلی تشکیل‌دهندهٔ این ترکیبات که با تعدادی از جدایه‌های باسیلوس تولید می‌شود شامل لیپوپپتیدهای خانوادهٔ fengycin، zwittermycin A، Kanosamine (3-amino-3-deoxy-D-glucose) و پپتیدها مانند surfactin و subtilin هستند (Hang *et al.* 2005). همچنین ترکیبات ß-1, 3-glucanases، cellulases، proteases و chitinase توسط جدایه‌های باسیلوس تولید می‌شوند و باعث تخریب دیوارهٔ یاخته‌ای بیمارگرها و کاهش بیماری می‌شوند (Che′ rif *et al.* 1992, Nguyen *et al.* 2005). افزون بر این، تحقیقات نشان داده است که جدایه‌های تریکودرما هم باعث کاهش شدت بیماری پوسیدگی خاکستری توت‌فرنگی می‌شود و از رشد میسلیوم و جوانه‌زنی کنیدی قارچ بیمارگر جلوگیری می‌کنند (Tronsmo and Dennis 1977, Peng 1991, Naeimi and Zare 2014).

نتایج جدول‌های ۱، ۲ و ۳ نشان می‌دهد که سویه‌های B1، B2، B28 در شرایط آزمایشگاه به‌ویژه از نظر تولید سوخت‌وسازگرهای فرّار بیشترین تأثیر را روی بازدارندگی از رشد پرگنهٔ قارچ بیمارگر ایجاد کردند. همچنین سویه‌های B2، B3، B14 و B28 شدت بیماری را روی میوه‌های رقم‌های مختلف توت‌فرنگی بیشتر از دیگر سویه‌ها کاهش دادند.

نتایج کلی تحقیق نشان می‌دهد که سویه‌های *Bacillus* توانایی زیادی در کاهش بیماری کپک خاکستری توت‌فرنگی ناشی از قارچ *B. cinerea* به‌عنوان عامل دودانگیز زیستی (بیوفومیگانت) دارند. لذا کاربرد آن‌ها به‌عنوان عامل‌های کنترل زیستی بر علیه بیماری یادشده افزون بر ایمن بودن برای انسان و محیط‌زیست، مشکلات عوارض قارچ‌کش‌ها را هم ندارد. لذا کاربرد آن‌ها روی گیاه توت‌فرنگی پیش از برداشت و استقرار قارچ بیمارگر روی میوهٔ توت‌فرنگی ممکن است موجب پیشگیری و جلوگیری از گسترش بیماری در مزرعه و انبار شود. نیاز است تحقیقات تکمیلی در گلخانه و مزرعه روی تأثیر آن‌ها در کنترل بیماری صورت گیرد.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES

Afsharmanesh A, Ahmadzadeh M, Nikkhah MJ, Behboudi K (2014) Improvement in biocontrol activity of *Bacillus subtilius* UTB1 against *Aspergillus flavus* using gamma-irradiation. Crop Protection 60: 83-92.

Agrios GN (1997) Plant pathology. Academic Press, San Diego, CA, USA. pp. 339-342.

Arrebola E, Sivakumar D, Bacigalupo R, Korsten L (2010) Combined application of antagonist *Bacillus amyloliquefacience* and essential oils for the control of peach postharvest diseases. Crop Protection 29: 369-377.

Barka EA, 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.

Blacharski RW, Bartz JA, Xiao C, Legard DE (2001) Control of postharvest Botrytis fruit rot with preharvest fungicide application in annual strawberry. Plant Disease 85: 597-602.

Boff P, Kohl J, Jansen M, Horsten PJFM, 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.

Buck JW (2002) *In vitro* antagonism of *Botrytis cinerea* by phylloplane yeasts. Canadian Journal of Botany 80: 885-891.

Bulger MA, Ellis MA, Madden LV (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.

Casals C, eixido N, Vinas I, Silvera E, Lamarca N, Usall J (2010) Combination of hot water, *Bacillus subtilis* CPA-8 and sodium bicarbonate treatments to control postharvest brown rot on peaches and nectarines. European Journal of Plant Pathology 128: 51-63.

