

بررسی مقاومت رقم‌های تجارتي توت‌فرنگی در برابر *Botrytis cinerea* و تأثیر کنترلی اسانس رازیانه و قارچ‌کش ایپرودیون- کاربندازیم روی آن

۱. سید جعفر نصیری طالشی؛ ۲. صفرعلی مهدیان*؛ ۳. محمدعلی تاجیک قنبری؛ ۴. سید امین علیان
۱، ۲ و ۳. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد رشته بیماری‌شناسی گیاهی، استادیار و دانشیار،
گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴. مدیر کلینیک گیاه‌پزشکی بابلسر
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۸/۲۵ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۱/۲۴)

چکیده

قارچ *Botrytis cinerea* یکی از مهم‌ترین عامل‌های پوسیدگی میوه توت‌فرنگی است. به منظور ارزیابی بیماری‌زایی این قارچ و تأثیر کنترلی اسانس رازیانه روی آن، از میوه‌های توت‌فرنگی آلوده به پوسیدگی خاکستری در مناطق مختلف استان مازندران ۴۱ جدایه گردآوری شد. پس از خالص‌سازی، بیماری‌زایی جدایه‌ها روی سه رقم توت‌فرنگی کاماروسا، پاروس و گیلای انجام شد. شناسایی ریخت‌شناختی (مورفولوژیکی) جدایه‌ها با استفاده از مشخصات رویشی و شناسایی مولکولی با استفاده از آغازگر اختصاصی C729 و آغازگرهای عمومی ITS4 و ITS5 انجام شد. بازدارندگی از رشد قارچ با اسانس گیاه رازیانه و قارچ‌کش ایپرودیون- کاربندازیم آزمایش شد. نتایج نشان داد که بر پایه خصوصیات ریخت‌شناختی همه جدایه‌ها به قارچ *B. cinerea* تعلق داشتند. شناسایی جدایه‌ها با استفاده از آغازگر اختصاصی C729 نشان داد همه آن‌ها باند ۷۰۰ جفت بازی داشتند. بر پایه شدت بیماری‌زایی روی سه رقم توت‌فرنگی، جدایه‌ها در هفت گروه قرار گرفتند. ناحیه ITS دی. ان. آ. ریبوزومی نماینده گروه‌ها با استفاده از جفت آغازگرهای ITS4 و ITS5 افزایش شد. پس از توالی‌یابی و هم‌ردیف‌سازی با دیگر توالی‌های مرتبط ثبت‌شده در بانک ژن، بین جدایه‌ها تنوع بالایی ژنتیکی مشاهده شد. جدایه‌های مورد آزمایش در پنج گروه با همسانی ۸۰ درصد قرار گرفتند. در ارزیابی آزمایشگاهی مشخص شد که با بالا رفتن غلظت اسانس رازیانه، فعالیت ضدقارچی آن علیه *B. cinerea* افزایش یافت. غلظت ۱۰۰۰ µl/l تأثیر بازدارندگی بیشتری نسبت به دو غلظت پایین‌تر (۵۰۰ و ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر) داشت و میزان بیماری را تا ۹۴/۷ درصد در مقایسه با شاهد کاهش داد. قارچ‌کش ایپرودیون- کاربندازیم باعث مهار جدایه‌های این قارچ در آزمایشگاه شد.

کلیدواژگان: اسانس رازیانه، ایپرودیون- کاربندازیم، پوسیدگی خاکستری، توت‌فرنگی.

مقدمه

Rosaceae است که از تلاقی گونه‌های *F. virginiana* و *F. chiloensis* به‌دست آمده است (Hancock 1999). توت‌فرنگی افزون بر آنکه به‌صورت تازه‌خوری به مصرف

توت‌فرنگی (*Fragaria ananassa* Duchesne ex Decne. & Naudin) گیاه علفی دائمی از خانواده

تشخیص گونه *B. cinerea* استفاده شده‌اند (Rigotti et al. 2002). تغییر در جمعیت‌های این جنس خیلی معمول بوده و هنگامی که در معرض انتخاب قرار می‌گیرند (به‌عنوان مثال در برابر قارچ‌کش‌ها)، چنین تغییراتی به وجود می‌آید. کشت دوباره با استفاده از کنیدیوم‌ها اغلب از والدین و از همدیگر متفاوت است. این نشان می‌دهد که میسلیم‌ها، کنیدیوم‌ها و سختینه‌ها توانایی‌های متفاوتی برای بقا و انتشار دارند (Elad et al. 2007). هولست- جنسن و همکاران در آزمایشی توالی‌های ژن‌های ITS را در قارچ بوتریتیس تجزیه و تحلیل کردند. آنان نتیجه گرفتند که تغییر در ناحیه ITS درون جنس بوتریتیس کم بوده و نمی‌تواند روابط خویشاوندی بین اعضای درون این جنس را نشان دهد (Holst-Jensen et al. 1998). استاتس و همکاران نواحی ITS را در گونه *B. anthophila* بررسی کردند. آن‌ها دریافتند که توالی ITS در گونه *B. anthophila* از نظر تشخیصی به‌عنوان توالی‌های ITS قارچ ریزوکتونیا تشخیص داده شد. بنابراین این توالی از تجزیه و تحلیل‌های دیگر قارچ بوتریتیس مستثنا به شمار آمد (Staats et al. 2005).

استفاده از اسانس‌های گیاهی در کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه در سال‌های اخیر مطرح شده است. این ترکیب‌ها نه‌تنها اثرگذاری‌های سوء جانبی ندارند، بلکه به علت خواص پاداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی)، کیفیت و طول دوره انبارداری میوه‌ها را افزایش می‌دهند (Anthony et al. 2004, Plaza et al. 2003). در گزارشی بوشرا و همکاران ثابت کردند که *Thymus glandulosus* با غلظت ۱۰۰ ppm در شرایط آزمایشگاه به میزان ۱۰۰ درصد مانع از رشد میسلیم‌های *B. cinerea* شده است (Bouchra et al. 2003). همچنین اسانس به‌دست‌آمده از گل داوودی (*Chrysanthemum leucanthemum*) با غلظت ۱۰۰ ppm خاصیت آنتاگونیستی علیه *B. cinerea* داشته است (Chebli et al. 2004). بر پایه گزارش ازان (Ozan et al. 2003) خاصیت آنتاگونیستی برخی از اسانس‌های گیاهی مانند مریم‌گلی، برگ‌بو، شوید، زیره سبز، رازیانه و آویشن در کنترل *B. cinerea* به اثبات رسید. پیغامی و همکاران (۲۰۰۷) فعالیت ضدقارچی اسانس‌های چندگونه گیاهی شامل میخک هندی، رازیانه، زیره سبز

می‌رسد در تهیه مربا، ژله، بستنی و شیرینی نیز کاربرد دارد.

توت‌فرنگی به بیماری‌هایی مانند پوسیدگی خاکستری (*Botrytis cinerea*)، لکه زایه‌ای برگ (*Xanthomonas fragariae*)، آنتراکونوز (*Colletotrichom spp.*)، لکه برگی رامولاریایی (*Mycosphaerella fragariae*)، قرمز شدن مغز ریشه (*Phytophthora fragariae*) و پوسیدگی سیاه ریشه (*Pythium spp.*) آلوده می‌شود. در استان مازندران پوسیدگی خاکستری (*Botrytis cinerea*) از نظر اهمیت اقتصادی به‌ویژه در سال‌های پرباران، مهم‌ترین بیماری توت‌فرنگی به شمار می‌آید.

