

## بررسی کارایی برخی از ترکیبات آلی فرار *Trichoderma asperellum* در کنترل *Botrytis cinerea* عامل کپک خاکستری توت فرنگی

فرناز جلالی<sup>۱</sup>، دوستمراد ظفیری<sup>۲</sup>✉ و هومن سالاری<sup>۳</sup>

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی دکتری و دانشیار گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان؛ ۳- استادیار گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه رازی، کرمانشاه  
(تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۵؛ تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۵)

### چکیده

این مطالعه، به منظور تعیین کارایی ترکیبات آلی فرار *Trichoderma asperellum* در بازداری از رشد میسلیموم و جوانه‌زنی کنیدیوم *Botrytis cinerea* و کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌ی توت فرنگی صورت گرفت. کاهش معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) در قطر پرگنه، درصد جوانه‌زنی کنیدیوم و طول لوله‌های تندشی *B. cinerea* در تیمارهای در معرض ترکیبات آلی فرار کشت پنج روزه *T. asperellum* نسبت به شاهد مشاهده شد. ترکیبات آلی فرار تولید شده از محیط کشت‌های پنج روزه *T. asperellum*، وقوع و شدت بیماری پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌ی توت فرنگی را نیز به‌میزان معنی‌داری ( $p < 0/01$ ) کاهش دادند. تکنیک ریزاستخراج فاز جامد همراه با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (SPME-GC-MS)، برای بررسی الگوی ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* مورد استفاده قرار گرفت. با مقایسه‌ی طیف جرمی با ترکیبات استاندارد موجود در پایگاه داده‌های کتابخانه‌ی NIST/EPA/NIH (NIST05) و تفسیر الگوی شکست و یون‌های مولکولی مربوطه، ۳۴ ترکیب آلی فرار منفرد شناسایی شدند. از میان این ترکیبات، شش ترکیب شامل ایزوبوتیریک اسید، ۱، ۳، ۵، ۷-سیکلوآکتاترآن، دی‌متیل سولفید، پارا-متا-۶، ۸، دین-۲-ال-استات، فیل اتیل الکل و ۱-بوتانول-۳-متیل-استات، فراوان‌ترین بودند. ترکیبات سنتز شده‌ی ایزوبوتیریک اسید و دی‌متیل سولفید به ترتیب با غلظت بازداری‌دهی ۵۰٪ (IC<sub>50</sub>) ۲۶/۵ و ۱۰ میکرولیتر بر لیتر، بیشترین تأثیر را در بازداری از رشد میسلیموم و جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea* داشتند. واژه‌های کلیدی: ترکیبات آلی فرار، زیست‌سنجی، کنترل زیستی، وقوع و شدت بیماری، IC<sub>50</sub>.

### The efficacy of some volatile organic compounds of *Trichoderma asperellum* in control of *Botrytis cinerea*, the causal agent of strawberry gray mold

F. JALALI<sup>1</sup>, D. ZAFARI<sup>2</sup>✉ and H. SALARI<sup>3</sup>

1, 2. Ph.D. student and Associate Professor of Plant Protection Department, College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran; 3. Assistant Professor of Agronomy and Plant Breeding Department, College of Agriculture and Natural Recourses, Razi University, Kermanshah, Iran

### Abstract

The present study was conducted to determine the efficacy of *Trichoderma asperellum* Volatile Organic Compounds (VOCs) in suppression of mycelial growth and conidial germination of *Botrytis cinerea* and also in control of Botrytis fruit rot of strawberry. Significant reduction ( $P < 0.01$ ) in colony diameter, percent of conidial germination and length of germ tubes of *B. cinerea* was observed in treatments exposed to VOCs of 5 days- old *T. asperellum* compared control. The incidence and severity of Botrytis fruit rot of strawberry was also significantly ( $P < 0.01$ ) reduced by exposure to the VOCs of 5 day old *T. asperellum* cultures. Solid phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS) technique was used to study the VOCs profile of *T. asperellum*. Thirty four single VOCs were identified by comparing the mass spectra of the individual VOC with those for the standard compounds deposited in the database of the NIST/EPA/NIH library (NIST05) and interpretation of their fragmentation pattern and their respective molecular ions. Among them, six compounds including isobutyric acid, 1,3,5,7-cyclooctatetraene, dimethyl sulfide, para-menta-6,8,dien-2-ol-acetate, phenyl ethyl alcohol and 1-butanol, 3-methyl-, acetate were the most abundant. Synthetic compounds of isobutyric acid and dimethyl sulfide were the most effective compounds among these compounds in suppression of mycelial growth and conidial germination of *B. cinerea* with IC<sub>50</sub> of 26.5 and 10  $\mu$ l/ liter, respectively.