Chen Q, Ding KJ, Tan GJ (2007) Study on the resistance of *Botrytis cinerea* from strawberry to Procymidine. Chinese Agriculture Science Bulltein 23: 334-337. (in Chinese)

Chen H, Wang L, Su CX, Gong GH, Wang P, YU ZL (2008) Isolation and characterrization of lipopeptide antibiotics produced by *Bacillus subtillis*. Letters in Applied Microbiology 47: 180-186.

Che´rif M, Benhamou N, Be´langer RR (1992) Occurrence of cellulose and chitin in the hyphal cell walls of *Pythium ultimum*: a comparative study with other plant pathogenic fungi. Canadian Journal Microbiology 39: 213-222.

Das IK, Indira S, Annapurna A (2008) Biocontrol of charcoal rot in sorghum by fluorescent pseudomonads associated with the rhizosphere. Crop Protection 27: 1404-1414.

Ellis MB, Walker JM (1974) *Sclerotinia fuckelina* (conidial state: *Botrytis cinerea*). CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 431, CMI, Kew, Surrey, England.

Erdogan O, Benlioglu K (2010) Biological control of Verticillium wilt on cotton by the use of fluorescent *Pseudomonas* spp. under field conditions. Biological Control 53: 39-45.

Fernando WGD, Ramarathnam R, Krishnamoorthy AS, Savchuk SC (2005) Identification and use of potential bacteria organic antifungal volatiles in biocontrol. Soil Biology and Biochemesty 37: 955-964.

Fiddaman PJ, Rossall S (1993). The production of antifungal volatiles from *Bacillus subtilis*. Appleid Bacteriology 74: 119-126.

Gu YQ, Mo MH, Zhou JP, Zou CS, Zhang KQ (2007) Evaluation and identification of potential organic nematicidal volatiles from soil bacteria. Soil Biology Biochemestry 39: 2567-2575.

Hang NTT, Oh SO, Kim GH, Hur JS, Koh YJ (2005) *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* in strawberries. Plant Pathology Journal 21(1): 59-63.

Hennebert GL (1973) Botrytis and botrytis-like genera. Persoonia 7(2): 183-204.

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

Huang R, Li GQ, Zhang J, Yang L, Che HJ, Jiang DH, Huang HC (2011) Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. Phytopathology 101: 859-869.

Ilhan K, Karabulut OA (2013) Efficacy and population monitoring of bacterial antagonists for gray mold (*Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr.) infecting strawberries. BioControl 58: 457–470.

Janisiewicz WJ, Korsten L (2002) Biological control of postharvest disease of fruits. Annual Review of Phytopathology 40: 411-441.

Kai M, Effmertm U, Berg G, Piechulla B (2007) Volatiles of bacterial antagonist inhibit mycelial growth of the plant pathogen *Rhizoctonia solani*. Archives of Microbiology 187: 351-360.

Katz E, Demain AL (1977) The peptide antibiotics of *Bacillus*: Chemistry biogenesis and possible function. Bacteriological Review 41: 449-474.

Keel C, Weller DM, Natsch A (1996) Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* isolates from diverse geographic location. Applied and Environmental Microbiology 62: 552-563.

www.SID.ir

Archive of SID

Kim Hyun Ju, Soo Hee Lee, Choul Sung Kim (2007) Biological control of strawberry gray mold caused by *Botrytis cinerea* using *Bacillus licheniformis* N1 Formulation. Journal of Microbiology and Biotechnology 17(3): 438-444.

Leifert C (1995) Antibiotic production and biocontrol activity by *Bacillus subtilis* CL27 and *Bacillus pumilus* CL45. Journal of Applied Bacteriology 78: 97-108.

Liang QF, Chi ZM (2002) Study on antagonistic effect and mechanism by *Candida intermedia* for biological control of molds on vegetables and fruits. Food Ferment Indian 28: 34-38. (in Chinese)

Lima G, Ipplito A, Nigro F, Salerno M (1997) Effectiveness of *Aureobasidium pllulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. Postharvest Biology and Technology l0: 169-178.

Little ETM, Hills FJ (1978) Agricultural experimentation design and analysis. John Willey and Sons. Inc. New York. USA. 349 pp.

Mertely JC, MacKenzie SJ, Legard DE (2002) Timing of fungicide applications for *Botrytis cinerea* based on development stage of strawberry flowers and fruit. Plant Disease 86: 1019-1024.

