



Improving the shelf life of encapsulated *Trichoderma harzianum* as a biocontrol approach against the soil-borne fungus *Sclerotinia sclerotiorum* under *in vitro* and greenhouse conditions

Abdolhossein Taheri^{1✉}, Elahe Lotfalinezhad², Seyed Javad Sanei³, Zahra Shahrabadi⁴

1. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: a.taheri@gau.ac.ir
2. Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: elabelotfalinezhad@yahoo.com
3. Department of Plant Protection, Faculty of Plant Production, Gorgan University of Agricultural sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. E-mail: sanei@gau.ac.ir
4. Research Department, Danazist Lotus Company, Gorgan, Iran. E-mail: zahrashahrabadi2@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	In recent years, increasing concerns about the environmental and health effects of chemical pesticides have highlighted the urgent need for sustainable plant disease management. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of a capsule formulation containing <i>Trichoderma harzianum</i> on the suppression of <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> in tomato plants. Capsules were prepared using ionic gelation and sodium alginate, and their physical characteristics, loading and release rate of spores, swelling characteristics, stability under temperature and UV exposure, and biodegradability were investigated. The results showed that the encapsulated formulation significantly increased the shelf life and survivability of <i>T. harzianum</i> spores and maintained their biological activity compared to the non-encapsulated form. The survival percentage of non-encapsulated <i>T. harzianum</i> spores sharply decreased after 90 days at temperatures of 25 and 35 °C, whereas encapsulated spores under the same conditions showed only 42% and 46% reductions in viability. In the greenhouse experiment, disease incidence was 4.44% in plants treated with encapsulated <i>T. harzianum</i> and 73.33% in the control. The encapsulated formulation was more effective in reducing disease than the non-encapsulated form. The levels of defense enzymes in plants treated with encapsulated <i>T. harzianum</i> increased by 10.32–14.25% and 31.66–11.27% compared with non-encapsulated <i>T. harzianum</i> and the control, respectively. These findings highlight the effective and sustainable role of encapsulated formulation in improving the performance of biocontrol agents, demonstrating the high potential of this technology to reduce <i>S. sclerotiorum</i>-induced damage and promote plant health in agricultural systems.
Article history: Received: 21 March 2025 Revised: 24 May 2025 Accepted: 28 May 2025 Published online: Spring and Summer 2025	
Keywords: <i>Trichoderma harzianum</i> , Encapsulation, Biocontrol, Greenhouse, shelf life.	

Cite this article: Taheri, A., Lotfalinezhad, E., Sanei, S. J. & Shahrabadi, Z. (2025). Improving the shelf life of encapsulated *Trichoderma harzianum* as a biocontrol approach against the soil-borne fungus *Sclerotinia sclerotiorum* under *in vitro* and greenhouse conditions. *Iranian Journal of Plant Protection Science*, 56 (1), 179-200. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.409909.1007107>



© The Author(s).

Publisher: The University of Tehran Press.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.409909.1007107>

Extended Abstract

Introduction

In recent decades, advances in crop productivity have largely relied on intensive farming and heavy use of chemical pesticides. However, plant diseases still cause 20–40% yield losses annually, with soilborne fungi representing the most destructive group. *Sclerotinia sclerotiorum* is one of the most devastating plant pathogens, infecting more than 500 plant species and persisting in the soil for years through its resistant sclerotia. While fungicides remain widely used, their long-term effectiveness is declining due to pathogen resistance and environmental hazards. As a sustainable alternative, biological control agents—particularly *Trichoderma* species—have shown great potential through mechanisms such as mycoparasitism, antibiosis,

and induction of plant resistance. Nevertheless, their field performance is limited by environmental stresses. To overcome these constraints, encapsulation technology, especially via ionic gelation using biocompatible polymers like sodium alginate, offers an efficient solution by protecting microbial viability, enabling gradual release, enhancing colonization, prolonging shelf life, and reducing application frequency in an environmentally friendly manner.

Materials and Methods

Trichoderma harzianum Ah90 and *Sclerotinia sclerotiorum* were obtained from the Gorgan University fungal collection. Spore suspension (1.7×10^7 cfu/ml) was prepared, and encapsulation was performed via ionic gelation using 2% (w/v) sodium alginate and 0.1 M CaCl_2 . Capsule size, swelling rate, capsulation efficiency, and spore release kinetics were evaluated. Viability of encapsulated and free spores was tested under different temperatures (5, 25 and 35 °C) and under UV exposure. Capsule biodegradability was measured by weight-loss assay. *In vitro* inhibition of *S. sclerotiorum* was assessed using dual culture, volatile, and non-volatile compound tests. Greenhouse experiments on tomato (cv. Super Chief) were conducted using encapsulated and non-encapsulated *T. harzianum* in pathogen-infested soil. Disease incidence, plant growth, and polyphenol oxidase activity were measured. Data were analyzed in a factorial CRD with four replications using R. 4.5.1 and Duncan's test ($p \leq 0.05$).

Results

Encapsulated *T. harzianum*, prepared by ionic gelation method, exhibited approximately spherical. Wet capsules diameters of about 2600 μm and dry diameters of about 1000 μm . Encapsulation efficiency was 99%. Encapsulation also enhanced the survival and stability of *T. harzianum* at 25°C and 35°C compared to the non-encapsulated form with 5°C being the optimal storage condition for long term. UV exposure for 24 h caused >90% reduction in free spores but far less in dry capsules. No protective difference was observed among dry and wet capsules against temperature changes. Greenhouse experiments confirmed that the encapsulated *T. harzianum* formulation significantly reduced disease incidence in comparison to non-encapsulated *T. harzianum* and sodium alginate capsules. The findings substantiate the positive and effective role of encapsulated *T. harzianum* towards seedling mortality reduction, validating its efficacy as an effective alternative to enhance reduction of chemical pesticide dependency.

Conclusion

The findings of this study indicate that encapsulation technology markedly enhances the stability and viability of *T. harzianum* compared to its non-encapsulated form and can also strengthen its inhibitory potential. Accordingly, the obtained data provide valuable insights into the practical application of encapsulated biocontrol formulations and highlight the promising potential of encapsulated *T. harzianum* as an effective alternative for reducing dependency on chemical pesticides.

Author Contributions

All authors contributed equally to the conceptualization of the article and writing of the original and subsequent drafts.

Data Availability Statement

The datasets generated or analyzed during the current study are available on request from the authors.

Ethical considerations

All research followed ethical guidelines to minimize harm to insects and avoid disruption of natural habitats. Sampling was limited to the minimum necessary, and no endangered or protected species were collected. All activities complied with relevant regulations, and data were recorded and reported with integrity.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper.



نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، دوره ۵۶، شماره ۱

انتشارات دانشگاه تهران

شاپا الکترونیکی: ۷۸۶۸-۲۴۲۳

Homepage: <http://ijpps.ut.ac.ir/>

افزایش ماندگاری *Trichoderma harzianum* در حالت کپسوله به عنوان یک راهبرد مهار زیستی علیه قارچ خاکزی *Sclerotinia sclerotiorum* در شرایط درون شیشه‌ای و گلخانه

عبدالحسین طاهری^۱ | الهه لطفعلی نژاد^۲ | سیدجواد صانعی^۳ | زهرا شهرآبادی^۴

۱. نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: a.taheri@gau.ac.ir
۲. گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: elahelotfalinezhad@yahoo.com
۳. گروه گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران. رایانامه: sanei@gau.ac.ir
۴. بخش تحقیقات شرکت دانازیت لوتوس، گرگان، ایران. رایانامه: zahrashahrabadi2@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله پژوهشی تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۱/۰۱ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۰۳/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۳/۰۷ تاریخ انتشار: بهار و تابستان ۱۴۰۴ کلیدواژه‌ها: <i>Trichoderma harzianum</i> فرمولاسیون کپسول، کنترل زیستی، گلخانه، ماندگاری <i>solani</i>	در سال‌های اخیر، افزایش نگرانی‌ها نسبت به اثرات زیست‌محیطی و بهداشتی سموم شیمیایی، بر ضرورت فوری مدیریت پایدار بیماری‌های گیاهی تاکید کرده است. لذا این پژوهش با هدف ارزیابی تاثیر فرمولاسیون کپسول حاوی <i>Trichoderma harzianum</i> بر مهار <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> در گیاه گوجه‌فرنگی انجام شد. کپسول‌ها با استفاده از روش ژلاسیون یونی و آلزینات سدیم تهیه گردید و ویژگی‌های فیزیکی، میزان بارگذاری و آزادسازی اسپور، نرخ تورم، پایداری در برابر دما و اشعه فرابنفش و نیز زیست‌تخریب‌پذیری کپسول‌ها مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد فرمولاسیون کپسوله به طور مؤثری موجب افزایش ماندگاری و زنده‌مانی اسپورهای <i>T. harzianum</i> و حفظ فعالیت زیستی آن‌ها در مقایسه با فرم غیر کپسوله شدند. درصد ماندگاری اسپورهای <i>T. harzianum</i> غیر کپسوله پس از ۹۰ روز در دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه به شدت کاهش یافت. در حالی که اسپورهای کپسوله‌شده در همان شرایط ۴۲ و ۴۶ درصد کاهش بقا نشان دادند. در بررسی گلخانه‌ای نیز درصد بیماری در گیاهان تیمار شده با <i>T. harzianum</i> کپسوله‌شده ۴/۴۴ درصد و در شاهد ۷۳/۳۳ درصد بود. فرمولاسیون کپسوله نسبت به حالت غیر کپسوله اثربخشی بیشتری در کاهش بیماری داشت. سطح آنزیم-های دفاعی در گیاهان تیمار شده با <i>T. harzianum</i> کپسوله نسبت به <i>T. harzianum</i> غیر کپسوله و شاهد به ترتیب ۱۰/۳۲-۱۴/۲۵ و ۳۱/۶۶-۱۱/۲۷ درصد افزایش داشت. یافته‌های این پژوهش ضمن تاکید بر نقش مؤثر و پایدار فرمولاسیون کپسوله در بهبود عملکرد عوامل زیستی، نشان‌دهنده قابلیت بالای این فناوری در کاهش خسارت ناشی از <i>S. sclerotiorum</i> و ارتقای سلامت گیاه در سیستم‌های کشاورزی می‌باشد.