قارچ عامل پوسیدگی خاکستری (*Botrytis cinerea*) با فرم جنسی *Anamorphic Botryotinia* (Per. (1974); *Botryotinia fuckeliana* هپلوئید، رشته‌ای و هتروتال است. به دلیل داشتن کنیدیوم‌ها و بخش‌های ریشه‌ای (هیفی) چندهسته‌ای، جدایه‌های این قارچ تمایل به تغییر ژنتیکی مداوم دارند (Elad et al. 2007). طبقه‌بندی جنس *Botrytis* به‌طور عمده بر پایه خصوصیات ریخت‌شناختی (مورفولوژیک)، رشد روی محیط کشت و اختصاصی بودن میزبان بنا شده است (Hennebert 1973, Jarvis 1977). شکل و اندازه سختینه و اندازه کنیدیوم در شناسایی بعضی گونه‌ها مفیدند. اما تعداد زیادی از گونه‌ها از نظر ساختار ظاهری (مورفولوژی) همسان‌اند و شرایط رشدی خاص در تنوع آن‌ها مؤثر است (Beever and Weeds 2004). معمول‌ترین گونه این جنس *B. cinerea* است که روی دامنه گسترده‌ای از گیاهان میزبان به‌صورت انگل (پارازیت) یا پوده‌رست (ساپروفیت) رشد می‌کند اما بیشتر گونه‌های دیگر دامنه میزبانی محدودتری دارند. یاخته‌های ریشه‌ای و کنیدیومی بوتریتیس چندهسته‌ای هستند. در کنیدیوم‌ها تعداد هسته بین ۳ تا ۶ است (Grindle 1979). میکروکنیدیوم‌ها تک‌هسته‌ای و به‌ندرت در محیط کشت آزمایشگاهی جوانه می‌زنند و نقش گامت نر را در مراحل تولیدمثل جنسی دارند (Faretra and Antonacci 1987).

در سال‌های اخیر برای شناسایی گونه‌های *Botrytis* از نشانگرهای مولکولی استفاده می‌شود. تعدادی آغازگر اختصاصی گونه مانند C729 به‌دست آمده‌اند که در

کپک خاکستری توت‌فرنگی و شناسایی بیماری‌زایی جدایه‌های *B. cinerea* و بررسی تنوع فنوتیپی و ژنوتیپی بین آن‌ها و بررسی امکان وجود درجه‌های مختلف حساسیت آن‌ها به اسانس گیاه رازیانه و قارچ‌کش ایپرودیون- کاربندازیم در استان مازندران انجام شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌برداری

نمونه‌ها از مزارع توت‌فرنگی شهرهای مختلف استان مازندران گردآوری شدند. از میوه‌هایی که نشانه‌های بیماری (پوسیدگی و کپک خاکستری) روی آن‌ها وجود داشت نمونه‌هایی انتخاب شد و داخل قوطی‌های کوچک یک‌بارمصرف به آزمایشگاه انتقال یافتند. نمونه‌ها با حرف B و از شماره ۱ تا ۴۱ نام‌گذاری شدند (جدول ۱).

و نعنای فلفلی را علیه کپک خاکستری سیب بررسی کردند. نتایج نشان داد که اسانس رازیانه در مقایسه با اسانس میخک هندی مؤثرتر بوده، میزان بیماری را تا ۱۵/۵ درصد در مقایسه با شاهد آلوده (۱۰۰ درصد) کاهش داد (Peighami-Ashnaei et al. 2007). قارچ‌کش ایپرودیون با نام تجارتي رورال از گروه دی‌کربوکسیمیدها است و خاصیت قارچ‌کشی انتخابی علیه بوتریتیس دارد. فرمولاسیون رورال-تی اس حاوی این قارچ‌کش به‌علاوه کاربندازیم از گروه بنزیمیدازول‌ها است که به‌صورت پودر و تابل ۵۲/۵ درصد عرضه شده است. کاربرد گسترده این ترکیب‌ها و نیز داشتن نقطه اثر اختصاصی آن‌ها سبب بروز مقاومت شدید در قارچ‌ها شده است (Rakhshani-Zabol and Taheri 2006). این پژوهش با هدف تعیین درجه‌های مختلف حساسیت و مقاومت سه رقم توت‌فرنگی تجارتي در برابر

جدول ۱. شماره جدایه، نوع رقم و محل گردآوری نمونه‌های توت‌فرنگی آلوده به کپک خاکستری

Table 1. Number of isolates, type of variety and place of collecting strawberry samples infected with gray mold

Cultivar	Sampling location	Isolate No.	Cultivar	Sampling location	Isolate No.	Cultivar	Sampling location	Isolate No.
Camarosa	Bahnamir	B29	Camarosa	Amirkola	B15	Camarosa	Sari	B1
Dalandi	Bahnamir	B30	Camarosa	Fridonkenar	B16	Camarosa	Sari	B2
Camarosa	Joybar	B31	Camarosa	Amol	B17	Dalandi	Kiakola	B3
Camarosa	Ghaemshahr	B32	Camarosa	Babol	B18	Camarosa	Sari	B4
Camarosa	Ghaemshahr	B33	Camarosa	Amol	B19	Camarosa	Fridonkenar	B5
Camarosa	Ghaemshahr	B34	Camarosa	Ghaemshahr	B20	Dalandi	Joybar	B6
Camarosa	Bahnamir	B35	Camarosa	Fridonkenar	B21	Camarosa	Bahnamir	B7
Camarosa	Ghaemshahr	B36	Camarosa	Bahnamir	B22	Camarosa	Kiakola	B8
Camarosa	Ghaemshahr	B37	Camarosa	Amol	B23	Dalandi	Kiakola	B9
Dalandi	Bahnamir	B38	Camarosa	Babol	B24	Camarosa	Sari	B10
Camarosa	Fridonkenar	B39	Camarosa	Babol	B25	Dalandi	Babolsar	B11
Camarosa	Bahnamir	B40	Camarosa	Babol	B26	Dalandi	Fridonkenar	B12
Camarosa	Bahnamir	B41	Camarosa	Bahnamir	B27	Dalandi	Joybar	B13
			Camarosa	Bahnamir	B28	Camarosa	Joybar	B14

ریسه‌ای برداشته شد و به محیط غذایی سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) منتقل شد و به این ترتیب کشت خالص قارچ به دست آمد. برای نگهداری قارچ، هر یک از جدایه‌ها در لوله حاوی محیط PDA کشت شد و در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد. برای اثبات بیماری‌زایی جدایه‌ها، میوه‌های سالم پس از ضدعفونی سطحی با اتانل ۷۰ درصد، با دروایه اسپوری با غلظت 1×10^4 اسپور در میلی‌لیتر مایه‌زنی شدند (تیمار شاهد با آب مقطر سترون مایه‌زنی شد) و بی‌درنگ با کیسه‌های پلاستیکی پوشیده و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۴۸

جداسازی، خالص‌سازی و بررسی بیماری‌زایی جدایه‌ها میوه‌های آلوده توت‌فرنگی به مدت یک‌شب داخل دسیکاتور نگهداری شدند تا اسپور قارچ در سطح آلوده آن‌ها ظاهر شد. به کمک سوزن مقداری از توده اسپوری به ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استریل افزوده شد و دروایه (سوسپانسیون) اسپور تهیه شد. دروایه اسپور روی محیط آب-آگار (WA) ۲ درصد پخش شد و پس از ۲۴ ساعت به کمک استریومیکروسکوپ تعدادی از اسپورهای جوانه‌زده انتخاب و به محیط WA با دمای ۲۵ درجه سلسیوس منتقل شدند. پس از دو روز قطعه‌هایی از نوک رشد

۰/۲µl Taq DNA polymerase (12.5Pmol/µl)، آنزیم Peqlab (Primus 25 (4 unit) بود. از دستگاه ترموسایکلر (advanced) برای افزایش استفاده شد. بنابر برنامه داده شده به دستگاه، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز بر پایه یک چرخه واسرشت اولیه، چهار دقیقه ۹۴ درجه سلسیوس، ۳۵ چرخه واسرشت یک دقیقه ۹۴ درجه سلسیوس، مرحله اتصال یک دقیقه ۶۰ درجه سلسیوس، گسترش یک دقیقه ۷۲ درجه سلسیوس و یک چرخه گسترش نهایی به مدت ده دقیقه ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد.

جدول ۲. آغازگرها و توالی مورد استفاده برای شناسایی

مولکولی جدایه‌های قارچ بوتریتیس سینرا/

Table 2. Primers and sequence used for molecular identification of the *Botrytis cinerea*

Primer	Sequence
C729+	5'-AGCTCGAGAGAGATCTCTGA-3'
C729-	5'-CTGCAATGTTCTGCGTGGAA-3'
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'
ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'

پس از اطمینان از افزایش DNA، باقیمانده محصول PCR برای تعیین توالی نمونه‌ها به شرکت میلارژین (Millargine) فرانسه ارسال و توالی ژنوم نمونه‌ها به دست آمد. توالی به دست آمده از طریق نرم‌افزار بلاست در پایگاه اطلاعاتی NCBI بررسی و همسانی (همولوژی) آن با توالی‌های ثبت شده در بانک جهانی تعیین شد.