Munimbazi C, Bullerman LB (1998) Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*. Mycopathologia 140: 163-169.

Naeimi S, Zare R (2014) Evaluation of indigenous *Trichoderma* spp. Isolates in biological control of *Botrytis cinerea*, the causal agent of strawberry gray mold disease. Biocontrol in Plant Protection 1(2): 55-74.

Nguyen Thi Thu Hang, Soon-Ok Oh, Gyoung Hee Kim, Jae-Seoun Hur, Young Jin Koh (2005) *Bacillus subtilis* S1-0210 as a biocontrol sgent against *Botrytis cinerea* in strawberries. Plant Pathology Journal 21(1): 59-63.

Nunes C, Manso T, Lima-Costa ME (2009) Postharvest biological control of citrus fruits. Tree Foresty Science Biotechnology 3: 116-126.

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

Ongena M, Henry G, Thonart P (2009) The role of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. In: Gisi. U., Chet, L., Gullino, M.L (Eds.), Recent developments in management of plant Disease. Plant Pathology in the 21st Century (Paper presented at the 9th international Congress of Plant Pathology, Berlin).

Osman MS, Sivakumar D, Korsten L (2011) Effect of biocontrol agent *Bacillus amyloliquefaciens* and 1-methyl cyclopropene on the control of postharvest disease and maintenance of fruit quality. Crop Protection 30: 173-178.

Peng G (1991) Biological control of grey mold (*Botrytis cinerea*) on strawberries. Ph.D. thesis. Univ. Guelph, Guelph, ON, Canada.

Rabolle M, Spliid NH, Kristensen K, Kudsk P (2006) Determination of fungicide residues in field-grown strawberries following different fungicide strategies against gray mold (*Botrytis cinerea*). Journal Agriculture Food Chemistry 54: 900-908.

Rigotti S, Viret O, Gindro K (2006) Two new primers highly specific for detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. Phytopathology Meditterrane 45: 253-260.

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

Schena L, Nigro F, Pentimone I, Ligorio A, Ippolito A (2003) Control of postharvest rots of sweet cherries and table grapes with endophytic isolates of *Aureobasidium pullulans*. Postharvest Biology and Technology 30: 209-220.

Schnabel G, Mercier J (2006) Use of a *Muscodor albus* pad delivery system for the management of brown rot of peach in shipping cartons. Postharvest Biology Technology 42: 121-123.

Stein T (2005) *Bacillus subtilis* antibiotics: Structures, syntheses and specific functions. Molecular Microbiology 56: 845-857.

Sutton JC (1995) Evaluation of microorganisms for biocontrol: *Botrytis cinerea* and strawberry, a case study. Advances in Plant Pathology 11: 173-190.

Sutton JC, Peng G (1993) Biocontrol of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. Phytopathology 83: 615-621.

Thomashow LS, Weller DM (1996) Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: mechanisms and antifungal metabolites. In: Stacey, G., Keen, N.T. (Eds.), Plant-Microbe Interactions. Chapman and Hall,New York, pp. 187-235.

Tian SP, Yao HJ, Deng X, Xu XB, Qin GZ, Chan ZL (2007) Characterization and expression of β-1,3-glucanase genes in jujube fruit induced by the microbial biocontrol agent *Cryptococcus laurentii*. Phytopathology 97: 260-268.

Torres R, Teixido N, Usall J, Abadias M, Vinas I (2005) Post-harvest control of *Penicillium expansum* on pome fruits by the bacterium *Pantoea ananatis* CPA-3. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 80: 75-81.

www.SID.ir

Archive of SID

Tronsmo A, Dennis C (1977) The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. Netherland Journal Plant Pathology 83 (1): 449-445.

Walker R, Powell AA, Seddon B (1998) Bacillus isolates from the spermosphere of peas and dwarf french beans with antifungal activity against *Botrytis cinerea* and *Pythium* species. Journal of Applied Microbiology 84: 791-801.

Wan MG, Li GQ, Zhang JB, Jiang DH, Huang HC (2008) Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal disease. Biological Control 46: 552-559.