**Key words:** Bioassay, Biocontrol, Disease incidence and severity, IC<sub>50</sub>, Volatile organic compounds.

## مقدمه

میوه‌ی توت‌فرنگی (*Fragaria × ananassa* Duch.) ارزش غذایی بالا و اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است. پوسیدگی بوتریتیسی میوه (BFR) یا کپک خاکستری یکی از بیماری‌های مهم توت‌فرنگی در سراسر جهان است. عامل این بیماری، *Botrytis cinerea* Pers. (تلومورف: *Botryotinia fuckeliana* (de Bary) Whetzel)، یک قارچ بیماری‌زای گیاهی هوازاد با شیوه‌ی زندگی نکروتروفی است که به بیش از ۲۰۰ گونه‌ی گیاهی حمله می‌کند (Williamson et al., 2007). این بیمارگر از طریق تولید سموم، انواع اکسیژن فعال<sup>۱</sup> و القای انفجار اکسایشی، توانایی از بین بردن سلول‌های میزبان را دارد و به دلیل دارا بودن مجموعه‌ای از آنزیم‌های تجزیه‌کننده، قادر به تغذیه از بافت‌های گیاهی مختلف است (Choquer et al., 2007). آلودگی در مزرعه، طی دوره‌ی گل‌دهی و به‌شکل بلایت برگ و بلایت شکوفه آغاز شده و در زمان رسیدن میوه، سبب پوسیدگی میوه می‌شود. این بیماری پیش از برداشت هم مهم است، ولی پس از برداشت و در زمان حمل و نقل و ذخیره‌سازی، گسترش و اهمیت بیشتری پیدا می‌کند (Ju et al., 2006). به‌همین دلیل، پوسیدگی بوتریتیسی، یکی از عوامل اصلی محدود کننده‌ی بازار توت‌فرنگی پس از برداشت است (Elad et al., 2007). در ایران، به‌علت عدم اجرای روش‌های نوین برداشت، بسته‌بندی و حمل و نقل، خسارت بیماری پس از برداشت محصول بسیار زیاد بوده و گاهی تا ۲۰ درصد محصول از بین می‌رود (Behdad et al., 2011).

از آنجا که هیچ یک از ارقام توت‌فرنگی در برابر پوسیدگی بوتریتیسی میوه مقاومت زیادی ندارند، کنترل کپک خاکستری توت‌فرنگی بیشتر وابسته به کاربرد قارچ‌کش‌ها در مراحل پیش و پس از برداشت است. با وجود این، افزایش نگرانی‌های زیست‌محیطی در مورد اثر باقی‌مانده‌ی قارچ‌کش‌ها بر کیفیت مواد غذایی، سلامت انسان و محیط زیست و ظهور

فراوان سویه‌های *B. cinerea* مقاوم به قارچ‌کش، کاهش استفاده از قارچ‌کش‌ها را ضروری می‌سازد (Ju et al., 2006). از طرف دیگر، معمولاً میوه‌های تیمار نشده طی مدت ۳ روز پس از برداشت، استانداردهای لازم را از دست می‌دهند و در نتیجه نمی‌توانند به بازار عرضه شوند (Blacharski et al., 2001). در نتیجه، روش‌های کنترل دیگری، مانند کنترل زیستی، ضروری به نظر می‌رسند.

بعضی از گونه‌های مخمرها و قارچ‌های رشته‌ای مانند *Candida Aureobasidium pullulans* (de Bary) G. Arnaud، *Candida intermedia* (Cif. & Ashford) Langeron & Guerra، *Clonostachys rosea* (Link) Schroers، *oleophila* Montrocher، Samuels, Seifert & W. Gams (= *Gliocladium roseum* Bainer)، *Pichia Metschnikowia fructicola* Kurtzman & Droby، *Rhodotorula glutinis* (Fresen.) F. C. guilliermondii Wick.، *Trichoderma* spp. و *Ulocladium atrum* Preuss، Harrison عوامل موثری برای کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌ی توت‌فرنگی تحت شرایط پیش یا پس از برداشت میوه هستند. مکانیسم‌های آنتی‌بیوز، میکوپارازیسم، رقابت برای مواد غذایی و فضا و کنترل اسپورزایی *B. cinerea* برای کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌ی توت‌فرنگی توسط این عوامل پیشنهاد داده شده است (Lima et al., 1997; Sutton et al., 1997; Tronsmo and Dennis, 1997; Boff et al., 2002; Wszelaki and Mitcham, 2003; Karabulut et al., 2004; Langeron and Guerra, 2007; Huang et al., 2011; Bogumil et al., 2013).

در دهه‌های اخیر، تعامل با واسطه‌ی ترکیبات آلی فرار (VOCs)<sup>۲</sup> بین موجودات زنده مورد توجه قرار گرفته است (Liu and Zhang, 2015). موجودات مختلف، مجموعه‌های متنوعی از ترکیبات کربنی در فاز گازی به‌نام ترکیبات آلی فرار با جرم مولکولی کمتر از ۳۰۰ دالتون، قطبیت پایین و فشار بخار بالا تولید می‌کنند. این ترکیبات با توجه به اندازه‌ی کوچک خود قادر به انتشار از طریق اتمسفر و خاک بوده و در

شرایط درون شیشه ای است (Younesi bane, 2009). این نتیجه نشان می‌دهد که *T. asperellum* ممکن است بتواند یک تدخین‌گر زیستی<sup>۲</sup> بالقوه برای کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌ی توت‌فرنگی باشد. بنابراین، هدف از این مطالعه: ۱- تعیین کارایی ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* در کنترل رشد میسلیم و جوانه‌زنی کینیدیوم قارچ *B. cinerea* و کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌ی توت‌فرنگی و ۲- شناسایی ترکیبات آلی فرار منتشر شده توسط این جدایه و بررسی اثر برخی از این ترکیبات در بازداری از رشد *B. cinerea* بود.