تهیه مواد گیاهی و استخراج اسانس

بذر رازیانه از فروشگاه تهیه شد. پس از حذف مواد زائد، بذرهای کامل و تمیز در هاون چینی خرد شدند. استخراج اسانس به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر (Clevenger apparatus) به مدت سه ساعت انجام شد. استخراج اسانس در دو تکرار و برای هر تکرار ۵۰ گرم بذر رازیانه استفاده شد. اسانس به دست آمده در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سلسیوس درون یخچال تا آزمایش بعدی نگهداری شد.

تأثیر ضد قارچی اسانس رازیانه و قارچ کش ایپرودیون- کاربندازیم

بررسی این تأثیر در شرایط آزمایشگاه روی هفده جدایه *B. cinerea* به روش اختلاط با محیط کشت انجام شد

ساعت کیسه‌ها برداشته شدند و پیشرفت بیماری به روش کپ دوپل و همکاران یادداشت شد. در این روش مقدار پوسیدگی بافت میوه بین ۰ تا ۱۰۰ به ده گروه تقسیم شده و به هر گروه نمره یا عدد کمی (جدول ۳) داده شد (Capdeville et al. 2004).

تعیین واکنش رقم‌ها

شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها روی سه رقم توت‌فرنگی کاماروسا، پاروس و گیلایس آزمایش شد (Capdeville et al. 2004). به این منظور هر یک از جدایه‌ها روی رقم‌های توت‌فرنگی مایه‌زنی شدند و پس از سه تا پنج روز واکنش گیاهان یادداشت شد. جدایه‌های مورد آزمایش در نه گروه بیماری‌زایی درجه‌بندی شدند و از هفت گروه با شدت بیماری‌زایی بالا یک جدایه به عنوان نماینده برای بررسی تنوع ژنتیکی انتخاب شد (جدول ۳).

شناسایی قارچ بیمارگر

به منظور شناسایی ریخت‌شناختی قارچ *B. cinerea* خصوصیات ریسه، کنیدیوم‌ها، یاخته‌های کنیدیوم‌زا، اسپور و مشخصات رویشی قارچ روی محیط کشت بررسی شد. رنگ و شکل پرگنه‌ها، تشکیل سختینه در محیط کشت، اندازه و فراوانی آن‌ها، خصوصیات میکروسکوپی قارچ مانند اندازه اسپور و طول کنیدیوم‌ها در محیط کشت PDA طی ۱۴ روز بررسی و مشخصات آن‌ها یادداشت شد (Ellis 1971, Barnett and Hunter 1998, Mirzaei et al. 2007). برای شناسایی مولکولی قارچ از آغازگر اختصاصی C729 و آغازگرهای عمومی ITS4 و ITS5 (جدول ۲) استفاده شد (Rigotti et al. 2002, White et al. 1990). در آغاز بر پایه مشخصات ریخت‌شناختی تعداد هفده جدایه انتخاب و سپس جدایه‌ها در محیط مایع عصاره مالت (MEB) روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه به مدت هفت روز با دمای ۲۰ درجه سلسیوس کشت داده شدند. توده میسلیمی به دست آمده با آب مقطر سترون شستشو و پس از آب‌گیری، در هاون سترون سرد به کمک نیتروژن مایع پودر شد، سپس مراحل استخراج DNA با روش دوپل و دوپل انجام گرفت (Doyle and Doyle 1990). محلول پایه شامل آب دو بار تقطیر سترون ۱۶/۳µl، بافر PCR ۲/۵µl، کلرید منیزیم ۱µl، dNTPs ۱µl، آغازگرها ۲µl

نتایج

بیماری‌زایی جدایه‌ها و واکنش رقم‌ها

نتیجه آزمایش بیماری‌زایی جدایه‌ها نشان داد که پوسیدگی و پوشش کپک خاکستری روی قسمت مایه‌زنی شده میوه با همه جدایه‌ها به وجود آمد، اما شدت بیماری‌زایی و زمان لازم برای تولید کپک و سختینه در جدایه‌های مختلف متفاوت بود (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). تعدادی از جدایه‌ها در سه روز اول پس از آلودگی شدت بیماری‌زایی شدید داشتند و به سرعت بافت میوه را اشغال کردند. اولین سه روز پس از آلودگی می‌تواند یک ملاک مناسب برای مقایسه و رتبه‌بندی جدایه‌های *B. cinerea* باشد (Zadehdabagh *et al.* 2010). در تعدادی از جدایه‌ها اشغال کامل بافت میوه پس از سه روز رخ داد و در برخی از جدایه‌ها که بیماری‌زایی ضعیف (درجات ۴ و ۵) داشتند، این زمان به پنج روز رسید. جدایه‌ها بر پایه شدت بیماری‌زایی در هفت گروه (دارای فراوانی بالای ۱۰ درصد) قرار گرفتند (جدول ۳). از هر گروه یک نماینده برای آزمایش‌های بعدی انتخاب شد.

نتیجه ارزیابی واکنش رقم‌های کاماروسا، پاروس و گیلای در برابر جدایه‌ها نشان داد که رقم گیلای در بین سه رقم مورد آزمایش حساس‌ترین رقم بود. پس از آن رقم‌های کاماروسا و پاروس به ترتیب حساسیت کمتری داشتند (جدول ۱ و شکل‌های ۲ و ۳). در رقم گیلای ۳ روز پس از مایه‌زنی با جدایه‌های B34 و B40، کپک خاکستری با سختینه‌های مشخص و قابل‌رؤیت با چشم غیر مسلح به وجود آمد اما در رقم پاروس گسترش آلودگی و تشکیل کپک در حد معمول بود. این نتایج نشان داد که میزان حساسیت رقم‌ها در برابر جدایه‌های قارچ *B. cinerea* متفاوت بوده و در بین سه رقم مورد آزمایش رقم گیلای حساس‌ترین و رقم پاروس مقاوم‌ترین بودند (شکل ۲ و ۳).

(Huang *et al.* 2011). به اسانس تهیه‌شده مقداری محلول توئین ۸۰ (۰/۵ درصد) اضافه شد تا به صورت امولسیون در آمد. به محیط کشت PDA در حال سرد شدن، به نسبت ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر اسانس رازیانه در لیتر اضافه شد و پس از هم زدن، درون تشتک‌های پتری تقسیم شد. قارچ‌کش ایپرودیون- کاربندازیم نیز به نسبت ۱/۵ و ۲ در هزار به صورت امولسیون یکنواخت تهیه شد و به محیط کشت سترون در حال سرد شدن اضافه شد. از کشت‌های جوان چهار روزه قارچ *B. cinerea* دیسک‌های قارچی به قطر ۵ میلی‌متر برداشت شد و در مرکز تشتک آزمایش حاوی محیط کشت قرار داده شد. تشتک‌های پتری مایه‌زنی شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در اتاقک رشد نگهداری شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت رشد رویشی هاله قارچ تا هنگامی که سطح محیط کشت تشتک پتری شاهد توسط قارچ به‌طور کامل اشغال شود، به‌طور روزانه اندازه‌گیری و یادداشت شد. درصد بازدارندگی از رشد قارچ در تیمارهای مختلف با فرمول ابوت (رابطه ۱) تصحیح شد (Abbotte 1925).

$$IG = [(C-T)/C] \times 100 \quad (1)$$

IG = درصد بازدارندگی از رشد میسلومی قارچ بیمارگر
 C = قطر رشد میسلوم بیمارگر در تشتک شاهد
 T = قطر رشد میسلوم بیمارگر در هر تیمار
 تیمار شاهد شامل محیط کشت PDA بدون اسانس و قارچ‌کش (فقط حاوی محلول توئین ۸۰ (۰/۵ درصد) در نظر گرفته شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی در سه تکرار انجام گرفت و گروه‌بندی تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح $P < 0.01$ انجام شد.