استناد: طاهری، عبدالحسین؛ لطفعلی نژاد، الهه؛ صانعی، سیدجواد و شهرآبادی، زهرا (۱۴۰۴). افزایش ماندگاری *Trichoderma harzianum* در حالت کپسوله به عنوان یک راهبرد مهار زیستی علیه قارچ خاکزی *Sclerotinia sclerotiorum* در شرایط درون شیشه‌ای و گلخانه. نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، ۵۶ (۱)، ۲۰۰-۱۷۹. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.409909.1007107>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2026.409909.1007107>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

در دهه‌های اخیر، افزایش قابل توجه عملکرد محصولات کشاورزی عمدتاً با تکیه بر روش‌های کشاورزی فشرده و مصرف گسترده سموم شیمیایی حاصل شده است که نقش مهمی در تامین امنیت غذایی جهانی دارد (Sharma et al., 2024). با وجود این پیشرفت‌ها، بیماری‌های گیاهی همچنان به عنوان یکی از مهم‌ترین عوامل محدودکننده تولید، هر ساله موجب کاهش ۲۰ تا ۴۰ درصدی محصولات غذایی در سراسر جهان می‌شوند، زبان‌هایی که رقم آن‌ها به میلیارد‌ها دلار می‌رسد و تهدیدی جدی برای امنیت غذایی جهانی به شمار می‌آید (Mazzola & Freilich, 2017; Abbas et al., 2024). در میان بیمارگرهای گیاهی، قارچ‌های خاک‌زی بزرگ‌ترین و مخرب‌ترین گروه را تشکیل می‌دهند که در محصولات با اهمیت اقتصادی بالا سالانه تا یک سوم محصولات کشاورزی را از بین می‌برند (Almeida et al., 2019; Jain et al., 2019; Khalil et al., 2019). قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary یکی از مخرب‌ترین بیمارگرهای گیاهی محسوب می‌شود که سالانه خسارات اقتصادی زیادی به بیش از ۵۰۰ گونه‌ی گیاهی در سراسر جهان وارد می‌کند (Saharan & Mehta et al., 2008). بیمارگر منجر به بروز بیماری‌های مختلفی مانند پوسیدگی سفید، مرگ گیاهچه، پوسیدگی طوقه و پوسیدگی ریشه در محصولات مهم اقتصادی نظیر پنبه، سویا، آفتابگردان، سبزیجات و صیفی‌جات می‌شود. این قارچ به واسطه‌ی تولید ساختارهای مقاوم به نام اسکلروت قابلیت زنده‌ماندن طولانی‌مدت در خاک را دارد (O'Sullivan et al., 2021; Hossain et al., 2023). این راستا، مدیریت موثر و پایدار این بیمارگر برای حفظ امنیت غذایی، پایداری محیط‌زیست و ارتقای بهره‌وری اقتصادی ضروری به نظر می‌رسد. اگرچه کاربرد سموم شیمیایی به دلیل هزینه مناسب، دسترسی آسان و اثرگذاری سریع همچنان راهکار غالب در کنترل این بیمارگرها محسوب می‌شود، اما مشکلات عمده‌ای همچون گسترش مقاومت بیمارگرها نسبت به گروه‌های قارچ‌کش‌های موجود، تاثیر منفی بر میکروارگانیسم‌های مفید خاک، اختلال در تعادل جمعیتی بندپایان مفید و انباشت ترکیبات سمی که سلامت انسان و پایداری اکوسیستم را تهدید می‌کنند، استفاده از این ترکیبات را به موضوعی چالش‌برانگیز در کشاورزی مدرن تبدیل کرده است (Filizola et al., 2019; Atlagić et al., 2025). علاوه بر این، انتظار می‌رود که تغییرات اقلیمی از جمله افزایش دما، وقوع پدیده‌های شدید جوی و خشکسالی‌های طولانی وضعیت را پیچیده‌تر کرده و در سال‌های آینده سبب کاهش معنادار تولید محصولات کشاورزی شود (Manoharachary et al., 2020).

فرآورده‌های مفید مهارگر قارچی و باکتریایی از روش‌های قابل توسعه و موثر برای مدیریت بیمارگرهای خاک‌زی می‌باشند (Ab Rahman et al., 2018; Khedher et al., 2021). به کارگیری این عوامل ضمن کاهش خسارت ناشی از بیمارگرها، به حفظ و بازسازی تعادل اکولوژیک در اکوسیستم‌های کشاورزی کمک زیادی کرده و در نتیجه، امکان دستیابی به امنیت غذایی پایدار را فراهم می‌کند (Hermosa et al., 2012). گونه‌های مختلف قارچ *Trichoderma* (به ویژه *Trichoderma harzianum*) از مهم‌ترین عوامل مهار زیستی به شمار می‌روند و حدود ۵۰ تا ۶۰ درصد از قارچ‌کش‌های زیستی تجاری در سطح جهان را به خود اختصاص داده‌اند. تنوع اکوفیزیولوژیک و گستره گونه‌ای این قارچ‌ها، با مهار مستقیم و غیرمستقیم بیماری‌ها، تحریک رشد گیاه و بهبود حاصلخیزی خاک همراه می‌باشد. سازوکارهای مهارکنندگی *Trichoderma* بسیار متنوع است و شامل پارازیتسم، آنتی‌بیوز، رقابت، افزایش دسترسی گیاه به عناصر، تحریک رشد گیاه، القای مقاومت در گیاه و غیرفعال کردن آنزیم‌های عوامل بیمارگر می‌باشد (Atlagić et al., 2025). اگرچه حساسیت بالا نسبت به فاکتورهای مختلف محیطی و خاکی نظیر دما، میزان رطوبت، pH، مواد شیمیایی، تابش اشعه فرابنفش، حضور انواع میکروارگانیسم‌های رقیب و سایر تنش‌های محیطی، استقرار موثر این عوامل را در اطراف ریشه گیاه در شرایط واقعی مزرعه بسیار محدود می‌کند (Vessey, 2003; Calabi-Floody et al., 2018). لذا توسعه فرمولاسیون‌های مناسب به منظور بهره‌برداری بهینه از مزایای ارزشمند عوامل مهار زیستی و ارتقاء کارایی آن‌ها، به‌ویژه در شرایط مزرعه، نقش کلیدی دارد.

از فناوری‌های جدید به کار رفته در دنیا برای تولید فرمولاسیون‌های زیستی می‌توان به کاربرد فناوری میکرو برای تولید فرمولاسیون میکروکپسول (فرمولاسیون دربردارنده اسپورهای قارچ یا باکتری مهارگر در اندازه میکرو با پوشش شبکه‌ای ذرات

میکرو) اشاره کرد (Jing et al., 2011; Lopes et al., 2023; Vindas-Reyes et al., 2024). در این شیوه، مواد پلیمری بخش فعال عامل زیستی را احاطه کرده و با این کار، اثر عوامل محیطی بر عملکرد عامل زیستی کاهش یافته و بقای میکروارگانیسم همراه با حفظ فعالیت متابولیکی آن، افزایش می‌یابد (Locatelli et al., 2018; Balla et al., 2022). افزون بر این، ویژگی‌های ساختاری مواد دیواره کپسول امکان رهایش تدریجی سلول‌های میکروبی را از طریق رشد یا تجزیه آرام دیواره مهیا می‌سازد، فرآیندی که به بهبود استقرار در خاک، ناحیه ریشه یا برگ‌های گیاه و افزایش پایداری پس از کاربرد کمک خواهد کرد. پیامد این فرآیند، کاهش مقدار و دفعات لازم برای مصرف عامل کنترل زیستی است (Vemmer & Patel, 2013). همچنین استفاده از پلیمرهای زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر به عنوان حامل یا دیواره کپسول، از دیگر مزایای مهم این نوع فرمولاسیون‌ها محسوب می‌شود (Poletto et al., 2008; Huang et al., 2009; Vindas-Reyes et al., 2024).

در فرآیند کپسوله کردن عوامل مهار زیستی، روش ژلاسیون یونی به دلیل سهولت اجرا، عدم نیاز به حلال‌های آلی و امکان کنترل دقیق فرآیند، یکی از رایج‌ترین و پرکاربردترین روش‌ها به شمار می‌آید (Maestrelli et al., 2008; Balla et al., 2022). در این روش، میکروارگانیسم‌ها با محلول‌های پلیمری زیست‌تخریب‌پذیر مانند آلژینات سدیم ترکیب شده و در اثر تعامل با محلول‌های کاتیونی، کپسول‌های کروی و یکنواختی تشکیل می‌شود (Vemmer & Patel, 2013; Leong et al., 2016). ابعاد کپسول‌های تولیدشده تحت تاثیر پارامترهای فرآیند قرار دارد و این فناوری امکان تولید در مقیاس صنعتی با کم‌ترین آسیب به سلول‌های میکروبی را فراهم می‌کند (Rodrigues et al., 2012). ماندگاری فرمولاسیون کپسول تا حد زیادی به نوع حامل یا ماده دیواره بستگی دارد، در این میان، آلژینات سدیم به دلیل مزایایی از جمله سازگاری زیستی، غیرسمی بودن، قیمت مناسب و ظرفیت مطلوب برای آزادسازی کنترل‌شده سلول‌های فعال، رایج‌ترین پلیمر مصرفی در کپسوله‌سازی عوامل کنترل زیستی محسوب می‌شود (Rodrigues et al., 2020; Martínez-Cano et al., 2022).

با وجود مطالعات انجام‌شده در زمینه کپسوله کردن عوامل مهار زیستی، پژوهش‌های اندکی در خصوص ارزیابی جامع عملکرد این فرمولاسیون‌ها در برابر عوامل تنش‌زای متعدد محیطی و کارایی آن‌ها در مهار بیمارگرهای گیاهی وجود دارد. لذا این پژوهش با هدف ارزیابی یکپارچه از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی کپسول‌های *T. harzianum*، بررسی همزمان پایداری آن‌ها تحت شرایط دمایی، تابش UV، محیط خاک و مقایسه مستقیم اثربخشی فرم کپسوله و غیرکپسوله در مهار *S. sclerotiorum* در شرایط گلخانه‌ای طراحی و اجرا شد. این رویکرد جامع اطلاعات کاربردی لازم برای توسعه تجاری این فناوری را فراهم می‌کند.

پیشینه پژوهش

نتایج تحقیقات پیشین انجام یافته توسط Lotfalinezhad et al. (2023, 2024) در زمینه تولید کپسول‌های دربردارنده *Bacillus subtilis* و *T. harzianum* کارایی فرمولاسیون‌های کپسوله را در کنترل برخی از بیمارگرهای خاک‌زی روی گیاه گوجه‌فرنگی در شرایط گلخانه‌ای را نشان داد. به طوری که این نوع فرمولاسیون نسبت به شکل سوسپانسیون به صورت معنی‌داری در کاهش بیماری مرگ گیاهچه موثر بوده‌اند. طبق بررسی Muñoz-Celaya et al. (2012) میزان بقای کنیدی‌های میکروکپسوله *Trichoderma* پس از ۴ هفته نگهداری در دمای ۲۹ درجه سلسیوس حدود ۶۰ درصد برآورد گردید در حالی که نرخ ماندگاری کنیدی‌های غیرمیکروکپسوله در این مدت نزدیک به صفر درصد بود. بررسی Locatelli et al. (2018) نشان داد، کپسوله‌کردن *Trichoderma* sp. به روش ژلاسیون یونی با استفاده از آلژینات سدیم منجر به بقا در طول مراحل تولید و نگهداری می‌شود به طوری که میزان سلول‌های زنده بعد از ۱۴ ماه نگهداری در دمای ۲۸ درجه سلسیوس، بیش از 10^6 CFU/g بود. نتایج Mancera López et al. (2019) نشان داد، کپسوله‌کردن *T. harzianum* با استفاده از آلژینات کلسیم باعث مقاومت در برابر اشعه فرابنفش و افزایش ماندگاری در حدود ۷۰ درصد بعد از ۲ سال می‌شود. میزان بقا و فعالیت زیستی *T. harzianum* کپسوله در آلژینات سدیم به صورت دوره‌ای در طی ۶ سال مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق نشان داد حتی بعد از ۶ سال نگهداری در دمای اتاق نیز قارچ کپسوله‌شده فعالیت زیستی خود را حفظ کرده است