### روش بررسی

**جدایه‌های قارچی:** جدایه‌ی *T. asperellum* که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت، با توجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توالی DNA ITS ریبوزومی (ITS1-5.8S) (Nazmi, 2006). جدایه‌ی *B. cinerea* از میوه‌ی آلوده‌ی توت‌فرنگی نمونه‌برداری شده از مزرعه‌ای در روستای نشور وسطی، شهرستان کامیاران، استان کردستان (خرداد ۱۳۹۲) جداسازی شد. این جدایه بر اساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و با توجه به کلید شناسایی قارچ‌های ناقص (Barnett and Hunter, 1998) شناسایی شد.

### بررسی تأثیر ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* بر رشد

**میسلیم *B. cinerea*:** این آزمون زیست‌سنجی بر مبنای روش Huang et al. (2011) همراه با تغییراتی صورت گرفت. پنج تیمار شامل: ۱- شاهد، ۲- مایه‌زنی هم‌زمان<sup>۳</sup> *T. asperellum*، ۳- *T. asperellum*-SI (مایه‌زنی هم‌زمان *T. asperellum* + کربن فعال<sup>۴</sup> (*T. asperellum*-SI+AC)، ۴- مایه‌زنی غیرهم‌زمان<sup>۵</sup> یا کشت پنج روزه‌ی *T. asperellum*-NSI و ۵- مایه‌زنی غیرهم‌زمان *T. asperellum* + کربن فعال (*T. asperellum*-NSI+AC) در نظر گرفته شد. تیمارهای شاهد،

نتیجه پیام‌رسان‌های شیمیایی ایده‌آلی برای دخالت در فرآیندهای مختلف زیستی مانند کنترل زیستی یا ارتباط بین میکروارگانیسم‌ها و محیط زندگی آن‌ها هستند (Morath et al., 2012).

تدخین بیولوژیکی یا "بیوفومیگاسیون"<sup>۱</sup> با ترکیبات آلی فرار باکتری‌ها، گونه‌های استرپتومایسس، قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها و گیاهان عالی برای از بین بردن طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زای انباری و کنترل پوسیدگی‌های قارچی موثر بوده است (Mercier and Jiménez, 2004). کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه توسط ترکیبات آلی فرار *Muscodor albus* انگور ریش بابا (*Vitis vinifera* L) و کیوی (*Actinidia deliciosa* Liang and Ferguson) به وسیله‌ی ترکیبات آلی فرار انگور روباه (*V. labrusca* L) و کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌ی توت‌فرنگی توسط ترکیبات آلی فرار *Streptomyces platensis* F-1 و *C. intermedia* C410 نمونه‌هایی از این شیوه‌ی کنترل می‌باشند (Kulakiotu et al., 2004a; Kulakiotu et al., 2004b; Mercier and Jiménez, 2004; Mercier and Smilanick, 2005; Schnabel and Mercier, 2006; Wan et al., 2008; Huang et al., 2011; Braun et al., 2012).

ترکیبات آلی فرار برخی از گونه‌های تریکودرما، توانایی کنترل بیمارگرهای گیاهی و تحریک رشد گیاهان را دارند (Vinale et al., 2008; Hung et al., 2013). با وجود این، مطالعات کمی در مورد الگوی ترکیبات فرار تریکودرما (Stoppacher et al., 2010; Siddiquee et al., 2012) و یا عملکرد بیولوژیکی مواد فرار این قارچ (Nemčovič et al., 2008; Vinale et al., 2008) منتشر شده است. یونسی بانه گزارش کرد که از میان ۱۰ گونه تریکودرما موجود در کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه بوعلی سینا، (Samuels, Liechfeldt et Nirenberg) *Trichoderma asperellum* موثرترین گونه برای کاهش رشد میسلیم *B. cinerea*، از طریق تولید ترکیبات آلی فرار در

۲- Biofumigant

۳- Simultaneous Inoculation

۴- Active Carbone

۵- Non-Simultaneous inoculation

۱-Biofumigation

ظروف پتری پخش شد. این تشتک‌های پتری روی ظروف پتری حاوی تیمارهای مختلف قرار داده شدند. مجموعه‌های دوظرفی به صورت جداگانه با پارافیلیم مسدود شدند. مشابه آزمایش قبل و برای سنجش اثر دما، تیمارها در سه گروه دمایی مورد بررسی قرار گرفتند: گروه یک به مدت ۴۸ ساعت در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس، گروه دو به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۱۰ درجه‌ی سلسیوس و گروه سه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از این مدت، درصد کنیدیوم‌های جوانه‌زده و طول لوله‌تندشی *B. cinerea* در هر مورد اندازه‌گیری شد. این آزمایش زیست‌سنجی برای هر تیمار سه تکرار داشت و دو بار تکرار شد.