جدول ۳. شدت بیماری‌زایی و فراوانی پرازایی جدایه‌های *Botrytis cinerea* روی سه رقم توت‌فرنگی تجارتي

Table 3. Pathogenesis severity and frequency of isolates virulence of *Botrytis cinerea* on three varieties of commercial strawberries

Disease severity	0	0-2	2-5	5-10	10-15	15-25	25-50	50-75	75-100	100	Sensitivity
Average ¹	0	1	3.5	7.5	12.5	20	37.5	62.5	87.5	100	
Score (degree)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
² Frequency of isolates											
Cultivars											
Gilasi 1×2 ²	0	0	0	0	0	0	0	10	16	15	3525
Comorosa 1×2	0	0	10	30	62	200	487	250	175	0	1214
Parus 1×2	0	6	24	75	125	80	150	0	0	0	459

*¹ Mean of disease severity (%) × ² Frequency of isolates

*¹ میانگین شدت بیماری (%) × ² فراوانی جدایه‌ها



شکل ۱. نشانه بیماری‌زایی جدایه B2 قارچ *B. cinerea* روی میوه دو رقم توت‌فرنگی

Figure 1. Pathogenicity symptoms of B2 isolate of *B. cinerea* on the fruit of two varieties of strawberry



شکل ۲. واکنش رقم‌های توت‌فرنگی در برابر جدایه B34 قارچ *B. cinerea* سه روز پس از مایه‌زنی

Figure 2. Reaction of strawberry varieties against B34 isolate of *B. cinerea* three days after inoculation



شکل ۳. واکنش دو رقم توت‌فرنگی در برابر جدایه B40 قارچ *B. cinerea* سه روز پس از مایه‌زنی

Figure 3. Reaction of two strawberry varieties against B40 isolate of *B. cinerea* three days after inoculation

جدایه‌های B8 و B14 ضعیف‌ترین بیماری‌زایی و جدایه‌های B40 و B41 شدیدترین بیماری‌زایی روی هر سه رقم داشتند. چنانچه در جدول ۳ محاسبه شده است با ضرب کردن اعداد میانگین شدت بیماری در اعداد فراوانی جدایه‌ها، مقدار عددی به دست آمد که نشان‌دهنده میزان حساسیت رقم‌ها یا سازگاری آن‌ها است (جدول ۳ ستون آخر). این اعداد برای مقایسه میزان حساسیت رقم‌ها در برابر جدایه‌ها به کار می‌آیند و نشان می‌دهند رقم گیلاسی با گرفتن بالاترین مقدار عددی (۳۵۲۵) به عنوان رقم حساس و رقم پاروس با پایین‌ترین عدد (۴۵۹) رقم مقاوم است.

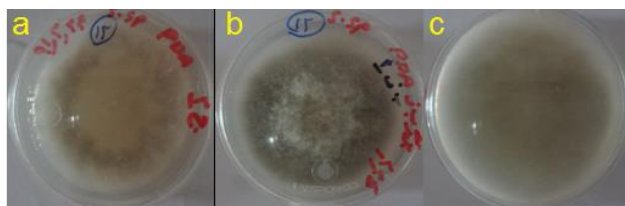
شناسایی ریخت‌شناختی قارچ بیمارگر

شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها نشان داد که آن‌ها از نظر خصوصیات ریخت‌شناختی با قارچ عامل کپک خاکستری تطابق داشتند و همه آن‌ها متعلق به قارچ *Botrytis cinerea* بودند (شکل‌های ۴ و ۵). الگوی رشدی جدایه‌ها روی محیط PDA در دمای ۲۰ درجه

نتیجه شدت بیماری‌زایی جدایه‌های قارچ *B. cinerea* نشان داد که در بین جدایه‌های گردآوری شده تنوع بیماری‌زایی بالایی وجود داشته و از نظر شدت بیماری‌زایی با هم تفاوت داشتند (جدول ۳). این نتایج با گزارش‌های میلنا و سیلوا، زاده‌دباغ و همکاران همخوانی داشت (Milena and Silva, 2005, Zadehdabagh et al. 2010). شدت بیماری‌زایی جدایه‌های B34 (شکل ۲) و B40 (شکل ۳) نشان داده شده است. در نتیجه مایه‌زنی جدایه B34 روی میوه توت‌فرنگی، سه روز پس از مایه‌زنی شدت بیماری‌زایی با نمره ۵ روی رقم پاروس، نمره ۶ روی رقم کاماروسا و نمره ۸ روی رقم گیلاسی به وجود آمد. اما با مایه‌زنی جدایه B40 سه روز پس از مایه‌زنی شدت بیماری‌زایی با نمره ۷ روی رقم پاروس، نمره ۹ روی رقم کاماروسا و نمره ۱۰ روی رقم گیلاسی به وجود آمد. نمره ۱۰ به معنی شدت بیماری‌زایی زیاد است که با تشکیل سختینه و پوسیدگی کامل همراه است و در شکل ۳ قابل مشاهده است. این نتایج نشان داد که شدت بیماری‌زایی جدایه‌ها متفاوت بوده و در بین جدایه‌های مورد آزمایش

۲۴/۷ میکرومتر و طول کنیدیوفورها ۱۲۸۵ میکرومتر بود. کنیدیوم‌ها به‌طور معمول در سطح محیط کشت به فراوانی تولید شدند. سختینه‌ها در بعضی جدایه‌ها روی حلقه‌های متحدالمرکز یا در امتداد لبهٔ تشتک پتری و به‌طور نامنظم و پراکنده تولید شدند. میانگین اندازهٔ سختینه‌ها ۵×۷ میلی‌متر بود. سختینه‌ها به رنگ سیاه، سیاه براق و سبز تیره بودند. در آغاز سفید و باگذشت زمان تیره شدند و از نظر شکل و اندازه متغیر بودند (شکل ۵). نتیجهٔ شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها نشان داد که آن‌ها از نظر برخی خصوصیات ریخت‌شناختی متنوع بوده و متعلق به قارچ *Botrytis cinerea* بودند. این نتایج با گزارش‌های میرزایی و همکاران، خزائلی و همکاران همخوانی داشت (Mirzaei et al. 2008, Khazaeli et al. 2010).

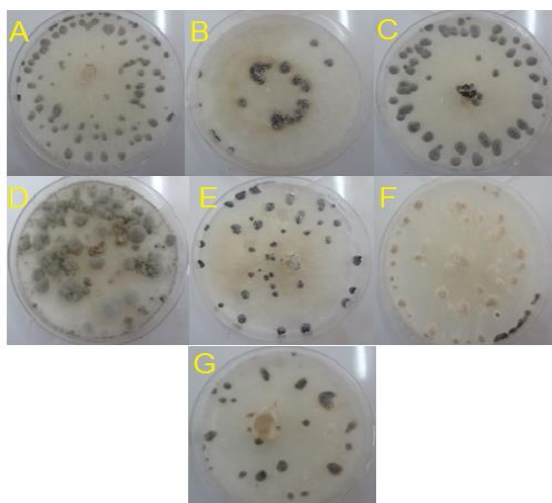
سلسیوس زیر نور معمولی که در شرایط استاندارد رشد کرده بودند، متفاوت بود. پرگنه‌ها به‌صورت فشرده، پنبه‌ای، زگیلی، شعاعی یا به‌صورت حلقه‌های متحدالمرکز بودند. پرگنه‌ها در آغاز سفید، سفید کثیف، سفید خاکستری یا شفاف بودند اما خیلی زود به‌صورت خاکستری روشن، خاکستری تیره تا قهوه‌ای تیره، سبز بیدی، خاکی یا به رنگ موش شدند. جدایه‌ها در تشتک پتری حاوی محیط PDA به مدت هفت روز در دمای ۲۰ تا ۲۲ درجهٔ سلسیوس زیر نور معمولی رشد داده شدند و کنیدیوم تولید کردند. اسپورزایی جدایه‌ها بیشتر از قسمت‌های قدیمی پرگنه و گاهی در قسمت‌های حاشیهٔ پرگنه آغاز شد. در برخی جدایه‌ها، کنیدیوم‌ها روی حلقه‌های متحدالمرکز تولید شدند. میانگین ابعاد کنیدیوم‌ها ۷×۹/۵ میکرومتر، ضخامت کنیدیوفورها



شکل ۴. الگوهای مختلف رشد پرگنه در سه جدایهٔ قارچ *B. cinerea* روی محیط PDA.

(a) پرگنه با حلقه‌های متحدالمرکز؛ (b) پرگنهٔ پنبه‌ای شکل؛ (c) پرگنهٔ فشرده و خاکستری تیره.