(Bhai, 2020). بررسی (Maruyama et al. (2020 نشان داد میکروکپسوله کردن *T. harzianum* به روش ژلاسیون یونی با استفاده از آلزینات سدیم باعث بهبود فعالیت آنزیمی، پایداری و افزایش پتانسیل مهارکنندگی قارچ نسبت به حالت غیرمیکروکپسوله می‌شود. طبق نتایج این تحقیق، پتانسل مهارکنندگی *T. harzianum* میکروکپسوله بر علیه *S. sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاه به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرد به طوری که بیمارگر توانایی تولید اسکروت را نداشت در حالی که در آزمون بازدارندگی با قارچ غیرمیکروکپسوله، بیمارگر قادر به تولید اسکروت بود. فعالیت آنزیمی اهمیت زیادی در مکانیسم عمل *T. harzianum* دارد. نتایج این بررسی نشان داد میکروکپسوله کردن *T. harzianum* باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و سلولاز می‌شود. (Przyklenk et al. (2017 نیز نشان دادند کینیدی‌های میکروکپسوله *Metarhizium sp.* می‌توانند تا ۶ ماه در دمای ۵ درجه سلسیوس زنده بمانند، اگرچه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس میزان بقاء کاهش می‌یابد. طبق یافته‌های (Lopes et al. (2020 و (Adzmi et al. (2021 دمای مطلوب برای نگهداری *Trichoderma* کپسوله به ترتیب ۸ و ۵ درجه سلسیوس است و دمای بالاتر باعث افت درصد زنده‌مانی می‌شود. افزایش دما می‌تواند با تحریک تولید و آزادسازی گونه‌های فعال اکسیژن موجب کاهش قابلیت بقاء سلول‌ها شود (Muñoz-Celaya et al., 2012). بررسی (Naraghi & Nattaj (2022 نشان داد *Talaromyces flavus* کپسوله با کاهش شدت پژمردگی ورتیسیلیوم در پنبه همراه بود. همچنین میکروکپسوله کردن اسپورهای *T. asperellum* ماندگاری و کارایی مهارکنندگی عامل زیستی را نسبت به حالت غیرمیکروکپسوله در برابر سفیدک پودری خیار افزایش داد (Qi et al., 2023). مایه‌زنی سیب‌زمینی با سویه‌های کپسوله‌شده *Pseudomonas fluorescens* منجر به کاهش وقوع بیماری *Fusarium solani* گردید (Pour et al., 2019). طبق بررسی (Saberi-Riseh & Moradi-pour (2021 باکتری *Streptomyces fulvissimus* Uts22 کپسوله به طور موثر تا ۹۰ درصد قادر به کنترل بیماری پاخوره گندم بوده است. فرمولاسیون میکروکپسوله *Bacillus velezensis* توانست شدت بیماری ناشی از *Phytophthora drechsleri* را کاهش دهد و شاخص‌های رشد گیاه را بهبود بخشد. نتایج حاصل نشان داد که ترکیب هم‌افزای باکتری‌های مفید با نانوذرات در یک ماتریس زیست‌پلیمری نه تنها اثر بازدارندگی قوی علیه بیمارگر ایجاد می‌کند، بلکه پایداری و بقا بالای میکروارگانیسم‌ها را در شرایط انبارداری بلندمدت تضمین کرده و می‌تواند به عنوان رویکردی پایدار و کارآمد در مدیریت زیستی بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرد (Moradi Pour et al., 2022). بررسی (Pour et al. (2024 نشان داد فرمولاسیون میکروکپسوله *B. velezensis* BV9 نقش مؤثری در افزایش بقاء، پایداری و کارایی این باکتری ایفا می‌کند. تمامی میکروکپسول‌های تهیه‌شده توانستند بیش از ۶۰ درصد از سلول‌های باکتری را در برابر شرایط نامطلوب محیطی محافظت کنند و منجر به کنترل بیماری پاخوره گندم شدند. نتایج (Arias Chavarría et al. (2025 نیز نشان داد که میکروکپسوله کردن کینیدی‌های *T. longibrachiatum* منجر به بهبود ماندگاری و حفظ توانایی آنتاگونیستی آن در برابر *Fusarium oxysporum* در شرایط آزمایشگاهی گردید.

روش‌شناسی پژوهش

تهیه جدایه عامل مهارزیستی و قارچ بیمارگر

در این پژوهش جدایه *Trichoderma harzianum* Ah90 و قارچ بیمارگر *Sclerotinia sclerotiorum* از کلکسیون قارچ‌های گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد.

تهیه سوسپانسیون اسپور *T. harzianum*

به منظور تهیه سوسپانسیون اسپور، قارچ *T. harzianum* بر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (PDA) رشد داده شد. تشتک‌های پتری به مدت ده روز در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس جهت رشد کامل کلنی‌ها نگهداری شدند. سپس

افزودن ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل به سطح آن‌ها، اسپورها جمع‌آوری گردیدند. جهت جدا شدن ترکیبات حل شده از محیط کشت، سوسپانسیون اسپور دو بار با آب مقطر استریل به وسیله‌ی سانتریفیوژ به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه شست‌وشو داده شد. جداسازی ریشه‌های قارچ با استفاده از صافی واتمن شماره ۱ انجام شد. در نهایت، غلظت اسپورها با استفاده از لام هموسیتومتر به میزان $1/7 \times 10^7$ اسپور در هر میلی لیتر تنظیم گردید (صانعی و رضوی، ۱۳۹۸).

تهیه کپسول‌های حاوی *T. harzianum*

کپسول‌ها بر اساس روش ژلاسیون یونی با اندکی تغییر نسبت به (Dos Santos et al., 2015) تهیه شدند. طبق این روش، پس از آماده‌سازی سوسپانسیون اسپور قارچ، مقدار مشخص از پودر آلزینات سدیم (A2033, Sigma-Aldrich) به سوسپانسیون اسپور افزوده و تحت هم‌زدن مداوم ترکیب گردید تا محلول دو درصد (وزنی/حجمی) سدیم آلزینات حاوی اسپور قارچ حاصل شود. مخلوط به مدت یک ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس همگن شد. سپس محلول آلزینات-اسپور به صورت قطره‌ای توسط سرنگ به درون محلول $0/1$ مولار کلسیم کلرید (CaCl₂, Sigma-Aldrich) اضافه گردید. پس از گذشت ۲ ساعت، کپسول‌های تشکیل شده از محلول جدا شده و چندین بار با آب مقطر استریل شسته شدند. کپسول‌های حاصله در ظروف شیشه‌ای استریل و دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. بخشی از کپسول‌ها نیز تا رسیدن به وزن ثابت در آن دمای 27 ± 2 درجه سلسیوس خشک شدند تا با نمونه‌های مرطوب مقایسه شوند. همچنین، کپسول‌های آلزینات سدیم بدون اسپور قارچ (کنترل منفی) به روش مشابه و بدون افزودن سوسپانسیون اسپور تهیه گردید.

اندازه‌گیری کپسول‌ها

به منظور بررسی اندازه‌ی کپسول‌ها، حدود ۵۰۰ کپسول مرطوب و خشک حاوی اسپور و بدون اسپور به‌صورت تصادفی از بین نمونه‌ها انتخاب شدند. قطر متوسط کپسول‌ها با استفاده از استریومیکروسکوپ (مدل: Motich SMZ.-171) کالیبره‌شده با لام میکرومتری در بزرگنمایی 100X اندازه‌گیری شد. قطر متوسط کپسول‌ها بر حسب میکرومتر (μm) محاسبه شد.

بررسی نرخ تورم کپسول‌ها

مقایسه نرخ تورم کپسول‌های خشک در دو محیط سرم فیزیولوژیک $0/9$ درصد و آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس انجام شد. پس از پایان زمان غوطه‌وری، کپسول‌ها خارج شدند و آب اضافی سطح آن‌ها به‌آرامی خشک گردید. وزن کپسول‌های متورم مستقیماً با ترازوی دیجیتالی اندازه‌گیری شد (Wu et al., 2014).

$$\text{Swelling ratio (\%)} = (W_s - W_0) / W_0 \times 100 \quad (\text{رابطه ۱})$$

طبق رابطه W_0 وزن کپسول‌ها قبل از تورم و W_s وزن کپسول‌ها بعد از تورم می‌باشد.

برآورد جمعیت اسپور قارچ درون کپسول‌ها

برای آزاد شدن اسپورهای قارچ، تعداد مشخصی از کپسول‌ها (۱۰ عدد در هر ۴ تکرار) در هاون چینی استریل حاوی محلول سدیم سیترات دو درصد (برای حل شدن ساختار کپسول) قرار گرفتند و به‌طور کامل آسیاب و له شدند. سپس سری رقت‌ها با استفاده از محلول نمکی (NaCl) $0/85$ درصد حاوی توئین ۸۰ ($0/1$ درصد) تهیه گردید. پس از انجام رقت‌سازی، از هر رقت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول حاصل بر روی محیط کشت PDA ریخته شد. تشتک‌های پتری به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای 25 ± 2 درجه‌ی سلسیوس در تاریکی نگهداری شدند. تعداد پرگنه‌های تشکیل شده به عنوان واحدهای تشکیل‌دهنده‌ی کلنی در هر کپسول شمارش و ثبت شد (Maruyama et al., 2020; Adzmi et al., 2021).

کارایی پوشش‌دهی به عنوان تعداد سلول‌های زنده بارگذاری‌شده درون هر کپسول تعریف شده و بر اساس رابطه ارائه‌شده توسط Wu et al. (2014) (رابطه ۲) محاسبه گردید:

$$\text{Encapsulation efficiency (\%)} = (N_0 - N_u) / N_0 \times 100 \quad (\text{رابطه ۲})$$

طبق رابطه، N_u تعداد سلول‌های بارگذاری نشده و N_0 تعداد کل سلول‌های زنده استفاده شده در فرآیند پوشش‌دهی (CFU/ml) می‌باشد.

آزادسازی اسپورهای قارچ

به منظور بررسی رهاسازی اسپورهای از کپسول‌ها، ابتدا یک گرم از کپسول‌های مرطوب و خشک در ۱۰ میلی‌لیتر محلول نمکی استریل (۰/۹ درصد) غوطه‌ور و برای چند روز (۵ روز) در دمای 25 ± 2 درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. نمونه‌ها به میزان ۱۰۰ میکرولیتر در فواصل زمانی مختلف برای تعیین آزادسازی اسپورها از کپسول‌ها بر روی محیط کشت PDA کشت گردیدند. شمارش تعداد اسپور بعد از گذشته ۲۴ الی ۷۲ ساعت قرارگیری در دمای 28 ± 2 درجه سلسیوس انجام شد (Tu et al., 2015; Adzmi et al., 2021).

بررسی تاثیر دما بر ماندگاری اسپورهای قارچ در کپسول

جهت بررسی تاثیر دما بر قابلیت ماندگاری اسپورهای قارچ در حالت کپسول و غیرکپسول، کپسول‌های خشک شده و مرطوب، همچنین سوسپانسیون اسپور *T. harzianum*، در دماهای ۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و طی دوره‌های زمانی مختلف بر روی محیط کشت PDA کشت داده شدند تا قابلیت زنده‌مانی آن‌ها بررسی شود. پس از شمارش پرگنه‌ها، درصد زنده‌مانی اسپورهای قارچ نسبت به جمعیت اولیه (پیش از قرارگیری در شرایط دمایی مختلف) محاسبه گردید (Tu et al., 2015; Maruyama et al., 2020).

بررسی تاثیر اشعه فرابنفش بر ماندگاری اسپورهای قارچ در کپسول

ارزیابی ماندگاری اسپورهای قارچ در حالت کپسول و غیرکپسول با استفاده از کپسول‌ها (خشک و مرطوب) و سوسپانسیون اسپورهای قارچ درون تشک‌های پتری انجام شد. نمونه‌ها پس از قرار گرفتن در معرض اشعه فرابنفش (لامپ ۳۰ وات، طول موج ۲۴۵ نانومتر) به فاصله‌ی ۵ سانتی‌متری و با فواصل زمانی ۰، ۳۰، ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰، ۳۶۰ و ۱۴۴۰ دقیقه بر روی محیط کشت PDA به روش سری رقت کشت شدند. پس از شمارش پرگنه‌های تشکیل شده بر روی محیط کشت، میزان زنده‌مانی اسپورهای قارچ بعد از تابش اشعه فرابنفش در هر زمان نسبت به جمعیت آن‌ها در زمان اولیه (قبل از تابش اشعه فرابنفش) محاسبه شد (Mancera-López et al., 2019; Maruyama et al., 2020).

بررسی تجزیه زیستی کپسول‌ها

کپسول‌های حاوی اسپورهای قارچ و بدون آن از نظر زیست‌تخریب‌پذیری با تعیین درصد کاهش وزن آن‌ها در خاک با گذشت زمان ارزیابی شدند. کپسول‌ها پس از قرارگرفتن در کاغذ صافی با منافذ بسیار ریز (۱۰-۲۰ میکرومتر) در عمق ۵ سانتی‌متری خاک طبیعی گذاشته شدند. نمونه‌ها به مدت ۳۰ روز در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری گردیدند و سطح رطوبت خاک با افزودن آب مقطر در صورت لزوم در حد اشباع ثابت نگه داشته شد. نمونه‌های دفن شده پس از گذشت زمان‌های مختلف از خاک خارج، با آب مقطر شست‌وشو داده و پس از خشک کردن به مدت ۴۸ ساعت تا رسیدن به وزن ثابت، توزین شدند (Wu et al., 2014).