#### بررسی تأثیر ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* بر کنترل

پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌ی توت‌فرنگی: این آزمایش زیست‌سنجی در دسیکاتورهای شیشه‌ای بسته (حجم حدوداً ۵/۸ لیتر) و در دو مرحله انجام شد. در مرحله‌ی اول، کشت‌های پنج روزه‌ی *T. asperellum* روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس آماده شدند. مقدار متوسط بیومس زنده‌ی تریکودرما در هر پتری، پنج روز پس از مایه‌زنی از طریق شمارش کنیدیوم با کمک لام هموسیتمتر محاسبه شد. در ب‌های ظروف پتری برداشته شد و تعداد دو، چهار، شش یا هشت عدد پتری حاوی کشت *T. asperellum* در پایین هر دسیکاتور مطابق روش (Huang et al. 2011) قرار داده شد. برای تیمار شاهد، دو پتری حاوی PDA سترون پایین دسیکاتور قرار داده شد. میوه‌های توت‌فرنگی سالم و رسیده از گیاهان رشد کرده در مزرعه‌ای در روستای نشور وسطی، شهرستان کامیاران، استان کردستان (محل جمع‌آوری بیمارگر) تهیه شد. چهارده عدد میوه‌ی توت‌فرنگی سالم (عاری از هر گونه زخم) با اندازه‌ی تقریباً مشابه به مدت سه ثانیه در اتانول ۷۰٪ ضدعفونی سطحی شده، در آب مقطر استریل شسته و روی کاغذ صافی استریل خشک شدند. سپس به صورت جداگانه با ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کنیدیوم (۱×۱۰<sup>۵</sup>)

شامل پتری‌های حاوی محیط کشت PDA سترون بودند. برای تیمارهای مایه‌زنی هم‌زمان *T. asperellum*، قرصی به قطر پنج میلی‌متر از میسلیم در حال رشد *T. asperellum* هم‌زمان با شروع آزمایش در مرکز پتری‌های حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. برای تیمارهای مایه‌زنی غیرهم‌زمان *T. asperellum*، پنج روز قبل از شروع آزمایش، قرصی به قطر پنج میلی‌متر از میسلیم در حال رشد *T. asperellum* در مرکز PDA موجود در ظروف پتری قرار داده شد و تا زمان شروع آزمایش، کشت‌ها در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. کربن فعال به عنوان جاذب ترکیبات فرار *T. asperellum* در تیمارهای مربوطه به کار رفت. به این ترتیب که در هر مورد یک قطعه گاز استریل روی کل سطح PDA مایه‌زنی شده با *T. asperellum* قرار داده شد و مقدار پنج گرم کربن فعال (Merck، اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ میکرومتر) روی گاز استریل قرار داده شد. ظروف PDA مایه‌زنی شده با قرص میسلیمی پنج میلی‌متری *B. cinerea* (از حاشیه‌ی کشت دو روزه‌ی این قارچ) در مرکز محیط کشت، بالای ظروف تیمار قرار داده شدند تا یک مجموعه‌ی دوظرفی ایجاد شود. تمامی مجموعه‌های دوظرفی به صورت جداگانه با پارافیلیم مسدود شدند. برای سنجش اثر دما بر تیمارها، تیمارها در سه گروه دمایی مورد بررسی قرار گرفتند: گروه یک به مدت شش روز در دمای چهار درجه‌ی سلسیوس، گروه دو به مدت چهار روز در دمای ۱۰ درجه‌ی سلسیوس و گروه سه به مدت سه روز در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پس از این مدت قطر پرگنه *B. cinerea* در هر مورد اندازه‌گیری شد. این آزمایش زیست‌سنجی برای هر تیمار سه تکرار داشت و دو بار تکرار شد.

#### بررسی تأثیر ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* بر

جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea*: پنج تیمار به شرح آزمایش زیست‌سنجی قبل در این مطالعه در نظر گرفته شد. صد میکرولیتر از سوسپانسیون کنیدیوم *B. cinerea* در آب مقطر (۱×۱۰<sup>۵</sup> کنیدیوم/میلی‌لیتر) بر سطح محیط کشت WA در

(۱۶×۱۶×۱ میلی‌متر-ارتفاع×قطر) قرار داده شد. لوله‌های آزمایش با درپوش‌های لاستیکی و پارافیلیم بسته و در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت پنج روز نگهداری شدند. لوله‌های آزمایش یکسان و حاوی محیط کشت تازه‌ی PDA سترون به عنوان شاهد برای ثبت پس‌زمینه‌ی کروماتوگرام (برای ارزیابی مواد نشات گرفته از محیط کشت) مورد استفاده قرار گرفتند.