Figure 4. Different patterns of colony growth in three isolates of *B. cinerea* on the PDA medium. a) colony with concentric circles; b) Cottony shape colony; c) Compact and dark gray colony



شکل ۵. تشکیل سختینه در هفت جدایهٔ نمایندهٔ قارچ *B. cinerea* روی محیط PDA پس از هفت روز (جدول ۳، نمرات ۴ تا ۱۰). (A) سختینه‌های فراوان در حلقه‌های متحدالمرکز؛ (B) سختینه به تعداد کم در یک حلقهٔ مرکزی؛ (C) سختینه‌ها در حلقه‌های متحدالمرکز در حاشیه‌های تشتک پتری؛ (D) سختینه‌های فراوان، درشت و نامنظم در همهٔ سطح تشتک پتری؛ (E) سختینه‌ها با اندازه‌های متفاوت و پراکنده در تشتک پتری؛ (F) سختینه‌ها اغلب شفاف و نامنظم؛ (G) سختینه‌ها به تعداد کم و نامنظم در تشتک پتری

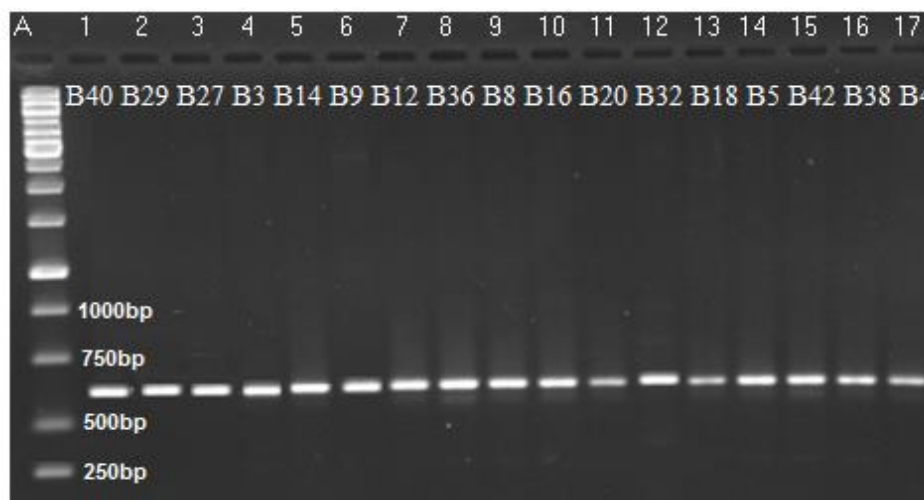
Figure 5. Sclerotium formation in seven representative isolates of *B. cinerea* on PDA medium after 7 days (Table 3, grades 4 to 10).

A) Sclerotia abundant in concentric circles ; B) Sclerotium in small numbers in a central circle; C) Sclerotia in concentric rings on the sidelines of petri dishes; D) Sclerotium abundant, coarse and irregularly throughout the entire petri dishes; E) Sclerotia with different sizes and scattered in petri dishes; F) Sclerotia most transparent and irregular; G) Sclerotia on the number of low and irregular in petri dishes.

شناسایی مولکولی قارچ بیمارگر

شناسایی مولکولی جدایه‌های قارچ *B. cinerea* روی هفده جدایه انتخابی (از نظر خصوصیات ریخت‌شناختی) با استفاده از آغازگر C729 و آغازگرهای ITS4 و ITS5 انجام شد. در جدایه‌های مورد آزمایش با استفاده از آغازگر اختصاصی C729 همه جدایه‌ها باند ۷۰۰ جفت بازی را افزایش کردند (شکل ۶). بنا بر گزارش ریگوتی و همکاران آغازگر C729 می‌تواند یک قطعه ۷۰۰ جفت بازی را که به گونه *B. cinerea* اختصاص دارد، افزایش کند (Rigotti *et al.* 2002). این قارچ در محیط کشت ترکیبات پلی‌ساکارید تولید می‌کند و موجب آلودگی DNA می‌شود، بنابراین باید از کمترین مواد غذایی و کشت تازه قارچ برای استخراج DNA استفاده کرد (Saghi-Younesi *et al.* 2014). استفاده از آغازگرهای اختصاصی و به دست آوردن باند واضح و مشخص بسیار حساس است و دقت بالایی لازم دارد. در این پژوهش یک باند ۷۰۰ جفت بازی به صورت واضح در همه جدایه‌های مورد آزمایش افزایش شد. این نتیجه نشان داد که همه جدایه‌های مورد آزمایش متعلق به قارچ *B. cinerea* بودند (شکل ۶). با استفاده از آغازگرهای ITS4 و ITS5 که با نه جدایه مورد آزمایش انجام شد، باند ۳۵۰ جفت بازی برای همه آن‌ها افزایش شد. نمودار (دندروگرام) به دست آمده نشان داد میزان همسانی

جدایه‌ها به روش تجزیه خوشه‌ای با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 ضریب همبستگی ۸۰ درصد داشته و جدایه‌ها را می‌توان به ۵ گروه تقسیم کرد (شکل ۷). گروه ۱ شامل سه جدایه B3, B40 و B9؛ گروه ۲ شامل جدایه B12؛ گروه ۳ شامل جدایه B29؛ گروه ۴ شامل جدایه B27 و گروه ۵ شامل جدایه B14 شد. گروه ۱ از منطقه جویبار و بهنمیر گردآوری شده‌اند که از نظر جغرافیایی نزدیک به هم بودند اما شدت بیماری‌زایی متفاوت داشتند. به طوری که جدایه B40 با شدت بیماری‌زایی بالا، B3 با شدت بیماری‌زایی ضعیف و B9 با شدت بیماری‌زایی متوسط بودند. گروه‌های ۲، ۳، ۴ و ۵ هرکدام یک نماینده داشتند و از نظر جغرافیایی به مناطق مختلف استان مازندران مرتبط بودند. جدایه‌هایی که شدت بیماری‌زایی بالا داشتند اغلب از منطقه بهنمیر و جویبار گردآوری شده‌اند و بیشترین سطح زیر کشت توت‌فرنگی استان نیز در این منطقه است. در نمودار به دست آمده، جدایه‌های این منطقه در گروه‌های مختلف قرار گرفته‌اند. یکی از دلایل می‌تواند این باشد که احتمال داده می‌شود آغازگرهای ITS4 و ITS5 برای شناسایی تنوع بیماری‌زایی جدایه‌های *B. cinerea* کارایی لازم نداشتند. به این مطلب در گزارش اوتخده و ماتور، میرزایی و همکاران نیز اشاره شده است (Utkhede and Mathur 2002, Mirzaei *et al.* 2008).

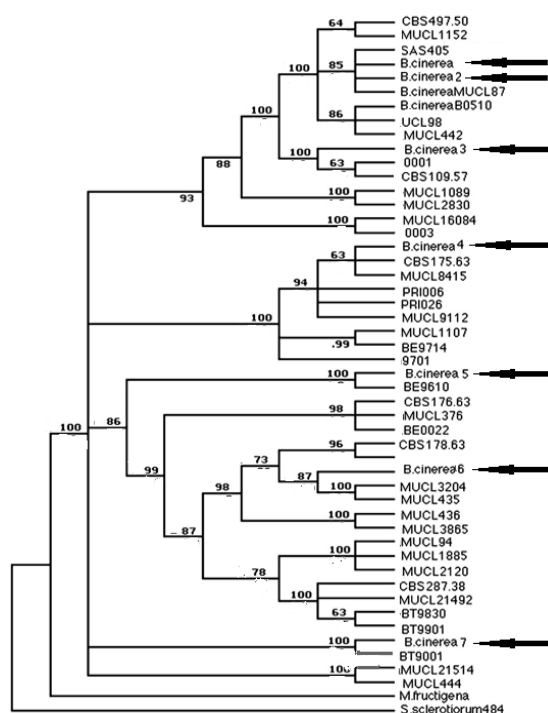


شکل ۶. نقوش الکتروفورزی محصول PCR جدایه‌های *B. cinerea* با استفاده از آغازگر C729 در ژل آگاروز ۱/۵ درصد.

(A) نشانگر وزن مولکولی (SMO311)

Figure 6. Electrophoretic pattern of *B. cinerea* isolates in PCR product with the use of C729 primer in agarose gel 1.5%.