بررسی فعالیت مهارکنندگی در شرایط درون شیشه‌ای

به منظور بررسی فعالیت مهارکنندگی *T. harzianum* قبل و پس از تهیه کپسول برعلیه *S. sclerotiorum* از آزمون‌های کشت متقابل (Dennis & Webster, 1971c)، تاثیر ترکیبات فرار (Dennis & Webster, 1971b) و تاثیر ترکیبات غیر فرار (Dennis & Webster, 1971a) استفاده شد و درصد بازدارندگی با استفاده از فرمول آبوت (رابطه ۳) تعیین شد (رضوی و همکاران، ۱۴۰۰).

$$\text{Growth inhibition (\%)} = (C - T) / C \times 100 \quad \text{رابطه ۳}$$

در این رابطه C شعاع رشد قارچ بیمارگر در محیط فاقد عامل مهار زیستی و T شعاع رشد قارچ بیمارگر در محیط واجد آن می‌باشد.

تهیه زادمایه بیمارگر و خاک آلوده

برای آماده‌سازی زادمایه قارچ بیمارگر، ابتدا دانه‌های سالم گندم به مدت یک شب در آب خیسانده شدند. پس از خارج کردن آب اضافی، ۳۰۰ گرم از دانه‌ها در ارلن‌های یک لیتری ریخته شده و در دو روز متوالی، به مدت ۴۵ دقیقه و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شدند. سپس شش دیسک ۵ میلی‌متری از حاشیه پرگنه فعال قارچ *S. sclerotiorum* (کشت چهار روزه) به هر ارلن اضافه گردید. برای تکمیل رشد قارچ بر روی دانه‌های گندم، ارلن‌ها به مدت ۳ تا ۴ هفته در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس نگهداری شدند. در نهایت، زادمایه حاصل با خاک استریل به میزان ۵ درصد مخلوط شد (رضوی و همکاران، ۱۴۰۰).

کاشت بذر و مایه‌زنی بیمارگر

بذرهای گوجه‌فرنگی رقم سوپرچف پس از ضدعفونی در محلول یک درصد هیپوکلریت، شست‌وشو با آب مقطر استریل و خشک شدن، در گلدان‌های حاوی مخلوط خاک استریل و زادمایه بیمارگر (به میزان ۵ درصد) کاشته شدند. سپس غلظت‌های متفاوتی از *T. harzianum* در دو شکل کپسوله و غیرکپسوله (5×10^2 , 2×10^3 , 1×10^4 CFU/g) در بستر خاک به ازای هر بذر افزوده شد و در هر گلدان پنج بذر کاشته شد. جهت ایجاد شرایط بهینه برای رشد، گلدان‌ها در داخل گلخانه با دمای بین ۲۵ تا ۲۷ درجه سلسیوس و دوره نوری ۱۴ ساعت روشنایی و ۱۰ ساعت تاریکی قرار داده شدند. آبیاری روزانه برای اطمینان از رطوبت ثابت خاک انجام شد. پس از گذشت یک ماه و مشاهده‌ی علائم بیماری بررسی درصد بیماری صورت گرفت (رضوی و همکاران، ۱۴۰۰).

سنجش فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز

اندازه‌گیری میزان فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز با استفاده از H_2O_2 و فنیل‌دی‌آمین بر اساس تغییرات جذب نور در طول موج ۴۸۵ نانومتر بوده است (Karthikeyan et al., 2006).

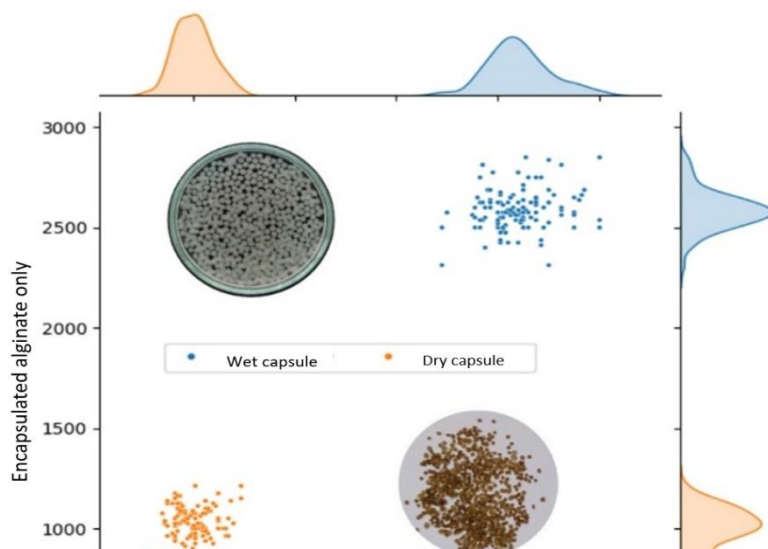
تجزیه و تحلیل داده‌ها

آزمایش به صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار R.4.5.1 مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و مقایسه میانگین‌ها با بهره‌گیری از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری $p \leq 0.05$ انجام شد.

یافته‌های پژوهش

ویژگی‌های کپسول‌ها و برآورد جمعیت اسپور قارچ

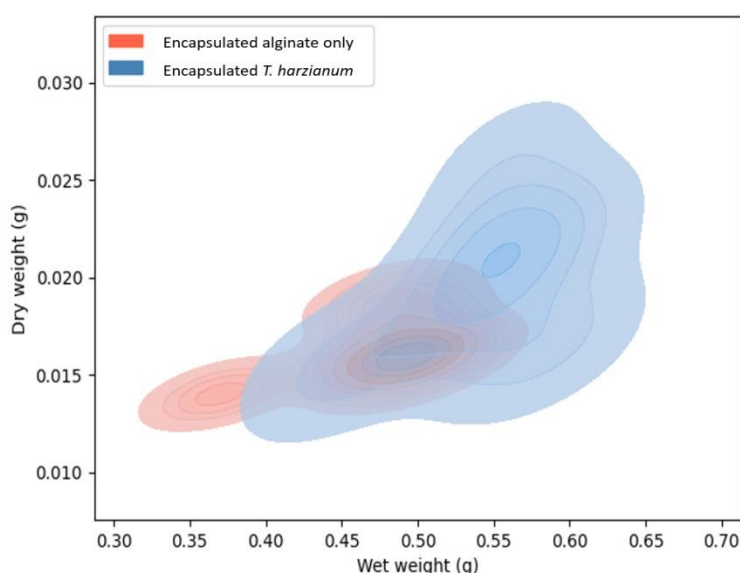
ویژگی‌های ظاهری و اندازه کپسول‌های واجد یا فاقد اسپور *T. harzianum* در شکل ۱ نشان داده شده است. کپسول‌های مرطوب آلترینات سدیم دارای شکلی تقریباً کروی با رنگ سفید شفاف بودند، در حالی که کپسول‌های حاوی اسپورهای *T. harzianum* تقریباً کروی و رنگ مایل به سبز داشتند. از نظر میانگین اندازه، کپسول‌های مرطوب آلترینات سدیم و *T. harzianum* به ترتیب ۲۵۸۰ و ۲۶۰۰ میکرومتر و میکروکپسول‌های خشک آن‌ها ۱۰۰۰ میکرومتر بودند. همچنین تعداد اسپورهای *T. harzianum* در هر گرم کپسول $10^5 \times 2/9$ و بازده کپسولاسیون ۹۹ درصد برآورد گردید.



شکل ۱. تغییرات اندازه کپسول‌های خشک و مرطوب آلژینات به تنهایی در مقابل آلژینات همراه با *T. harzianum*.

ارزیابی تغییرات وزن کپسول‌ها

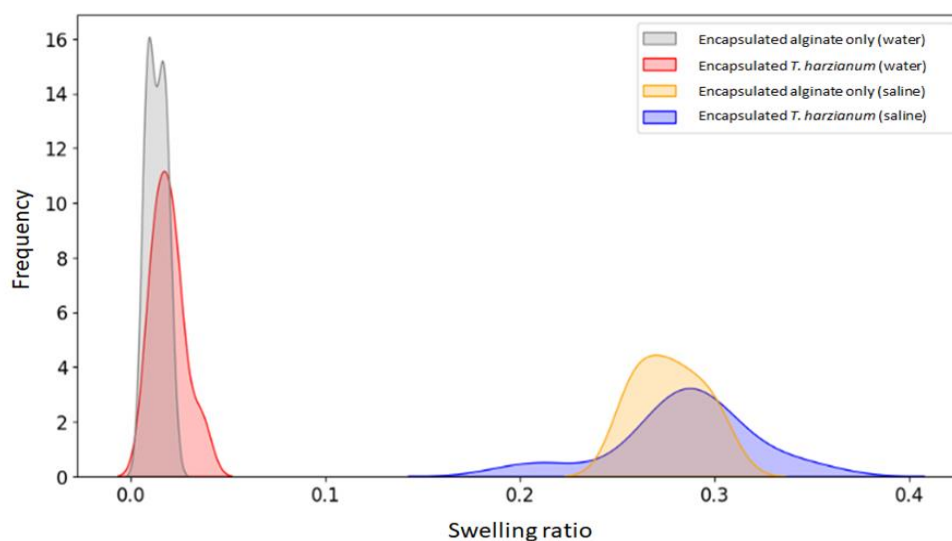
نمودار تغییرات وزن کپسول‌های خشک و مرطوب در شکل ۲ آمده است. براساس این نمودار کپسول‌های حاوی *T. harzianum* وزن تر و خشک بیشتری دارند که ناشی از حضور اسپوره‌های قارچ می‌باشد.



شکل ۲. تغییرات وزن کپسول‌های حاوی اسپوره‌های *T. harzianum* و بدون آن در حالت مرطوب و خشک.

بررسی نرخ تورم کپسول‌ها

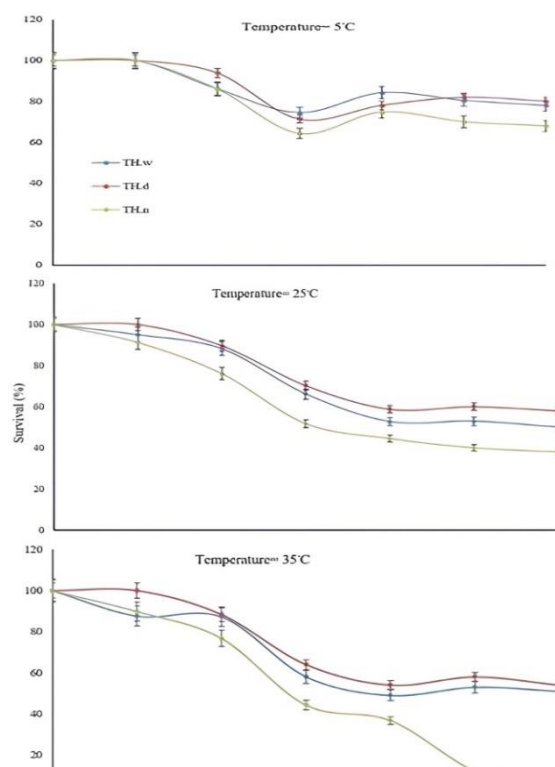
نتایج بررسی نرخ تورم کپسول‌ها در دو محیط مختلف آب و محلول نمک در شکل ۳ نشان داده شده است. نمودار توزیع فراوانی نسبت تورم کپسول‌ها نشان می‌دهد که نوع محیط و وجود اسپوره‌های *T. harzianum* بر رفتار تورمی کپسول‌ها تاثیر معناداری دارند. در محیط آبی، هر دو نوع کپسول (آلژینات سدیم و حاوی قارچ *T. harzianum*) نسبت تورم بسیار پایینی در محدوده ۰ تا ۰/۰۵ داشتند. در مقابل، کپسول‌های قرار گرفته در محلول نمکی نسبت تورم بالایی در محدوده ۰/۲۰ تا ۰/۴۰ را نمایش دادند که این افزایش به دلیل فشار اسمزی ناشی از یون‌های محلول است. کپسول‌های حاوی *T. harzianum* تورم کمتری نسبت به نمونه‌های خالص نشان دادند که احتمالاً به دلیل اشغال فضای داخلی کپسول توسط اسپوره‌های قارچ و تعاملات بیوشیمیایی است که منجر به فشردگی بیشتر ساختار و کاهش قابلیت جذب آب می‌شود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که در شرایط شوری، کپسول‌های حاوی اسپوره‌های *T. harzianum* ممکن است پایداری بهتری داشته باشند، اما طراحی فرمولاسیون باید با در نظر گرفتن تغییرات اسمزی محیط و تاثیر آن بر رهایش کنترل شده انجام شود.