**ب- آنالیز HS-SPME-GC-MS:** این بخش از آزمایش توسط آقای دکتر بوجار، استادیار بیوشیمی دانشگاه خوارزمی انجام شد. به طور خلاصه، پس از ۱۵ دقیقه متعادل‌سازی لوله‌های شاهد و حاوی کشت فارچ در دمای ۳۰ درجه‌ی سلسیوس، یک فیبر مخصوص میکرواستخراج فاز جامد از جنس پلی دی متیل سیلوکسان (PDMS)<sup>۲</sup> با قطر ۱۰۰ میکرومتر بر روی نگهدارنده (Supelco) تا ۲۱ میلی‌متر و به مدت ۳۰ دقیقه درون لوله‌های آزمایش به صورت کاملاً ثابت قرار گرفت. با این روش ترکیبات آلی فرار از فضای فوقانی کشت *T. asperellum* یا محیط کشت سترون استخراج و تغلیظ شدند. پس از آن، فیبر از لوله‌های آزمایش خارج شد و به منظور جداسازی ترکیبات آلی فرار داخل درگاه تزریق دستگاه کروماتوگرافی گازی (VARIAN CP3800) با یک ستون کاپیلاری (VARIAN CP SIL8 CB) به طول ۵۰ متر، قطر داخلی ۰/۳۲ میلی‌متر، ضخامت فیلم ۰/۲۵ میکرومتر و متصل به آشکارساز طیف‌سنج جرمی (VARIAN Saturn 2200) قرار گرفت. هلیوم (با خلوص بسیار بالا) به عنوان گاز حامل به کار رفت و با سرعت جریان ۱/۲ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم شد. برنامه‌ریزی و تنظیمات دستگاه کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنج جرمی مطابق (Stoppacher et al. (2010) صورت گرفت. شناسایی ترکیبات آلی فرار احتمالی با مقایسه‌ی طیف جرمی آن‌ها با ترکیبات استاندارد موجود در پایگاه داده‌های کتابخانه‌ی موسسه ملی استاندارد و فن‌آوری<sup>۳</sup>

کنیدیوم / میلی‌لیتر) *B. cinerea* روی سطح میوه‌ی توت‌فرنگی مایه‌زنی شدند. این میوه‌ها روی صفحه‌ی سرامیکی متخلخل بالای تشتک‌های پتری بدون درب حاوی کشت *T. asperellum* یا PDA سترون موجود در دسیکاتور قرار داده شدند. درب دسیکاتورها گذاشته و با پارافیلیم مسدود شد و در انکوباتور با دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس تحت یک دوره‌ی نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت هشت روز قرار داده شدند. در هر دسیکاتور میوه‌های توت‌فرنگی که علائم پوسیدگی نرم و کپک خاکستری نشان می‌دادند، به صورت جداگانه برای سنجش شدت بیماری با استفاده از یک مقیاس صفر تا هشت نمره‌ای، مطابق جدول ۱ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

مرحله‌ی دوم آزمایش با تکرار آزمایش قبل با سه تیمار و به این ترتیب صورت گرفت که در پایین یکی از دسیکاتورها، هشت پتری حاوی کشت پنج روزه‌ی *T. asperellum* و در یکی دیگر از دسیکاتورها هشت پتری حاوی کشت پنج روزه‌ی *T. asperellum* همراه با کرین فعال قرار داده شد. برای تیمار شاهد نیز هشت پتری حاوی PDA سترون در یک دسیکاتور قرار گرفت. مایه‌زنی میوه‌ها، شرایط نگهداری دسیکاتورها و ارزیابی نتایج مشابه مرحله اول آزمایش بود.

#### بررسی الگوی ترکیبات آلی فرار جدایه‌ی *T. asperellum*

با استفاده از کروماتوگرافی گازی- طیف‌سنجی جرمی: آماده‌سازی نمونه و آنالیز فضای فوقانی نمونه به‌وسیله‌ی تکنیک ریزاستخراج فاز جامد همراه با کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی<sup>۱</sup> (HS-SPME-GC-MS) مطابق روش (Stoppacher et al. (2010) همراه با تغییرات اندکی به شرح زیر صورت گرفت:

#### الف- آماده‌سازی کشت *T. asperellum*: یک حلقه‌ی پنج

میلی‌متری از میسلیم *T. asperellum* بر مرکز سطح اریب محیط کشت شامل پنج میلی‌لیتر PDA در لوله‌های آزمایش

<sup>۲</sup>- Polydimethylsiloxane

<sup>۳</sup>-National Institute of Standards and Technology

<sup>۱</sup>-Head Space-Solid Phase Micro Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry

ظرفی با استفاده از دو لایه پارافیلیم برای ایجاد یک محفظه‌ی بسته به حجم ۱۸۰ سانتی‌متر مکعب مسدود شدند. برای شاهد، حجم ۱۰۰ میکرولیتر اتانول خالص روی کاغذ صافی درون پتری قرار داده شد و پتری PDA مایه‌زنی شده با حلقه‌ی میسلیم *B. cinerea* بالای این ظرف قرار گرفت. این مجموعه دوظرفی نیز با استفاده از دو لایه پارافیلیم بسته شد. سه تکرار برای هر تیمار در نظر گرفته شد. مجموعه‌های دوظرفی به مدت سه روز در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. قطر پرگنه‌ی *B. cinerea* در هر مجموعه اندازه‌گیری شد. درصد مهار رشد میسلیم *B. cinerea* به وسیله‌ی هر ترکیب فرار در هر رقت بر اساس تفاوت قطر پرگنه بین شاهد و تیمار محاسبه شد. غلظت مورد نیاز برای ۵۰ درصد مهار رشد میسلیم (IC<sub>50</sub>)<sup>۳</sup> به صورت میکرولیتر بر لیتر بیان می‌شود، بر مبنای داده‌های مربوط به درصد کنترل و غلظت ترکیب فرار به‌کار رفته در هر مورد محاسبه گردید.