A) Molecular weight marker (SMO311)



شکل ۷. نمودار هفت جداییه نماینده *B. cinerea* عامل پوسیدگی توت‌فرنگی برای گروه‌بندی با استفاده از الگوریتم نزدیک‌ترین همسایه و مقایسه با دیگر توالی‌های مرتبط ثبت‌شده در بانک جهانی ژن (NCBI); شماره مربوط به جدایه‌ها در جدول ۴ نشان داده شده است.

Figure 7. Dendrogram of seven *B. cinerea* representative isolates agent of rot strawberry for grouping using nearest-neighbor algorithm and compared to other related sequences registered in Gene Bank (NCBI); Number of isolates are shown in Table 4

جدول ۴. شماره جدایه‌های نماینده *B. cinerea* در نمودار و نام جدایه‌های مرتبط مورد استفاده

<i>B. cinerea</i>	7	6	5	4	3	2	1
Isolates	B14	B27	B29	B12	B9	B40	B3

مقایسه با غلظت‌های مختلف اسانس رازیانه در مهار قارچ عامل کپک خاکستری میوه توت‌فرنگی در شرایط آزمایشگاه مؤثرتر بود (جدول ۵ و شکل ۸).

غلظت ۵۰۰ $\mu\text{l/l}$ اسانس رازیانه در ۲۴ ساعت اول ۹۹/۸ درصد از رشد قارچ *B. cinerea* جلوگیری کرد. در ساعت ۴۸، ۷۲ و ۹۶ به ترتیب ۸۹، ۷۰/۴ و ۳۹ درصد از رشد قارچ بازدارندگی داشت. این بازدارندگی در غلظت ۷۵۰ $\mu\text{l/l}$ اسانس رازیانه در چهار روز پیاپی به ترتیب ۱۰۰، ۹۴/۴، ۸۹/۷ و ۶۴/۸ شد و در غلظت ۱۰۰۰ $\mu\text{l/l}$ اسانس رازیانه در چهار روز پیاپی به ترتیب ۱۰۰، ۱۰۰ و ۹۴/۷ شده است. این نتیجه نشان می‌دهد غلظت‌های پایین اسانس رازیانه نیز خاصیت قارچ‌کشی روی قارچ *B. cinerea* دارند اما غلظت‌کنندگی مؤثر آن ۱۰۰۰ $\mu\text{l/l}$ اسانس رازیانه است. بین تأثیر غلظت ۱۰۰۰ $\mu\text{l/l}$ اسانس رازیانه با قارچ‌کش ایپرودیون- کاربندازیم تفاوت اندکی وجود دارد. به طوری که در سه

تأثیر کنترلی اسانس رازیانه و قارچ‌کش ایپرودیون- کاربندازیم

تأثیر بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس رازیانه روی هفده جداییه قارچ *B. cinerea* در محیط کشت PDA در جدول ۵ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که هر سه غلظت به کاربرده شده اسانس رازیانه اختلاف معنی‌داری با شاهد آلوده داشتند. با افزایش غلظت اسانس رازیانه، فعالیت ضد قارچی علیه *B. cinerea* افزایش یافت. غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر به مراتب تأثیر بازدارندگی بیشتری نسبت به دو غلظت ۵۰۰ و ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر داشت و رشد بیمارگر را (۹۶ ساعت) تا ۹۴/۷ درصد در مقایسه با شاهد کاهش داد. سطح محیط کشت در تشک شاهد پس از گذشت ۹۶ ساعت توسط جدایه‌های قارچ به طور کامل اشغال شد اما در تیمار با قارچ‌کش ایپرودیون- کاربندازیم هیچ‌گونه رشد مشاهده نشد. قارچ‌کش ایپرودیون- کاربندازیم در

روز پیاپی (۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت) هر دو ترکیب ۱۰۰ درصد از رشد قارچ جلوگیری کرده‌اند. اما در روز چهارم اثر قارچ‌کشی اسانس رازیانه کاهش یافته است (۹۴/۷). درحالی‌که قارچ‌کش ایپرودیون-کاربندازیم در روز چهارم نیز ۱۰۰ درصد از رشد قارچ جلوگیری کرده است (جدول ۵ و شکل ۹).

جدول ۵. درصد بازدارندگی از رشد قارچ *B. cinerea* در سه غلظت اسانس رازیانه و دو غلظت قارچ‌کش ایپرودیون-کاربندازیم
Table 5. Inhibition percent of fungal growth of *B. cinerea* in three concentrations oil of anise and two concentrations of the fungicide Iprodione- Carbendazim

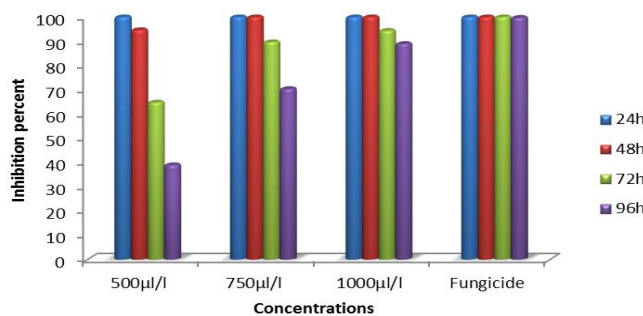
Fungicide*	Anise essence										Isolate
	1000 µl/l					500 µl/l**					
	Time (hour)										
Four time points	96	Three time points	96	72	48	24	96	72	48	24	
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	B3
100	100	100	63	100	100	100	23	59	100	100	B4
100	92	100	100	100	100	100	80	84	100	100	B5
100	100	100	43	81	100	100	30	63	84	100	B8
100	100	100	100	100	100	100	0	35	69	100	B9
100	90	100	53	79	100	100	0	13	50	88	B12
100	78	100	33	79	100	100	0	52	79	100	B14
100	58	100	73	100	100	100	28	73	100	100	B16
100	100	100	50	80	100	100	22	67	83	100	B18
100	92	100	58	88	100	100	0	52	73	100	B20
100	100	100	72	100	100	100	60	100	100	100	B27
100	100	100	100	100	100	100	92	100	100	100	B29
100	100	100	50	82	100	100	0	45	77	100	B32
100	100	100	0	53	72	100	62	92	100	100	B35
100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	B36
100	100	100	77	100	100	100	45	79	100	100	B38
100	100	100	33	83	100	100	23	83	100	100	B42
100	94.7	100	64.8	89.7	94.4	100	39	70.4	89	99.8	Average

* قارچ‌کش ایپرودیون-کاربندازیم تجارتي در غلظت ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر.

** µl/l = میکرولیتر در لیتر.

* Fungicide of commercial Iprodione- Carbendazim in two concentrations of the 1500 and 2000 ppm

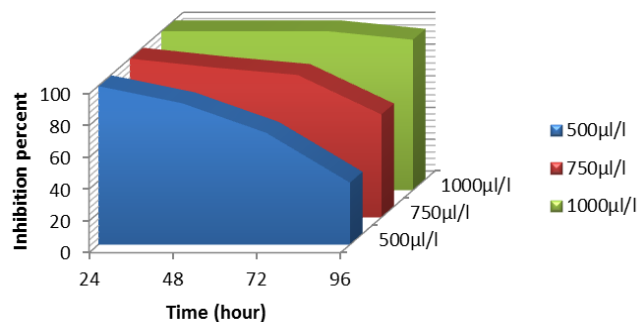
** µl/l = Microliter per liter



شکل ۸. میانگین درصد بازدارندگی سه غلظت اسانس رازیانه و غلظت ۱/۵ در هزار قارچ‌کش ایپرودیون-کاربندازیم روی

جدایه‌های قارچ *B. cinerea*

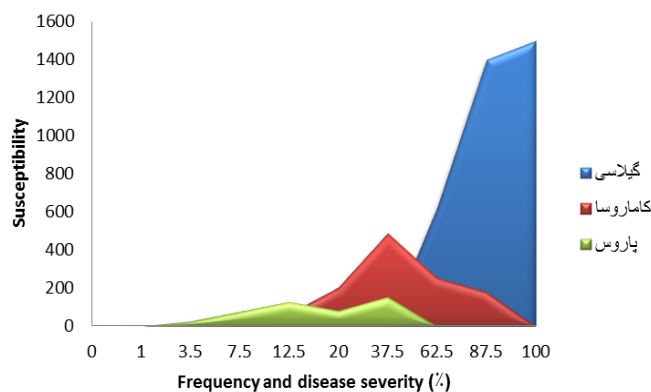
Figure 8. The mean inhibition percent of three concentrations oil of anise and the concentration of 1.5 per thousand of the fungicide Iprodione- Carbendazim on isolates of *B. cinerea*