شکل ۳. تغییرات نرخ تورم کیسول‌های آلژینات به تنهایی و آلژینات همراه با *T. harzianum* در دو محیط آب و محلول نمک ۰/۵ درصد.

تأثیر دما بر ماندگاری اسپورهای قارچ *T. harzianum* در کیسول

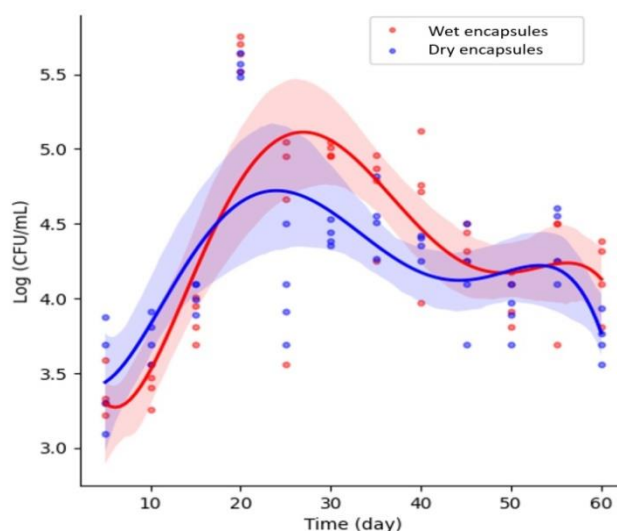
یافته‌های مربوط به زنده‌مانی اسپورها در کیسول‌ها تحت شرایط دمایی و زمانی مختلف نشان داد که کیسوله کردن موجب بهبود قابل توجه مقاومت *T. harzianum* در برابر دما در مقایسه با حالت غیرکیسوله شد و درصد زنده‌مانی *T. harzianum* در کیسول‌های خشک و مرطوب، در دماها و دوره‌های زمانی مختلف بیشتر از اسپورها آزاد بوده است (شکل ۴). درصد زنده‌مانی اسپورهای غیرکیسوله *T. harzianum* پس از ۹۰ روز قرارگیری در دمای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس بر خلاف دمای ۵ درجه سلسیوس کاهش شدیدی داشت، در صورتی که این کاهش در مورد *T. harzianum* کیسوله پس از مدت زمان و دمای مشابه به ترتیب ۴۲ و ۴۶ درصد بود. به طور کلی، این نتایج نشان‌دهنده تأثیر مثبت فرمولاسیون کیسول بر ماندگاری *T. harzianum* در دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس است، در حالی که دمای ۵ درجه سلسیوس به عنوان گزینه‌ای مطلوب‌تر برای نگهداری طولانی مدت پیشنهاد می‌شود.



شکل ۴. درصد زنده‌مانی *T. harzianum* در حالت کپسول خشک (TH.d)، مرطوب (TH.w) و غیرکپسول (TH.n) طی ۹۰ روز نگهداری در دمای ۵، ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس.

آزادسازی اسپورها از کپسول‌ها

آزادسازی اسپورهای *T. harzianum* از کپسول‌های خشک و مرطوب در شکل ۵ نشان داده شده است. طبق نمودار بیشترین جمعیت رها شده اسپورهای قارچ از کپسول‌های مرطوب و خشک به ترتیب $\log 5.6 \text{ cfu/ml}$ و $\log 5.5 \text{ cfu/ml}$ پس از ۲۳ تا ۲۸ روز (براساس مدل) مشاهده شد سپس روند آزادسازی از این نقطه با گذر زمان کاهش یافت که احتمالاً به دلیل کاهش اسپورهای موجود در کپسول‌ها می‌باشد.



شکل ۵. روند آزادسازی اسپورهای *T. harzianum* از کپسول‌های خشک و مرطوب.

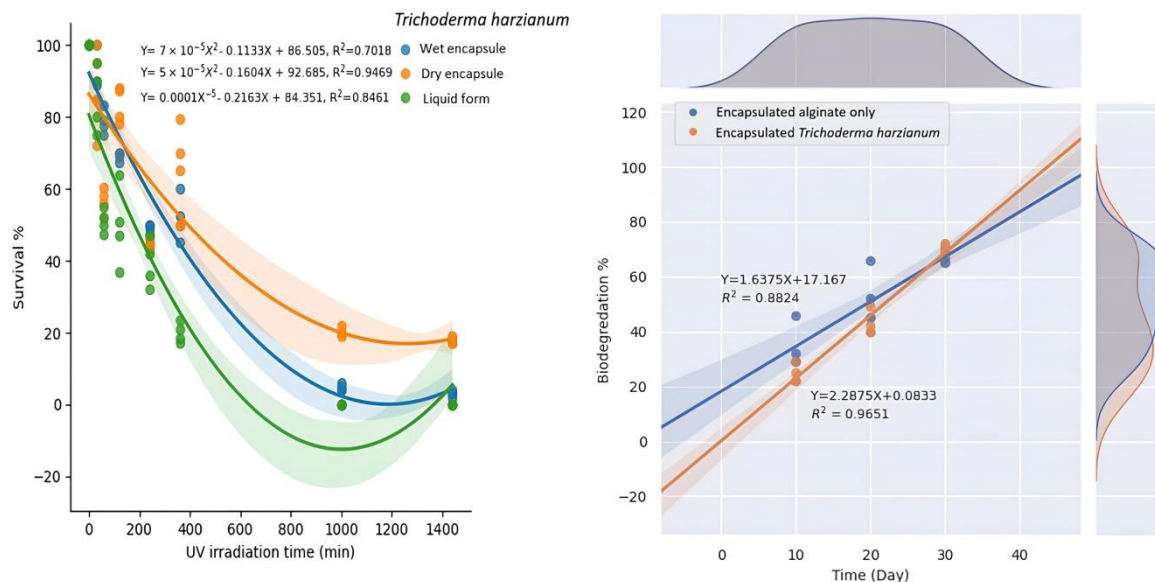
تأثیر اشعه فرابنفش بر ماندگاری اسپورهای قارچ *T. harzianum* در کپسول

نتایج تأثیر اشعه فرابنفش بر زنده‌مانی اسپورهای کپسوله و غیرکپسوله در شکل ۶ نشان داده شده است. طبق نتایج، اسپورهای قارچ در حالت کپسوله (مرطوب و خشک) نسبت به حالت غیرکپسوله (سوسپانسیونی از اسپور) مقاومت بیشتری در برابر اشعه فرابنفش داشتند. در این خصوص با افزایش مدت زمان قرارگیری در معرض اشعه فرابنفش مقاومت اسپورهای قارچ در حالت کپسوله نسبت به حالت غیرکپسوله بیشتر بود. قرارگیری نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت در معرض اشعه فرابنفش با کاهش بیش از ۹۰ درصد سلول‌های آزاد همراه بوده در حالی که در مورد کپسول‌های خشک *T. harzianum* این میزان کمتر بود.

تجزیه زیستی کپسول‌ها

نتایج تجزیه‌ی زیستی رابطه خطی قوی بین زمان و درصد تخریب کپسول را نشان داد، اما کپسول‌های حاوی *T. harzianum* نسبت به کپسول‌های آلژینات سرعت تخریب بیشتری داشتند (شکل ۶). ضریب تبیین برای کپسول‌های حاوی اسپورهای قارچ ($R^2 = 0.9651$) نسبت به آلژینات تنها ($R^2 = 0.8824$) بالاتر بود که نشان‌دهنده رفتار قابل پیش‌بینی‌تر و

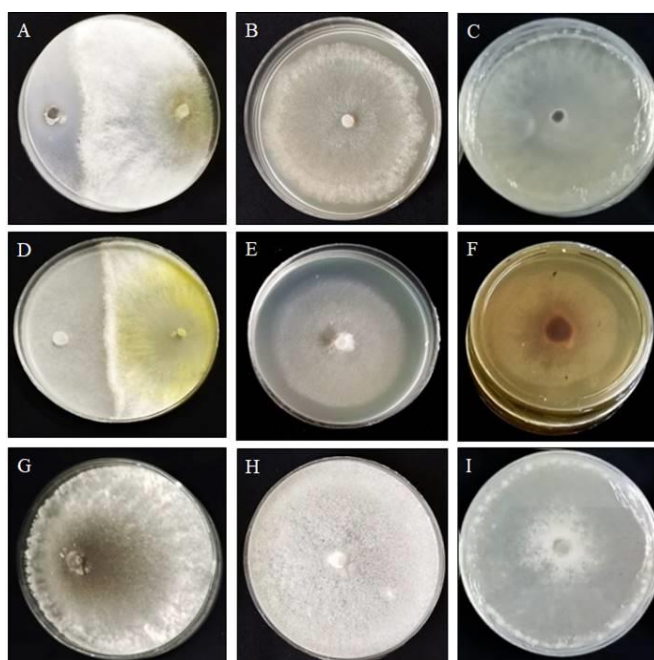
یکنواخت‌تر فرآیند تخریب در حضور قارچ است. همچنین این تفاوت می‌تواند به دلیل فعالیت آنزیم‌های سلولازی ترشح شده توسط *T. harzianum*، افزایش تخلخل ساختاری و تسهیل فعالیت میکروارگانیسم‌های تجزیه‌کننده محیطی باشد.



شکل ۶. چپ: تاثیر مدت زمان‌های مختلف تابش اشعه فرابنفش بر درصد ماندگاری کپسول‌های خشک و مرطوب *T. harzianum* و سوسپانسیون اسپور قارچ. راست: تجزیه زیستی آلژینات سدیم و *T. harzianum* کپسوله در مدت زمان‌های مختلف.

بررسی فعالیت مهارکنندگی در شرایط درون شیشه‌ای

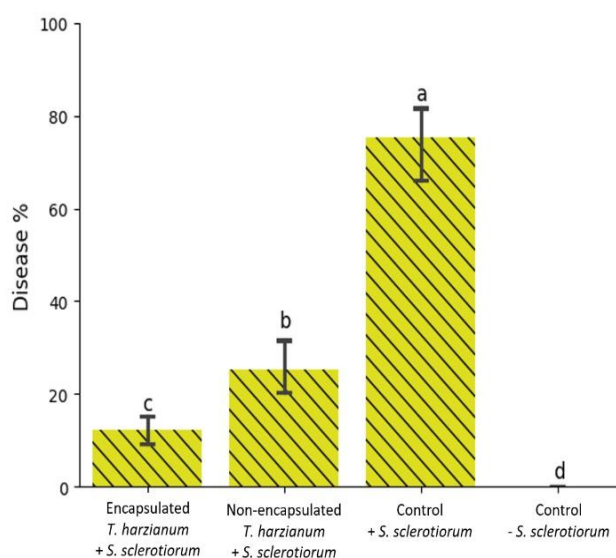
فعالیت مهارکنندگی *T. harzianum* بر علیه *S. sclerotiorum* در شرایط درون شیشه‌ای مورد بررسی قرار گرفت. درصد بازدارندگی برای آزمون کشت متقابل، تاثیر ترکیبات فرار و تاثیر ترکیبات غیرفرار برای *T. harzianum* غیرکپسوله به ترتیب ۷۴/۹۹، ۴۳/۲۷ و ۳۴/۶۶ درصد و برای *T. harzianum* کپسوله به ترتیب ۵۲/۹۷ درصد، ۴۵/۴۵ درصد و ۳۱/۸۳ درصد برآورد گردید (شکل ۷).