برای آزمایش مهار جوانه‌زنی کنیدیوم، ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کنیدیوم (۱×۱۰<sup>۵</sup> کنیدیوم/ میلی‌لیتر) *B. cinerea* روی سطح محیط کشت WA در ظروف پتری (به قطر ۹ سانتی‌متر) پخش شد. پس از برداشتن درب پتری‌ها، پتری‌های WA مایه‌زنی شده با کنیدیوم *B. cinerea* بالای پتری حاوی اتانول خالص (شاهد) و یا هر یک از رقت‌های ترکیبات فرار رقیق شده در اتانول خالص قرار گرفت. مجموعه پتری‌های دوتایی با استفاده از پارافیلیم مسدود شدند. هر تیمار سه تکرار داشت. پتری‌ها در دمای ۲۰ درجه‌ی سلسیوس به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شدند. درصد جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea* با انتخاب چند ناحیه و شمارش تصادفی حداقل ۱۵۰ کنیدیوم در هر پتری زیر میکروسکوپ نوری تعیین شد. هر کنیدیوم، زمانی جوانه‌زده در نظر گرفته می‌شد که طول لوله‌ی تندش آن برابر یا بیشتر از قطر کنیدیوم باشد. درصد مهار جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea* توسط هر ترکیب فرار، بر مبنای تفاوت درصد کنیدیوم جوانه‌زده در پتری شاهد و پتری حاوی آن

(وایلی ۷)<sup>۱</sup> و تفسیر الگوی شکست و یون‌های مولکولی مربوطه انجام شد. آنالیز ترکیبات آلی فرار در نمونه‌ی کشت *T. asperellum* و محیط کشت سترون، دو بار تکرار شد. ترکیب‌های مشترک شناسایی شده در کشت *T. asperellum* و محیط کشت سترون از فهرست ترکیب‌های نهایی حذف شدند. لازم به ذکر است که ترکیباتی که به این صورت مورد شناسایی قرار می‌گیرند به صورت ترکیبات شناسایی شده به صورت آزمایشی (TICs)<sup>۲</sup> گزارش می‌شوند.

### بررسی تأثیر ترکیبات آلی فرار منتخب *T. asperellum*

بر رشد *B. cinerea*: شش ترکیب که در الگوی ترکیبات آلی فرار تولید شده توسط *T. asperellum* فراوان‌ترین بودند، برای بررسی اثرات آن‌ها بر بیمارگر *B. cinerea* انتخاب شدند (جدول ۲). محصولات سنتز شده‌ی این ترکیبات از شرکت شیمی راد آروین خریداری و به صورت جداگانه برای مهار رشد میسلیم و جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea* مطابق روش Haung et al. (2011) مورد بررسی قرار گرفتند.

در آزمایش مهار رشد میسلیم، یک حلقه‌ی میسلیمی از حاشیه‌ی پرگنه‌ی کشت دو روزه‌ی *B. cinerea* روی محیط کشت PDA جداسازی و در پتری دیگری (به قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت PDA مایه‌زنی شده هم‌زمان، یک تکه کاغذ صافی (با ابعاد ۱/۵×۱/۵ سانتی‌متر) در مرکز پتری‌های دیگر حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. ترکیبات فرار (جدول ۲) به‌صورت جداگانه به میزان ۰/۱، ۰/۵، ۱، ۲/۵، ۵، ۱۰ و ۵۰٪ (حجم/حجم) با اتانول خالص رقیق شدند. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از محلول رقیق شده‌ی هر یک از این ترکیبات روی قطعه کاغذ صافی موجود در پتری قرار داده شد. با برداشتن درب پتری‌ها، پتری‌های PDA مایه‌زنی شده با میسلیم *B. cinerea* بالای پتری‌های حاوی ترکیبات فرار مورد بررسی قرار گرفتند. مجموعه‌های دو

۱-Mass Spectral Database (Wiley 7)

۲-Tentatively Identified Compounds

۳-Inhibition Concentration 50%

ترکیب فرار به کار رفته در مجموعه پتری‌های دوتایی به دست آمد.

ترکیب محاسبه شد. مقدار IC50 برای هر ترکیب فرار، بر مبنای داده‌های مربوط به درصد مهار جوانه‌زنی کنیدیوم و غلظت

جدول ۱- مقیاس صفر تا هشت نمره‌ای برای ارزیابی شدت بیماری پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌های توت‌فرنگی (Huang *et al.*, 2011)

Table 1. A scale of 0 to 8 to rate disease severity of strawberry botrytis fruit rot (Huang *et al.*, 2010)

Rate of Disease Severity	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Percent of the area rotted	0 (Healthy fruit)	<12.5	12.6 to 25.0	25.1 to 37.5	37.6 to 50.0	50.1 to 62.5	62.6 to 75.0	75.1 to 87.5	87.6 to 100%

جدول ۲- ترکیبات آلی فرار مورد استفاده در این مطالعه برای آزمایش فعالیت ضدقارچی در برابر *Botrytis cinerea*

Table 2. Volatile organic compounds used for testing antifungal activity against *Botrytis cinerea* in this study