شکل ۹. میانگین درصد بازدارندگی سه غلظت اسانس رازیانه در چهار زمان مختلف روی جدایه‌های قارچ *B. cinerea*

Figure 9. The mean inhibition percent of three concentrations oil of anise in four different times on isolates of *B. cinerea*

سه روز پس از آلودگی در مقایسه با جدایه‌های با بیماری‌زایی کمتر، در آغاز به سرعت بافت میوه را اشغال کردند و آن را با کپک خاکستری پوشش دادند. پس‌از آن نسبت پیشرفت بیماری برای جدایه‌های با بیماری‌زایی بالا در مقایسه با جدایه‌های با بیماری‌زایی کمتر، کاهش یافت. این پدیده به دلیل سرعت پرگنه (کلنیزه) کردن همه بافت‌های میوه در طول سه روز اول است به طوری که به نظر می‌رسد که اولین سه روز پس از آلودگی می‌تواند یک ملاک مناسب برای مقایسه و رتبه‌بندی جدایه‌های قارچ *B. cinerea* باشد. در گزارش زاده‌دباغ و همکاران نیز به این پدیده اشاره شده است (Zadehdabagh *et al.* 2010). با توجه به داده‌های جدول ۳ ثابت می‌شود که بیشترین بیماری‌زایی و آلودگی شدید به ترتیب روی رقم گیلاسی، کاماروسا و پاروس ایجاد شده است (شکل ۱۰).



شکل ۱۰. واکنش سه رقم توت‌فرنگي تجارتي در برابر جدایه‌های *B. cinerea* گردآوری شده از استان مازندران (داده‌ها از جدول ۳)
Figure 10. Reaction of three varieties of commercial strawberries against isolates of *B. cinerea* collected from Mazandaran province (data from Table 3)

ظاهر شدند. با توجه به این مطلب در جنس بوتریتیس در جدایه‌های با ساختار ظاهری همانند و یکسان می‌توان گفت در شرایط رشدی مشخص تنوع وجود دارد. شناسایی این قارچ با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناختی به تنهایی قابل‌اطمینان نیست، زیرا با شرایط محیطی تحت تأثیر قرار می‌گیرند. شناسایی ریخت‌شناختی زمان‌بر بوده و می‌تواند در شرایطی تغییر کند. به نظر می‌رسد آغازگرهای مولکولی در تشخیص قارچ *B. cinerea* سودمندتر هستند بنابراین استفاده از روش‌های جدید شناسایی به‌ویژه نشانگرهای مولکولی به‌عنوان یک روش

بحث

آسیب جهانی بیماری‌های پس از برداشت در اغلب محصولات بین ۱۰ تا ۳۰ درصد برآورد می‌شود. در بین عامل‌های بیمارگر گیاهی، ۲۵ گونه قارچ و باکتری عامل اصلی فساد پس از برداشت محصولات گیاهی هستند که در بین آن‌ها جنس بوتریتیس به‌ویژه گونه *B. cinerea* بیمارگر اصلی میوه‌ها، سبزی‌ها و گیاهان زینتی گلخانه‌ای است (Kulakiotu *et al.* 2004). تلاش فراوانی به‌منظور حفاظت محصولات کشاورزی در برابر قارچ بوتریتیس انجام گرفته است. با این حال هنوز یکی از بیمارگرهای اصلی زینبار روی محصولات کشاورزی به‌ویژه پس از برداشت است (Elad *et al.* 2007). در این پژوهش مشخص شد جدایه‌های این قارچ در استان مازندران از نظر شدت بیماری‌زایی اختلاف معنی‌داری با هم داشتند. جدایه‌های با شدت بیماری‌زایی بالا در اولین

نظر به اینکه هم‌اکنون رقم کاماروسا به‌عنوان یک رقم تجاری در بیشتر اراضی استان مازندران کشت می‌شود اما مقاوم‌ترین رقم توت‌فرنگي در برابر جدایه‌های قارچ *B. cinerea* رقم پاروس بوده بنابراین با تحقیق روی خصوصیات باغبانی و میزان تولید آن در مازندران و در صورت سازگاری با منطقه، رقم پاروس می‌تواند به‌عنوان رقم مناسب به جای رقم کاماروسا پیشنهاد شود. در آزمایش شناسایی ریخت‌شناختی جدایه‌ها مشخص شد که جدایه‌های قارچ *B. cinerea* بسیار متنوع بودند و اکثر جدایه در کشت‌های بعدی، به شکل متفاوت روی محیط

داشتند و در کاهش بیماری پوسیدگی خاکستری روی میوه‌های سیب مؤثرتر بودند (Peighami-Ashnaei et al. 2007). آزمایش‌های مشابه با استفاده از اسانس گیاهان درمنه شرقی، درمنه دشتی، درمنه خراسانی و درمنه کوهی انجام شده و نتیجه نشان داده است که این اسانس‌ها از رشد برخی قارچ‌های خاکزی در شرایط آزمایشگاه جلوگیری می‌کنند (Farzaneh et al. 2006). نتایج این پژوهش نشان داد که با بالابردن غلظت اسانس رازیانه، فعالیت ضد قارچی آن علیه *B. cinerea* افزایش یافت. غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر به مراتب اثر بازدارندگی بیشتری نسبت به دو غلظت ۵۰۰ و ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر داشته و میزان رشد قارچ را تا ۹۴/۷ درصد در مقایسه با شاهد در روز چهارم کاهش داد. سم ایپرودیون-کاربندازیم در مهار قارچ عامل بیماری کپک خاکستری میوه توت‌فرنگی نسبت به اسانس رازیانه در شرایط آزمایشگاه مؤثرتر بوده است. با توجه به فرهنگ تازه‌خوری میوه توت‌فرنگی، استفاده از اسانس رازیانه می‌تواند به عنوان یک روش مؤثر و قابل اطمینان در حفظ میوه‌های توت‌فرنگی در برابر قارچ *B. cinerea* به کار گرفته شود. برای نیل به این هدف، شناسایی ترکیبات فعال و مؤثر موجود در اسانس رازیانه که بتوانند بیشترین تأثیر را روی قارچ *B. cinerea* داشته و قابلیت تولید تجاری داشته باشند، پیشنهاد می‌شود.

سپاسگزاری

از حمایت‌های دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری که در تصویب، تأمین اعتبار و اجرای این پروژه همکاری کرده‌اند و از تلاش آقایان دکتر علی‌اکبر رضایی و مهندس نجفی از اعضای هیئت علمی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان مازندران، تشکر و قدردانی می‌گردد.

مطمئن پیشنهاد شده است (Staats et al. 2005). در این پژوهش از آغازگر اختصاصی C729 و آغازگرهای ITS5 و ITS4 برای تعیین تنوع ژنتیکی و همچنین ساختار جمعیت *B. cinerea* در استان مازندران استفاده شد. با توجه به نمودار ترسیمی از تجزیه و تحلیل توالی جدایه‌های *B. cinerea* هفت جدایه نماینده مورد آزمایش در پنج گروه متفاوت قرار گرفتند. این مطلب نشان می‌دهد که در بین جدایه‌های قارچ عامل بیماری کپک خاکستری میوه توت‌فرنگی در استان مازندران تنوع بالای ژنتیکی وجود دارد. یکی از دلایل آن می‌تواند واکنش قارچ در برابر کاربرد انواع قارچ‌کش‌ها طی سالیان گذشته باشد. وجود تنوع در جدایه‌های *B. cinerea* در خصوصیات مانند بیماری‌زایی، الگوی رشدی، تولید آنزیم در شرایط آزمایشگاهی و غیرآزمایشگاهی گزارش شده است (Elad et al. 2007).