شکل ۷. تاثیر آزمون کشت متقابل، تاثیر ترکیبات غیرفرار و تاثیر ترکیبات فرار *T. harzianum* غیرکپسوله (A، B و C) *T. harzianum* کپسوله (D)، E و F) و شاهد (G، H و I) بر رشد *S. sclerotiorum* در شرایط درون شیشه‌ای.

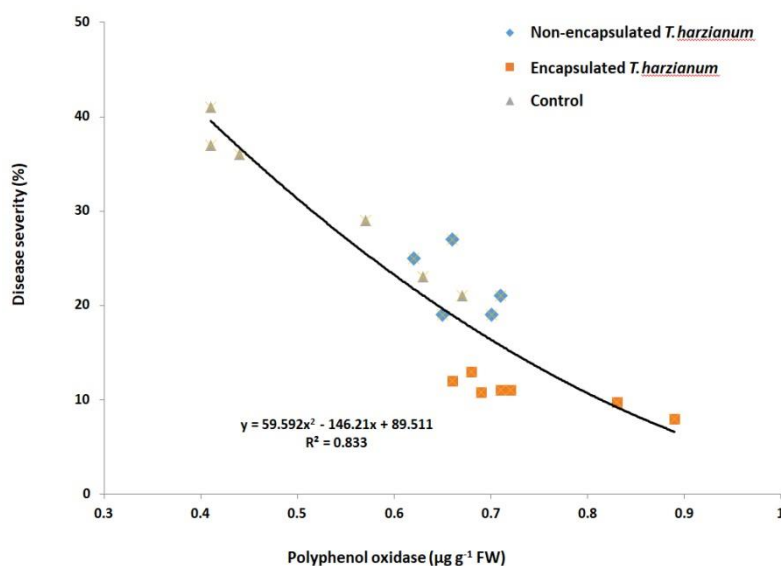
بررسی فعالیت مهارکنندگی در شرایط گلخانه‌ای

نتایج آزمایش‌های گلخانه‌ای نشان داد که تیمار گیاهان با قارچ آنتاگونیست منجر به کاهش قابل توجه در درصد بروز بیماری نسبت به شاهد شد. درصد بیماری در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* کپسوله ۴/۴۴ درصد و در شاهد ۷۳/۳۳ درصد برآورد گردید. همچنین، استفاده از فرمولاسیون کپسوله *T. harzianum* نسبت به حالت غیرکپسوله کاهش بیشتری در درصد بیماری ایجاد کرد (شکل ۸).



شکل ۸. تاثیر *T. harzianum* کپسوله و غیرکپسوله بر درصد بیماری *S. sclerotiorum* ستون‌ها با حروف غیرمشابه دارای اختلاف معنی‌دار می‌باشند (آزمون دانکن، $p \leq 0.05$).

سطح آنزیم‌های دفاعی در گیاهان تیمار شده با *T. harzianum* کپسوله نسبت به *T. harzianum* غیرکپسوله و شاهد به ترتیب ۱۰/۳۲ - ۱۴/۲۵ و ۳۱/۶۶ - ۱۱/۲۷ درصد افزایش داشت. ارتباط دو متغیر به صورت مدل رگرسیونی $Y = 59.592x^2 - 142.21X + 89.511$ (با ضریب تعیین ۰/۸۳۳) ($p \leq 0.01$) برآورد شد که نشان می‌دهد افزایش فعالیت آنزیم با کاهش درصد بیماری مرتبط است (شکل ۹).



شکل ۹. ارتباط بین درصد شدت بیماری و سطح آنزیم‌های دفاعی در تیمارهای مختلف.

بحث

جنس *Trichoderma* با برخورداری از گونه‌های متنوع، نقشی کلیدی در مهار زیستی بیمارگرهای گیاهی ایفا می‌کند و به عنوان یکی از موفق‌ترین عوامل مهار زیستی در برنامه‌های مدیریت تلفیقی شناخته شده است. امروزه، بخش کشاورزی به سمت استفاده از این عامل زیستی به عنوان راهکاری پایدار حرکت کرده است، هرچند روش‌های سنتی تولید آن همچنان با چالش‌های قابل توجهی مواجه است. با این حال، ظرفیت بالای این قارچ برای ادغام با فناوری‌های پیشرفته، افق‌های جدیدی را برای طراحی محصولات بهبودیافته و کارآمدتر گشوده است (Vindas-Reyes et al., 2024). یکی از رویکردهای نوین برای بهبود فرمولاسیون‌های زیستی، بهره‌گیری از تکنولوژی کپسولاسیون است (Jing et al., 2011; Lopes et al., 2023; Vindas-Reyes et al., 2024). در این روش، بخش فعال عامل زیستی در پوششی از مواد پلیمری قرار می‌گیرد. این پوشش تأثیرات مخرب عوامل محیطی را کاهش داده و بقای میکروارگانیسم را به همراه حفظ توان متابولیکی آن تضمین می‌کند. این فناوری نه تنها امکان به دام انداختن تعداد زیادی از سلول‌ها درون کپسول‌های تولیدشده را فراهم می‌آورد، بلکه پایداری و بقای سلول‌های زنده را در طول فرآیند کپسوله‌سازی و پس از آن، به ویژه طی دوره‌های طولانی نگهداری یا هنگام کاربرد در مزرعه حفظ می‌کند (Locatelli et al., 2018; Balla et al., 2022). علاوه بر این، خواص ساختاری دیواره کپسول امکان آزادسازی کنترل‌شده و تدریجی سلول‌های میکروبی را از طریق رشد یا تخریب تدریجی پوشش فراهم می‌آورد، که این موضوع به استقرار بهتر در خاک، محیط ریزوسفر یا سطح برگ و همچنین افزایش ماندگاری پس از کاربرد منجر می‌شود. نتیجه این فرآیند، کاهش چشمگیر در میزان و تعداد دفعات مصرف برای اعمال عامل مهار زیستی خواهد بود (Vemmer & Patel, 2013). کیفیت و عملکرد فرمولاسیون کپسول تا حد زیادی به نوع حامل یا ماده دیواره بستگی دارد و از میان پلیمرها، آلژینات سدیم به دلیل زیست‌سازگاری، غیرسمی بودن، هزینه پایین و امکان رهایش تدریجی سلول‌های زنده، به عنوان رایج‌ترین پلیمر حامل در کپسوله‌سازی عوامل مهار زیستی شناخته می‌شود (Rodrigues et al., 2020; Martínez-Cano et al., 2022). از سوی دیگر، به کارگیری پلیمرهای زیست‌سازگار و زیست‌تخریب‌پذیر به عنوان دیواره کپسول، مزیت زیست‌محیطی قابل توجهی را به این نسل از فرمولاسیون‌ها اضافه می‌کند (Vindas-Reyes et al., 2024).

در این مطالعه، از روش ژلاسیون یونی برای تهیه *T. harzianum* کپسوله استفاده گردید. به طور کلی، ویژگی‌های ظاهری و اندازه کپسول‌ها تحت تأثیر عواملی همچون ویسکوزیته محلول آلژینات، قطر نازل، غلظت کلرید کلسیم، نرخ جریان محلول

و فاصله نازل تا حمام ژل سازی قرار دارد (Juric et al., 2019). در شرایط آزمایشی حاضر، کپسول‌های حاصل عمدتاً شکلی کروی داشتند که این یافته با مشاهدات سایر محققین (Dos Santos et al., 2015; Maruyama et al., 2020; Adzmi et al., 2021) همسو بود. در روش ژلاسیون یونی، به دلیل عدم نیاز به دمای بالا، زنده‌مانی سلول‌ها در طول کپسوله‌سازی تا حد قابل توجهی حفظ می‌شود. مطالعات متعددی از جمله Liu & Liu (2009)، Acuña-Jiménez et al. (2015) و Muñoz-Celaya et al. (2012) نشان دادند کاربرد دماهای بالا در روش‌هایی مانند خشک کردن پاششی، به طور محسوسی باعث کاهش بقای اسپورهای قارچ می‌شود. با این حال، باید در نظر داشت که حتی در استفاده از روش ژلاسیون یونی، نوع پلیمر مصرفی می‌تواند بر بقاء قارچ‌های محصور شده اثر منفی بگذارد، همانطور که Locatelli et al. (2018) در مطالعه خود مشاهده کردند. این موضوع بر نقش حیاتی مواد و روش مورد استفاده در کپسولاسیون عوامل بیوکنترل تاکید دارد. موفقیت کپسولاسیون میکروارگانیسم‌ها به عوامل مختلفی مانند راندمان کپسولاسیون، میزان بقاء، رهاسازی، سازگاری با مواد حامل و فعالیت مهارکنندگی بستگی دارد (Adzmi et al., 2021). با توجه به مطالعه حاضر، راندمان پوشش‌دهی بسیار بالا و تقریباً ۹۹ درصد برآورد شد که نسبت به مطالعه Liu & Liu (2009) و Mancera-López et al. (2019) بیشتر بود. Arias Chavarría et al. (2025) نیز در بررسی خود راندمان کپسولاسیون را بیش از ۹۲ درصد مشاهده کرد.

ماندگاری یکی از جنبه‌های کلیدی در تولید تجاری فرآورده‌های زیستی محسوب می‌شود. بقای میکروارگانیسم‌ها در بازه دمایی ۴ تا ۳۷ درجه سلسیوس در طول نگهداری تدریجاً کاهش می‌یابد (Fu & Chen, 2011). یافته‌های این پژوهش نشان داد که کپسوله کردن، بقا و پایداری *T. harzianum* را در دماهای ۲۵ و ۳۵ درجه سلسیوس نسبت به حالت غیرکپسوله به طور قابل ملاحظه‌ای افزایش می‌دهد، هرچند دمای ۵ درجه سلسیوس شرایط بهتری را برای نگهداری طولانی‌مدت فراهم می‌کند. این نتایج با یافته‌های محققان دیگر مطابقت دارد؛ به طوری که طبق مطالعات Muñoz-Celaya et al. (2012)، Bhai (2020)، Mancera-López et al. (2019)، Locatelli et al. (2018)، Dos Santos et al. (2015) و Maruyama et al. (2020) و Arias-Chavarría et al. (2025) میزان ماندگاری *Trichoderma* کپسوله در دماهای بالا بیشتر از حالت غیرکپسوله بوده است. Przyklenk et al. (2017) نیز نشان دادند کنیدی‌های میکروکپسوله *Metarhizium* sp. می‌توانند تا ۶ ماه در دمای ۵ درجه سلسیوس زنده بمانند، اگرچه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس میزان بقاء کاهش می‌یابد. طبق یافته‌های Lopes et al. (2020) و Adzmi et al. (2021) دمای مطلوب برای نگهداری *Trichoderma* کپسوله به ترتیب ۸ و ۵ درجه سلسیوس است و دمای بالاتر باعث افت درصد زنده‌مانی می‌شود. افزایش دما می‌تواند تولید و آزادسازی گونه‌های فعال اکسیژن را تحریک کند که در نهایت موجب کاهش قابلیت بقاء سلول‌ها خواهد شد (Muñoz-Celaya et al., 2012).

نتایج تاثیر اشعه فرابنفش بر زنده‌مانی *T. harzianum* در حالت کپسول و غیرکپسول نشان داد که اسپورهای قارچ در حالت کپسول (مرطوب و خشک) نسبت به حالت غیرکپسول مقاومت بیشتری در برابر اشعه فرابنفش داشتند. در این رابطه پس از ۲۴ ساعت قرارگیری در معرض اشعه فرابنفش کاهش بیش از ۹۰ درصد در مورد سلول‌های آزاد مشاهده شد در حالی که در مورد کپسول‌های خشک *T. harzianum* این میزان کمتر بود. طبق بررسی Mancera-López et al. (2019) و Maruyama et al. (2020) اسپورهای *T. harzianum* میکروکپسوله مقاومت بهتری در برابر اشعه فرابنفش در مقایسه با قارچ غیرمیکروکپسوله داشت. نتایج به دست آمده از مقایسه کپسول‌های خشک و مرطوب تفاوت معنی‌داری بین آن‌ها مشاهده نشد. هر دو حالت محافظت موثری در برابر دما و اشعه فرابنفش نشان دادند. اما انتخاب کپسول‌های خشک از دیدگاه تجاری-سازای انتخاب مناسب‌تری خواهند بود. این امر عمدتاً به ذخیره‌سازی و کاربرد راحت آن‌ها نسبت داده می‌شود.