Compound	Synonyms	Code	Grade/Purity (%)
1-Butanol, 3-methyl-, acetate	Isoamyl alcohol, Isopentyl alcohol	309435 Sigma-Aldrich	anhydrous, ≥99%
1,3,5,7-Cyclooctatetraene		138924 Aldrich	98%
Dimethyl sulfide	DMS, Methyl sulfide	274380 Sigma-Aldrich	anhydrous, ≥99.0%
Isobutyric acid	2-Methylpropionic acid	I1754 Sigma	99%
Para-menta-6,8,dien-2-ol-acetate	Carvyl acetate	W225002 Aldrich	Food Grade, ≥98%
Phenyl ethyl alcohol	β-PEA, 2-Phenylethanol, 2-Phenylethyl alcohol, Benzyl carbinol, PEA	W285811 Aldrich	Food Grade, ≥99%

ترکیبات آلی فرار حاصل از مایه‌زنی هم‌زمان *T. asperellum* معنی‌دار بود ( $p < 0.01$ ). اثر بازدارنده‌ی تیمار ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* بر رشد *B. cinerea* در صورت استفاده از کربن فعال خنثی می‌شد (شکل ۱ A).

#### بازداری از جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea* توسط

ترکیبات آلی فرار *T. asperellum*: درصد جوانه‌زنی و طول لوله‌تندشی کنیدیوم‌های *B. cinerea* در پتری‌های در معرض ترکیبات آلی فرار کشت پنج‌روزه‌ی *T. asperellum* در همه‌ی دماهای مورد بررسی کاهش می‌یافت. این کاهش، در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار با ترکیبات آلی فرار حاصل از مایه‌زنی هم‌زمان *T. asperellum* معنی‌دار بود ( $p < 0.01$ ). تیمار ترکیبات آلی فرار حاصل از مایه‌زنی هم‌زمان *T. asperellum* نیز در دماهای ۱۰ و ۲۰ درجه‌ی سلسیوس طول لوله‌تندشی کنیدیوم‌های *B. cinerea* را نسبت به شاهد کاهش داد، ولی بر درصد جوانه‌زنی تأثیری نداشت ( $p > 0.01$ ). کاربرد کربن فعال اثر بازدارندگی را تا حد زیادی خنثی می‌کرد (شکل B1 و C). نوع، نسبت و غلظت ترکیبات آلی فرار باتوجه به گونه‌ی تولیدکننده و سن آن، نوع محیط کشت و شرایط محیطی تغییر پیدا می‌کند (Wheatley *et al.*, 1997).

#### تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها: آزمایش‌ها در قالب طرح

کاملاً تصادفی انجام شدند. برای تجزیه‌های آماری مربوط به این پژوهش از نرم‌افزارهای میکروسافت اکسل<sup>۱</sup> (۲۰۱۰)، SAS (نسخه‌ی ۹/۱) و SPSS (نسخه‌ی ۱۷) استفاده شد. تجزیه‌ی واریانس و مقایسه‌ی میانگین داده‌های مربوط به قطر پرگنه، درصد کنیدیوم جوانه‌زده، طول لوله‌تندشی، وقوع بیماری و شدت بیماری پس از ورود به اکسل با کمک نرم‌افزار SAS و آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. تعیین IC50 با کمک نرم‌افزار SPSS و رگرسیون پروبیت<sup>۲</sup> در سطح احتمال ۹۵٪ صورت گرفت.

#### نتیجه و بحث

##### بازداری از رشد میسلیوم *B. cinerea* توسط ترکیبات

آلی فرار *T. asperellum*: متوسط قطر پرگنه‌ی *B. cinerea* در تیمارهای در معرض ترکیبات آلی فرار کشت پنج‌روزه‌ی *T. asperellum* در همه‌ی دماهای مورد بررسی کاهش می‌یافت. این کاهش، در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار با

۱-Microsoft Excel

۲-Probit regression

فعال از بین رفت (شکل ۲ و ۴). نتیجه‌ی مشابهی در نتیجه‌ی کاربرد ترکیبات آلی فرار مخمر *Candida intermedia* برای بازداری از رشد *B. cinerea* روی میوه‌ی توت‌فرنگی مشاهده شده بود (Huang et al., 2011). در نتیجه ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* نیز ممکن است نوید بخش ترکیب تدخینی زیستی نوینی برای کنترل پوسیدگی بوتریتیسی پس از برداشت میوه‌ی توت‌فرنگی باشند.