Wei-Wei L, Wei MU, Bing-Yu ZHU, You-Chen DU, Feng LIU (2008) Antagonistic activities of volatiles from four strains of *Bacillus* spp. and *Paenibacillus* spp. against soil-borne plant pathogens. Agriculture Science China 7: 1104-1114.

Wilcox WF, Seem RC (1994) Relationship between strawberry gray mold incidence, environmental variables, and fungicide applications during different periods of the fruiting season. Phytopathology 84: 264-270.

Williamson B., Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. Molecular Plant Pathology 8: 561-580.

Wszelaki AL, Mitcham EJ (2003) Effect of combination of hot water dips, biological control and controlled atmospheres for control of gray mold on harvested strawberries. Postharvest Biology Technology 27: 255-264.

Yanez-Mendizabal Y, Vinas I, Usall J, Torres R, Solsona C, Teixido N (2012) Production of the postharvest biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8 using low cost commercial products and by-products. Biological Control 60: 280-289.

Yu GF, Zheng L, Mao CL, Zhao JW (2006) Epidemic and control of gray mould disease of strawberry. Shanghai Agriculture Science and Technology 1: 122. (in Chinese)

Zakira Naureen, Adam H Price, Fauzia Y Hafeez, Michael R Roberts (2009) Identification of rice blast disease-suppressing bacteria strains from the rhizosphere of rice grown in Pakistan. Crop Protection 28: 1052-1060.

Zheng M, Shi J, Shi J, Wang Q, Li Y (2013) Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus* strains on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. Biological Control 65: 200-206.

Zhou T, Schneider KE, Li X (2008) Development of biocontrol agents from food microbial isolates for controlling post-harvest pach brown rot caused by *Monilinia fructicola*. International Journal of Food Microbiology 125: 180-185.

www.SID.ir

Archive of SID

Biological Control of Pests and Plant Diseases
Vol. 5, No. 1, Spring & Summer 2016

Biological control of gray mold of three cultivar of strawberry using *Bacillus* strains

Jahanshir Amini[1*], Sasan Faizi[2] and Soheila Mirzaei[3]
1. Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Kurdistan, P. O. Box 416, Sanandaj, Iran
2. M.Sc. Student of Plant pathology, Department of Plant Protection, College of Agriculture, University of Kurdistan
3. Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Buali Sina University, Hamadan, Iran
(Received: Dec. 18, 2015 - Accepted: Jan. 29, 2016)

ABSTRACT

In this research, the ability of *Bacillus* strains in suppression of mycelial growth and conidial germination of *B. cinerea* against Botrytis fruit rot of strawberry were evaluated in three cultivars of strawberry including Quineliza, Paros and Kurdistan. Results indicated that among 32 strains of *Bacillus*, ten strains showed strong inhibitory effects against *B. cinerea* using the plate assay and they are selected for further studies. Antagonistic effects of *Bacillus* stains against the disease were evaluated through dual-culture, volatile and extracellular compounds using plate assays. Results indicated that all *Bacillus* strains could reduce the mycelial growth of pathogen, but this ability is varied in different *Bacillus* strains. Growth inhibition percent of pathogen in dual-culture, volatile and extracellular compounds tests were ranged 30.5-67.1, 27.5-86.2 and 41-82, respectively. In addition, inhibition of mycelial growth and conidial germination of *B. cinerea* by *Bacillus* strains were observed on strawberry fruits. Disease severity of Botrytis fruit rot of strawberry was significantly reduced ($p \leq 0.05$) by *Bacillus* strains as compared with untreated control. Our results shows that *Bacillus* strains have a good potential to control Botrytis fruit rot of strawberry. This research suggests that volatile and extracellular compounds of *Bacillus* spp. are promising biofumigants for controlling of Botrytis fruit rot of strawberry. Therefore, it is needed to evaluate their efficiency under field conditions.

Keywords: *Bacillus* spp., biological control, fruit rot of strawberry.

* Corresponding author E-mail: jamini@uok.ac.ir Tel: +98 87 33620552

www.SID.ir

Surf and download all data from SID.ir: www.SID.ir

Translate via STRS.ir: www.STRS.ir

Follow our scientific posts via our Blog: www.sid.ir/blog

Use our educational service (Courses, Workshops, Videos and etc.) via Workshop: www.sid.ir/workshop