کپسولاسیون عوامل مهار زیستی روشی بسیار سودمند است زیرا به حفظ زنده ماندن سلول‌ها در طول فرمولاسیون و کاربرد آن‌ها کمک می‌کند. علاوه بر این، امکان انتشار تدریجی و طولانی مدت آن‌ها را نیز فراهم می‌سازد. ماندگاری عوامل مهار زیستی، به ویژه در اشکال مایع، بسیار کوتاه است و قابلیت بقای آن‌ها به طور قابل توجهی در طول زمان کاهش می‌یابد. علاوه بر

این، فرمولاسیون‌های مایع به سرعت پس از ورود به خاک آزاد می‌شوند در این حالت عامل مهار زیستی فقط در مراحل اولیه رشد گیاه در محیط وجود دارد. در مطالعه‌ی حاضر روند آزادسازی اسپورها *T. harzianum* از کپسول‌های خشک و مرطوب به ترتیب $\log 5.6 \text{ cfu/ml}$ و $\log 5.5 \text{ cfu/ml}$ پس از ۲۳ تا ۲۸ روز (براساس مدل) مشاهده شد و پس از آن روند آزادسازی اسپورها با گذر زمان کاهش یافت که احتمالاً کاهش تعداد سلول در کپسول می‌باشد.

نتایج آزمایش گلخانه‌ای نشان داد که استفاده از فرمولاسیون کپسوله *T. harzianum* درصد بروز بیماری را نسبت به هر دو تیمار *T. harzianum* غیرکپسوله و کپسول‌های آلترینات سدیم بدون اسپور قارچ، کاهش می‌دهد. بررسی Maruyama et al. (2020) نشان داد پتانسل مهارکنندگی *T. harzianum* میکروکپسوله بر علیه *S. sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاه به طور قابل توجهی افزایش پیدا کرد. فعالیت آنزیمی اهمیت زیادی در سازوکار *T. harzianum* دارد. نتایج این بررسی نشان داد میکروکپسوله کردن *T. harzianum* باعث افزایش فعالیت آنزیم‌های کیتیناز و سلولاز می‌شود. بررسی Naraghi & Nattaj (2022) نشان داد *Talaromyces flavus* کپسوله منجر به کاهش شدت پژمردگی ورتیسیلیوم شد. نتایج Qi et al. (2023) نشان داد میکروکپسول‌های *T. asperellum* کارایی مهارکنندگی بالاتری نسبت به غیرمیکروکپسوله در برابر سفیدک پودری خیار داشتند. شواهد حاصل از مطالعات اخیر (Lotfalinezhad et al., 2023, 2024) نشان می‌دهد که کپسول‌های حاوی *Bacillus subtilis* و *T. harzianum* از نظر کنترل برخی بیمارگرهای خاک‌زی در گیاه گوجه‌فرنگی تحت شرایط گلخانه‌ای، عملکرد موثری دارند. نتایج این تحقیقات بیانگر آن است که استفاده از این نوع فرمولاسیون نسبت به فرم غیرکپسوله، به طور قابل توجهی موجب کاهش بروز بیماری مرگ گیاهچه شده است. مایه‌زنی سیب‌زمینی با سویه‌های کپسوله‌شده *P. fluorescens* منجر به کاهش معنادار وقوع بیماری ناشی از *F. solani* گردید (Pour et al., 2019). نتایج (Saber-Riseh & Moradi-pour, 2021) نشان داد باکتری کپسوله‌شده *S. fulvissimus* به طور مؤثر توانست تا ۹۰ درصد بیماری پاختره گندم را کنترل نماید. فرمولاسیون میکروکپسوله *B. velezensis* نیز اثربخشی قابل توجهی در کاهش شدت بیماری ناشی از *P. drechsleri* و بهبود شاخص‌های رشد گیاه نشان داد. نتایج به دست آمده حاکی از آن است که ترکیب هم‌افزای باکتری‌های مفید با نانوذرات در یک ماتریس زیست‌پلیمری نه تنها اثر بازدارندگی قوی علیه بیمارگر ایجاد می‌کند، بلکه پایداری و بقای بالای میکروارگانیسم‌ها را در شرایط انبارداری بلندمدت تضمین می‌نماید و می‌تواند به عنوان رویکردی پایدار و کارآمد در مدیریت زیستی بیماری‌های گیاهی مورد استفاده قرار گیرد (Moradi Pour et al., 2022). مطالعه Pour et al. (2024) نشان داد که فرمولاسیون میکروکپسوله *B. velezensis* BV9 نقش مؤثری در افزایش بقا، پایداری و کارایی این باکتری ایفا می‌کند. میکروکپسول‌های تهیه‌شده توانستند بیش از ۶۰ درصد از سلول‌های باکتریایی را در برابر شرایط نامطلوب محیطی محافظت کرده و در نهایت منجر به کنترل مؤثر بیماری پاختره گندم شدند. نتایج Arias Chavarría et al. (2025) نشان داد میکروکپسوله‌کردن کنیدی‌های *T. longibrachiatum* منجر به بهبود ماندگاری و حفظ توانایی آنتاگونیستی آن در برابر *Fusarium oxysporum* در شرایط آزمایشگاهی گردید.

گیاهان با تغییر مسیر برخی از فرآیندهای متابولیسمی از پیشرفت آلودگی ممانعت کرده و مقاومت در مقابل تنش را افزایش می‌دهند (Shiade et al., 2024). در این رابطه، گونه‌های مختلف *Trichoderma* بیمارگرها را به طور مستقیم با تغییر در میزان هورمون‌ها، افزایش ترکیب‌های ضد میکروبی و سنتز پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی یا به طور غیرمستقیم با تحریک مقاومت سیستمیک تحت تاثیر قرار می‌دهند (Atlagić et al., 2025). یکی از سازوکارهای مهم در مقاومت گیاه در زمان تنش‌های زیستی تجمع و اکسید ترکیبات فنولی و افزایش فعالیت اکسیدانی می‌باشد. با توجه به تضعیف سیستم ایمنی گیاه در حین تنش‌های محیطی، افزایش ترکیبات فنولی و فعالیت اکسیدانی واکنش‌های دفاعی مناسبی را در برابر بیمارگرها به وجود می‌آورند. خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و کاهش گونه‌های اکسیژن فعال از اثرات مهم این ترکیبات محسوب می‌شود (Salunke & Koche, 2023; Xu & Wang, 2025). در این بررسی نیز مقدار فعالیت اکسیدانی در گیاهان تیمار شده با

T. harzianum کپسوله و غیرکپسوله نسبت به گیاهان آلوده افزایش داشت و تجمع فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش مقاومت به بیماری مرگ گیاهچه همراه بوده است.

نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان می دهد استفاده از فناوری کپسوله سازی، پایداری و زنده ماندن *T. harzianum* را در مقایسه با حالت غیرکپسوله به میزان چشمگیری تقویت می کند. پایداری بیشتر نیز با افزایش حضور عامل مهار زیستی می تواند بر خاصیت بازدارندگی بیشتر موثر باشد. لذا کاربرد قارچ کش های زیستی کپسوله شده به عنوان جایگزینی اثربخش برای کاهش وابستگی به آفت کش های شیمیایی خواهد بود.

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

منابع

- رضوی، س.ا.، صانعی، س.ج.، شربت خواری، م.و، و قربانی نصرآبادی، ر. ۱۴۰۰. ردیابی و جداسازی قارچ ها و شبه قارچ های خاک. انتشارات پیک ریحان گرگان، ۳۸۴ صفحه.
- صانعی، س.ج.، و رضوی، س.ا. ۱۳۹۸. تاثیر برخی از گونه های قارچ تریکودرما بر رشد گیاه دارویی ریحان (*Ocimum basilicum* L.) و پاسخ های دفاعی گیاه علیه *Rhizoctonia solan*. کنترل بیولوژیک آفات و بیماری های گیاهی، ۸ (۲): ۳۸-۲۷.
- 10.22059/jbioc.2018.238913.208

REFERENCES

- Abbas, M. M., Ismael, W. H., Mahfouz, A. Y., Daigham, G. E., & Attia, M. S. (2024). Efficacy of endophytic bacteria as promising inducers for enhancing the immune responses in tomato plants and managing *Rhizoctonia* root-rot disease. *Scientific Reports*, 14(1), 1331. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-51000-8>
- Ab Rahman, S. F. S., Singh, E., Pieterse, C. M., & Schenk, P. M. (2018). Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens. *Plant Science*, 267, 102-111. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.11.012>
- Acuña-Jiménez, M., Rosas-García, N. M., López-Meyer, M., Saínez-Hernández, J. C., Mundo-Ocampo, M., & García-Gutiérrez, C. (2015). Pathogenicity of microencapsulated insecticide from *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Fabricius). *Southwestern Entomologist*, 40(3), 531-538. doi.org/10.3958/059.040.0311
- Adzmi, F., Musa, M. H., Siddiqui, Y., Yun, W. M., Hamid, H. A., Abdu, A., & Abiri, R. (2021). Development of alginate-montmorillonite-starch with encapsulated *Trichoderma harzianum* and evaluation of conidia shelf life. doi: [10.17957/IJAB/15.1812](https://doi.org/10.17957/IJAB/15.1812)
- Almeida, F., Rodrigues, M. L., & Coelho, C. (2019). The still underestimated problem of fungal diseases worldwide. *Frontiers in microbiology*, 10, 214. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00214>
- Arias-Chavarría, L. D., Batista-Menezes, D., Orozco-Cayasso, S., Vargas-Martínez, A., Vega-Baudrit, J. R., & Montes de Oca-Vásquez, G. (2025). Evaluation of the viability of microencapsulated *Trichoderma longibrachiatum* conidia as a strategy to prolong the shelf life of the fungus as a biological control agent. *Frontiers in Chemistry*, 12, 1473217. <https://doi.org/10.3389/fchem.2024.1473217>
- Atlagić, K., Cvetić Antić, T., Lukičić, J., Kruščić, K., Živić, M., Unković, N., ... & Todorović, N. V. (2025). Biocontrol Potential of Native *Trichoderma* Strains Toward Soil-Borne Phytopathogenic and Saprotrophic Fungi. *Journal of Fungi*, 11(7), 535. <https://doi.org/10.3390/jof11070535>
- Balla, A., Silini, A., Cherif-Silini, H., Chenari Bouket, A., Alenezi, F. N., & Belbahri, L. (2022). Recent advances in encapsulation techniques of plant growth-promoting microorganisms and their prospects in the sustainable agriculture. *Applied Sciences*, 12(18), 9020.