استفاده از اسانس‌های گیاهی در کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه و سبزی به‌عنوان روشی زیستی در سال‌های اخیر مطرح شده است. این روش به عنوان روشی مؤثر و درعین حال ایمن، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. استفاده از اسانس‌های گیاهی می‌تواند ضمن تأمین سلامت و ایمنی محصول باعث کاهش ضایعات میوه شود. حساسیت گونه‌های قارچی بسته به نوع اسانس و غلظت‌های مختلف آن متفاوت است. در این پژوهش ثابت شد که اسانس رازیانه و غلظت‌های مختلف آن در جلوگیری از رشد میسلیم قارچ *B. cinerea* اثر دارند (شکل ۹). پیغامی و همکاران از اسانس گیاهان میخک هندی، رازیانه، زیره سبز و نعناع فلفلی علیه کپک خاکستری سیب استفاده کردند و نتیجه گرفتند که اسانس رازیانه و میخک هندی نسبت به دیگر اسانس‌ها روی قارچ *B. cinerea* در شرایط آزمایشگاه خاصیت ضد قارچی قابل قبول‌تری

REFERENCES

- Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18: 265-267.
- Anthony S, Abeywickrama K, Wilson WS (2003) The effect of spraying essential oils of *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon flexuosus* and *Ocimum basilicum* on post-harvest diseases and storage life of *Embul banana*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78: 780-785.
- Barnett HL, Hunter BB (1998) *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4th ed., APS Press, USA.
- Beever RE, Weeds PL (2004) Taxonomy and genetic variation of Botrytis and Botryotinia. Pp. 29-52 In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P and Delen N (eds) *Botrytis: Biology, pathology and controls*. Kluwer Academic Publisher, Netherland.

- Bouchra C, Achouri M, Idrissi-Hassani LM, Hmamuchi M** (2003) Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven *Moroccan labiatea* against *Botrytis cinerea* Per: Fr. Journal of Ethnopharmacology 89: 165-169.
- Capdeville GD, Maffia LA, Finger FL, Batista UG** (2004) Pre-harvest calcium sulfate applications affect vase life and severity of gray mold in cut roses. Scientia Horticulturae 103: 329-338.
- Chebli B, Hmamuchi M, Achouri M, Idrissi-Hassani LM** (2004) Composition and in vitro fungitoxic activity of 19 essential oils against two post-harvest pathogens. Journal of Essential Oil Research 16: 507-511.
- Doyle JJ, Doyle JL** (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13-15.
- Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N** (2007) Botrytis: Biology, pathology and control. Published by Springer, Netherlands.
- Ellis MB** (1971) Dematiaceus, Hyphomycetes. Common Wealth Mycological Institute 178-184.
- Faretra F, Antonacci E** (1987) Production of apothecia of *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetz. under controlled environmental conditions. Phytopathologia Mediterranea 26: 29-35.
- Farzaneh M, Ahmadzadeh M, Hadian J, Sharifi-Tehrani A** (2006) Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of Artemisia on some soil-borne phytopathogens. Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences 71(3b): 1327-1333.
- Grindle M** (1979) Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. Journal of General Microbiology 111: 109-120.
- Hancock JF** (1999) Strawberries (Crop production science in horticulture. Cab international, Wallingford, UK.
- Hennebert GL** (1973) Botrytis and Botrytis-like genera. Persoonia 7: 183-204.
- Holst-Jensen A, Vaage M, Schumacher T** (1998) An approximation to the phylogeny of *Sclerotinia* and related genera. Nordic Journal of Botany 18: 705-719.
- 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*. Phtopathology 101(7): 859-869.
- Jarvis WR** (1977) Botryotinia and botrytis species: Taxonomy, physiology and pathogenicity. Research Branch, Canada Department of Agriculture, Ottawa, Canada.
- Khazaeli P, Zamanizadeh H, Morid B, Bayat H** (2010) Morphological and molecular identification of *Botrytis cinerea* causal agent of gray mold in rose greenhouse in central region of Iran. International Journal of Agricultural Science and Research 1: 19-24.
- Kulakiotu EK, Thanassoulopoulos CC, Sfakiotakis EM** (2004) Biological control of *Botrytis cinerea* by volatiles of "Isabella" grapes. Phytopathology 94: 924-931.
- Milena C, Silva E** (2005) Differences in the initial events of infection of *Botrytis cinerea* strains isolated from tomato and grape. Mycologia 97(2): 485-492.
- Mirzaei S, Mohammadi Goltapeh E, Shams-bakhsh M** (2008) Identification of *Botrytis* spp. on plants grown in Iran. Phytopathology 156: 21-28.
- Ozan M** (2003) Antifungal effects of some Turkish spice essential oils on *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea* growth. Agrimedia GmbH 8: 173-175.
- Peighami-Ashnaei S, Farzaneh M, Hadian J, Sharifi-Tehrani A, Ghorbanpoor M** (2007) Evaluation of antifungal activity of some plant essential oils against the gray mold of apple caused by *Botrytis cinerea*. Agricultural Research: Water, Soil and Plant in Agricultural 7(3): 1-10. (in Persian)
- Plaza P, Torres R, Usall G, Lamarca N, Vinasa I** (2004) Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 79: 935-940.
- Rakhshani-Zabol E, Taheri A** (2006) Principles of agricultural toxicology (Vol. II) fungicides, bactericides and nematocides biological Publishers of Farhng Jame, Iran. (in Persian)
- Rigotti S, Gindro K, Richter H, Viret O** (2002) Charactrization of molecular marker for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) using PCR. FEMS Microbiology Letters 209: 169-174.
- Saghi-Younesi B, Solimani MJ, Zafari D, Bahramnejad B** (2014) Identification and study of genetic diversity of *Botrytis cinerea* isolates caused Strawberry grey mold in Kurdistan province. Biothechnology in Agricultural 13(2): 1-10. (In Persian)
- Staats M, Baarlen PV, Van Kan JAL** (2005) Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus Botrytis and the evolution of host specificity. Molecular Biology and Evolution 22: 333-346.
- Utkhede RS, Mathur S** (2002) Biological control of stem canker of greenhouse tomatoes caused by *Botrytis cinerea*. Canadian Journal of Microbiology 48: 550-554.
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J** (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (ed.), PCR Protocols: A guide to Methods and Applications, Academic Press: San Diego, U.S.A. pp. 315-322.
- Zadehdabagh Gh, Rokni N, Kiani S, Mohammadi Goltapeh E, Danesh RY** (2010) Evaluation of *Botrytis cinerea* isolates for virulence on rose cut flowers in greenhouse condition in Iran. Journal of Agricultural Technology 6(3): 525-532.

Investigation of Strawberry cultivars resistance against *Botrytis cinerea* and control effect of Anise essence and Iprodione-Carbendazim on it

Seyed Jafar Nasiri Taleshi¹, Safarali Mahdian^{2*}, Mohammadali Tajickghanbari³
and Seyedamin Alian⁴

1. Graduate Student of Plant Pathology, Assistant Professor and Associate Professor,
Department of Plant Protection, University of Agricultural and Natural Resources Sari, Iran

4. Director, Central Plant Protection Clinic, Babolsar, Iran

(Received: Nov. 16, 2015 - Accepted: Feb. 13, 2016)

ABSTRACT

The *Botrytis cinerea* is one of the most important agents of Strawberry fruit rot. In order to identify the pathogenicity potential of the isolates on fruits and the antifungal effect of Anise essence on this fungus, forty one isolates of *B. cinerea* was collected from different areas of Mazandaran province on strawberry showing symptoms of gray rot on fruits. Following the purification of the fungus, pathogenicity test was done on Comarosa, Parus and Gilasi varieties of strawberries. Morphological identification of isolates was done in regard to their vegetative characteristics. Molecular identification carried out using specific primer C729 and common primers ITS4 and ITS5. Inhibition rate of fungal growth was recorded by Anise oil and Iprodione-Carbendazim fungicide. The results based on morphological characteristics showed that all isolates belong to *Botrytis cinerea*. Identification of isolates using specific primer C729 showed that all of them had band of 700 bp. Based on disease severity on three strawberry cultivars; isolates were graded into seven groups. The ITS region of ribosomal DNA of each group was amplified using ITS4 and ITS5 primers. After sequencing and alignment, the obtained sequences were compared with the existing sequences in Gene Bank. The results showed there is high genetic diversity among the isolates, so that and they classified into five groups with 80% similarity. The result of in vitro evaluation of fungicide and Anise essence effect, showed that with increasing of Anise oil concentration, antifungal activity is also increasing against *B. cinerea*. Iprodione-Carbendazim fungicide could inhibit the growth of isolates on a culture medium.

Keywords: Anise oil, gray rot, Iprodione-Carbendazim, strawberry.