- <https://doi.org/10.3390/app12189020>
- Bhai, R. (2020). Preservation and long-term storage of *Trichoderma* spp. by sodium alginate encapsulation. *Journal of Plantation Crops*, 48(1), 36-44. <https://doi.org/10.25081/jpc.2020.v48.i1.6215>
- Calabi-Floody, M., Medina, J., Rumpel, C., Condron, L. M., Hernandez, M., Dumont, M., & de La Luz Mora, M. (2018). Smart fertilizers as a strategy for sustainable agriculture. *Advances in Agronomy*, 147, 119-157. <https://doi.org/10.1016/bs.agron.2017.10.003>
- Dennis, C., & Webster, J. (1971a). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57(1), 25-IN3. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80077-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80077-3)
- Dennis, C., & Webster, J. (1971b). Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*: II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*, 57: 41-48. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80078-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80078-5)
- Dennis, C. and Webster, J. 1971c. Antagonistic properties of species – groups of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. *Transactions of the British Mycological Society*. 57: 363-369. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(71\)80050-5](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(71)80050-5)
- Dos Santos, G. F., Locatelli, G. O., Coêlho, D. A., Botelho, P. S., De Amorim, M. S., De Vasconcelos, T. C. L., & Bueno, L. A. (2015). Factorial design, preparation and characterization of new beads formed from alginate, polyphosphate and glycerol gelling solution for microorganism microencapsulation. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 75(2), 345-352. <https://doi.org/10.1007/s10971-015-3705-5>
- Filizola, P. R. B., Luna, M. A. C., de Souza, A. F., Coelho, I. L., Laranjeira, D., & Campos-Takaki, G. M. (2019). Biodiversity and phylogeny of novel *Trichoderma* isolates from mangrove sediments and potential of biocontrol against *Fusarium* strains. *Microbial cell factories*, 18(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1108-y>
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17-25. <https://doi.org/10.1099/mic.0.052274-0>
- Hossain, M. M., Sultana, F., Li, W., Tran, L. S. P., & Mostofa, M. G. (2023). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: Insights into the pathogenomic features of a global pathogen. *Cells*, 12(7), 1063. <https://doi.org/10.3390/cells12071063>
- Huang, W., Wang, Y., Ren, L., Du, C., & Shi, X. (2009). A novel PHBV/HA microsphere releasing system loaded with alendronate. *Materials Science and Engineering: C*, 29(7), 2221-2225. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2009.05.015>
- Jain, A., Sarsaiya, S., Wu, Q., Lu, Y., & Shi, J. (2019). A review of plant leaf fungal diseases and its environment speciation. *Bioengineered*, 10(1), 409-424. <https://doi.org/10.1080/21655979.2019.1649520>
- Jing, H. U., Zuobing, X. I. A. O., Rujun, Z. H. O. U., Shuangshuang, M. A., Mingxi, W. A. N. G., & Zhen, L. I. (2011). Properties of aroma sustained-release cotton fabric with rose fragrance nanocapsule. *Chinese Journal of Chemical Engineering*, 19(3), 523-528. [https://doi.org/10.1016/S1004-9541\(11\)60016-5](https://doi.org/10.1016/S1004-9541(11)60016-5)
- Jurić, S., Đermić, E., Topolovec-Pintarić, S., Bedek, M., & Vinceković, M. (2019). Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores. *Journal of Integrative Agriculture*, 18(11), 2534-2548. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62634-1](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62634-1)
- Karthikeyan, M., Radhika, K., Mathiyazhagan, S., Bhaskaran, R., Samiyappan, R., & Velazhahan, R. (2006). Induction of phenolics and defense-related enzymes in coconut (*Cocos nucifera* L.) roots treated with biocontrol agents. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 367. DOI:[10.1590/S1677-04202006000300003](https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000300003)
- Khedher, S. B., Mejdoub-Trabelsi, B., & Tounsi, S. (2021). Biological potential of *Bacillus subtilis* V26 for the control of *Fusarium* wilt and tuber dry rot on potato caused by *Fusarium* species and the promotion of plant growth. *Biological Control*, 152, 104444.

- <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104444>
- Khalil, A. M. A., Hashem, A. H., & Abdelaziz, A. M. (2019). Occurrence of toxigenic *Penicillium polonicum* in retail green table olives from the Saudi Arabia market. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 21, 101314. DOI:[10.1016/j.bcab.2019.101314](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101314)
- Leong, J. Y., Lam, W. H., Ho, K. W., Voo, W. P., Lee, M. F. X., Lim, H. P., ... & Chan, E. S. (2016). Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. *Particuology*, 24, 44-60. <https://doi.org/10.1016/j.partic.2015.09.004>
- Liu, C. P., & Liu, S. D. (2009). Formulation and characterization of the microencapsulated entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* MA126. *Journal of Microencapsulation*, 26(5), 377-384. <https://doi.org/10.1080/02652040802365455>
- Locatelli, G. O., dos Santos, G. F., Botelho, P. S., Finkler, C. L. L., & Bueno, L. A. (2018). Development of *Trichoderma* sp. formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. *Biological Control*, 117, 21-29. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.08.020>
- Lopes, M. M., de Oliveira-Paiva, C. A., & Farinas, C. S. (2023). Modification of pectin/starch-based beads with additives to improve *Bacillus subtilis* encapsulation for agricultural applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 246, 125646. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125646>
- Lotfalinezhad, E., Taheri, A., Razavi, S. E., & Sanei, S. J. (2023). Preparation of *Bacillus subtilis* capsule formulation and evaluation of its efficacy in controlling damping-off in tomato caused by *Rhizoctonia solani* under greenhouse conditions. *BioControl in Plant Protection*, 10(2), 125-139. Doi: 10.22092/bcpp.2023.363355.344
- Lotfalinezhad, E., Taheri, A., Razavi, S. E., & Sanei, S. J. (2024). Preparation and assessment of alginate-microencapsulated *Trichoderma harzianum* for controlling *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani* on tomato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 259, 129278. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129278>
- Maestrelli, F., Zerrouk, N., Cirri, M., Mennini, N., & Mura, P. (2008). Microspheres for colonic delivery of ketoprofen-hydroxypropyl- β -cyclodextrin complex. *European journal of pharmaceutical sciences*, 34(1), 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.02.001>
- Mancera-López, M. E., Izquierdo-Estévez, W. F., Escalante-Sánchez, A., Ibarra, J. E., & Barrera-Cortés, J. (2019). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia as a method of conidia preservation at room temperature and propagation in submerged culture. *Biocontrol Science and Technology*, 29(2), 107-130. <https://doi.org/10.1080/09583157.2018.1535053>
- Manoharachary, C., Singh, H. B., & Varma, A. (Eds.). (2020). *Trichoderma: agricultural applications and beyond* (pp. 87-112). Cham, Switzerland: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-54758-5>
- Maruyama, C. R., Bilesky-José, N., de Lima, R., & Fraceto, L. F. (2020). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* preserves enzymatic activity and enhances the potential for biological control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 225. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00225>
- Martínez-Cano, B., Mendoza-Meneses, C. J., García-Trejo, J. F., Macías-Bobadilla, G., Aguirre-Becerra, H., Soto-Zarazúa, G. M., & Feregrino-Pérez, A. A. (2022). Review and perspectives of the use of alginate as a polymer matrix for microorganisms applied in agro-industry. *Molecules*, 27(13), 4248. <https://doi.org/10.3390/molecules27134248>
- Mazzola, M., & Freilich, S. (2017). Prospects for biological soilborne disease control: application of indigenous versus synthetic microbiomes. *Phytopathology*, 107(3), 256-263. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-16-0330-RVW>
- Moradi Pour, M., Saberi Riseh, R., & Skorik, Y. A. (2022). Sodium alginate-gelatin nanoformulations for encapsulation of *Bacillus velezensis* and their use for biological control of pistachio gummosis. *Materials*, 15(6), 2114. <https://doi.org/10.3390/ma15062114>
- Muñoz-Celaya, A. L., Ortiz-García, M., Vernon-Carter, E. J., Jauregui-Rincón, J., Galindo, E., & Serrano-Carreón, L. (2012). Spray-drying microencapsulation of *Trichoderma harzianum* conidia in carbohydrate polymers matrices. *Carbohydrate polymers*, 88(4), 1141-1148.

- <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.030>
- Naraghi, L., & Nattaj, M. R. (2022). Efficacy of *Talaromyces flavus* microcapsule in controlling cotton important fungal diseases. *Revista De Gestao Social E Ambiental*, 16(2), e03023-e03023. <https://doi.org/10.24857/rgsa.v16n2-026>
- O'Sullivan, C. A., Belt, K., & Thatcher, L. F. (2021). Tackling control of a cosmopolitan phytopathogen: *Sclerotinia*. *Frontiers in Plant Science*, 12, 707509. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.707509>
- Poletto, F. S., Jäger, E., Cruz, L., Pohlmann, A. R., & Guterres, S. S. (2008). The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Materials Science and Engineering: C*, 28(4), 472-478. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2007.04.015>
- Pour, M. M., Saberi-Riseh, R., Mohammadinejad, R., & Hosseini, A. (2019). Investigating the formulation of alginate-gelatin encapsulated *Pseudomonas fluorescens* (VUPF5 and T17-4 strains) for controlling *Fusarium solani* on potato. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 603-613. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.071>
- Pour, M. M., Hassanisaadi, M., Kennedy, J. F., & Riseh, R. S. (2024). A novel biopolymer technique for encapsulation of *Bacillus velezensis* BV9 into double coating biopolymer made by in alginate and natural gums to biocontrol of wheat take-all disease. *International Journal of Biological Macromolecules*, 257, 128526. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128526>
- Przyklenk, M., Vemmer, M., Hanitzsch, M., & Patel, A. (2017). A bioencapsulation and drying method increases shelf life and efficacy of *Metarhizium brunneum* conidia. *Journal of microencapsulation*, 34(5), 498-512. <https://doi.org/10.1080/02652048.2017.1354941>
- Qi, Q., Fan, C., Wu, H., Sun, L., & Cao, C. (2023). Preparation of *Trichoderma asperellum* microcapsules and biocontrol of cucumber powdery mildew. *Microbiology Spectrum*, 11(3), e05084-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.05084-22>
- Rodrigues, S., Da Costa, A. M. R., & Grenha, A. (2012). Chitosan/carrageenan nanoparticles: Effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. *Carbohydrate polymers*, 89(1), 282-289. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.010>
- Rodrigues, F. J., Cedran, M. F., Bicas, J. L., & Sato, H. H. (2020). Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications—A narrative review. *Food Research International*, 137, 109682. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109682>
- Saberi-Riseh, R., & Moradi-Pour, M. (2021). A novel encapsulation of *Streptomyces fulvissimus* Uts22 by spray drying and its biocontrol efficiency against *Gaeumannomyces graminis*, the causal agent of take-all disease in wheat. *Pest Management Science*, 77(10), 4357-4364. <https://doi.org/10.1002/ps.6469>
- Salunke, P., & Koche, D. (2023). Role of phenolic compounds in plant defense mechanism: an updated review. *Indian Journal of Applied Pure Bio*, 38(3), 1199-1215. ISSN: 0970-2091
- Saharan, G. S., & Mehta, N. (2008). *Sclerotinia diseases of crop plants: biology, ecology and disease management*. Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8408-9>
- Sharma, S., Kaur, I., & Nagpal, A. K. (2024). Pesticides in agriculture: Food security vs. food safety. In *Advances in Food Security and Sustainability* (Vol. 9, pp. 59-73). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.af2s.2024.07.010>
- Shiade, S. R. G., Zand-Silakhoor, A., Fathi, A., Rahimi, R., Minkina, T., Rajput, V. D., ... & Chaudhary, T. (2024). Plant metabolites and signaling pathways in response to biotic and abiotic stresses: Exploring bio stimulant applications. *Plant Stress*, 12, 100454. <https://doi.org/10.1016/j.stress.2024.100454>
- Tu, L., He, Y., Yang, H., Wu, Z., & Yi, L. (2015). Preparation and characterization of alginate-gelatin microencapsulated *Bacillus subtilis* SL-13 by emulsification/internal gelation. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 26(12), 735-749. <https://doi.org/10.1080/09205063.2015.1056075>
- Vemmer, M., & Patel, A. V. (2013). Review of encapsulation methods suitable for microbial biological control agents. *Biological Control*, 67(3), 380-389. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2013.09.003>
- Vessey, J. K. (2003). Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil*, 255(2), 571-

586. <https://doi.org/10.1023/A:1026037216893>
- Vindas-Reyes, E., Chacón-Cerdas, R., & Rivera-Méndez, W. (2024). *Trichoderma* production and encapsulation methods for agricultural applications. *AgriEngineering*, 6(3), 2366-2384. <https://doi.org/10.3390/agriengineering6030138>
- Wu, Z., He, Y., Chen, L., Han, Y., & Li, C. (2014). Characterization of *Raoultella planticola* Rs-2 microcapsule prepared with a blend of alginate and starch and its release behavior. *Carbohydrate Polymers*, 110, 259-267. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.04.011>
- Xu, L., & Wang, X. (2025). A Comprehensive Review of Phenolic Compounds in Horticultural Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(12), 5767. <https://doi.org/10.3390/ijms26125767>