#### الگوی ترکیبات آلی فرار *T. asperellum*: با حذف

ترکیبات مشترک ردیابی شده در نمونه‌ی شاهد و مقایسه‌ی طیف جرمی هر ترکیب با ترکیبات استاندارد موجود در پایگاه داده‌ها و تفسیر الگوی شکست و یون‌های مولکولی مربوطه، مجموعاً ۳۴ ترکیب آلی فرار احتمالی با بیش از ۷۰٪ مطابقت، توسط آنالیز GC-MS از کشت پنج روزه‌ی *T. asperellum* تشخیص داده شدند. از آنجاکه شناسایی تنها از طریق تفسیر الگوی شکست در کتابخانه‌های دستگاه GC-MS با احتمال خطای ۳۰٪ صورت گرفت و از مقایسه زمان‌های بازداری نرمال آلکان‌ها استفاده نشد، ممکن است برخی از ترکیبات به درستی تشخیص داده نشده باشند. با این حال ترکیبات ذکر شده در جدول متعلق به کلاس ترکیبات آلی اترها، استرها، الکل‌ها، آلکن‌ها، آلکان‌ها، آلکین‌ها، اسیدهای آلی، کتون‌ها، آلدئید فوران‌ها، مونوترپن‌ها، سزکوئی ترپن‌ها، پیرازین‌ها و ترکیبات گوگردی آلی بودند. فراوان‌ترین ترکیب در این الگو، ترکیب آلی ایزوبوتیریک اسید با مساحت نسبی پیک ۱۱/۲۶ درصد بود. بعد از این ترکیب، به ترتیب ترکیب‌های ۱، ۳، ۵، ۷-سیکلواکتاترائن، دی متیل سولفید، پارا-متا-۶، ۸، دین-۲-ال-استات، فیل اتیل الکل و ۱-بوتانول-۳-متیل-استات بیشترین فراوانی تولید را داشتند (مساحت نسبی پیک بیش از ۵٪) (جدول ۳). برای شناسایی دقیق‌تر ترکیبات آلی پیشنهاد می‌شود که در ادامه‌ی تحقیقات از روش اندیس بازداری برنامه‌ریزی دمایی (LTPRI) استفاده گردد و همچنین جهت استخراج بهتر ترکیبات فرار، جاذب بهینه برای ریز استخراج

نتایج مطالعه‌ی ما نیز، اهمیت سن کشت قارچی و دما را به عنوان دو فاکتور مهم برای اثرگذاری ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* بر بازداری از رشد *B. cinerea* تایید می‌کند. مایه‌زنی هم‌زمان این قارچ نتوانست درصد جوانه‌زنی کنیدیوم بیمارگر را در هیچ یک از دماهای مورد بررسی کاهش دهد. کاهش طول لوله‌تندشی کنیدیوم‌های *B. cinerea* در حضور ترکیبات آلی فرار منتشر شده از مایه‌زنی هم‌زمان *T. asperellum* نسبت به تیمارهای شاهد، تنها در دمای ۱۰ و ۲۰ درجه‌ی سلسیوس رخ داد. باین وجود، میزان بازداری از رشد بیمارگر در این تیمار نسبت به کشت پنج روزه‌ی *T. asperellum* به میزان معنی‌داری در سطح پایین‌تری قرار داشت. چنین نتیجه‌ای می‌تواند با یافته‌های Stoppacher et al. (2010) قابل توجیه باشد که گزارش کردند در *T. atroviride* تولید بیشتر ترکیبات آلی فرار هم‌زمان با شروع کنیدیوم‌زایی (بین ۷۸ تا ۱۰۲ ساعت پس از مایه‌زنی و در دمای مناسب رشد) به اوج خود می‌رسد و بعد از روز پنجم به تدریج کاهش پیدا می‌کند.

#### تأثیر ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* بر کنترل

پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌ی توت‌فرنگی: هشت روز پس از شروع آزمایش، همه‌ی میوه‌های توت‌فرنگی در معرض تیمار شاهد (PDA سترون) علائم پوسیدگی نرم و کپک خاکستری نشان دادند. شدت علائم در بیشتر این میوه‌ها به نمره‌ی ۸ رسید.

در حضور ترکیبات آلی فرار منتشر شده از کشت‌های پنج روزه *T. asperellum* و با افزایش تعداد پتری‌ها به شش و هشت پتری، به ترتیب درصد وقوع بیماری به ۸۶ و ۳۶ و نمره‌ی شدت بیماری به ۴/۹۲ و ۲/۷۸ کاهش یافت. این کاهش، در مقایسه با شاهد معنی‌دار ( $p < 0/01$ ) بود (شکل ۲ و شکل ۳). پنج روز پس از مایه‌زنی، مقدار بیومس زنده‌ی *T. asperellum* به طور میانگین  $2/5 \times 10^6$  کنیدیوم در میلی‌لیتر در هر پتری محاسبه گردید. اثر بازدارنده‌ی ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* بر گسترش بیماری در نتیجه‌ی کاربرد کربن



توسط بقیه‌ی ترکیبات، غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر مورد نیاز بود (جدول ۴).

با توجه به اینکه ترکیب  $\alpha$ -آمینوایزوبوتیریک اسید به عنوان پیش‌ساز پپتیدهای ضد میکروبی (Wallace and Whitmore, 2004) در گونه‌های تریکودرما شناخته شده است، ممکن است بتواند نقش ایزوبوتیریک اسید را در بازداری از رشد میسلیم *B. cinerea* توجیه کند. این ماده پیش از این به عنوان یکی از دو ماده‌ی اصلی در الگوی ترکیبات فرار *Muscodor albus* شناخته شده بود و اثر آن در بازداری از رشد چند قارچ مولد مایکوتوکسین به اثبات رسیده است (Mercier et al., 2005).

فاز جامد انتخاب شود و پس از معتبر سازی آن، شناسایی ترکیبات صورت پذیرد.

### فعالیت ضد قارچی محصولات سنتز شده‌ی ترکیبات

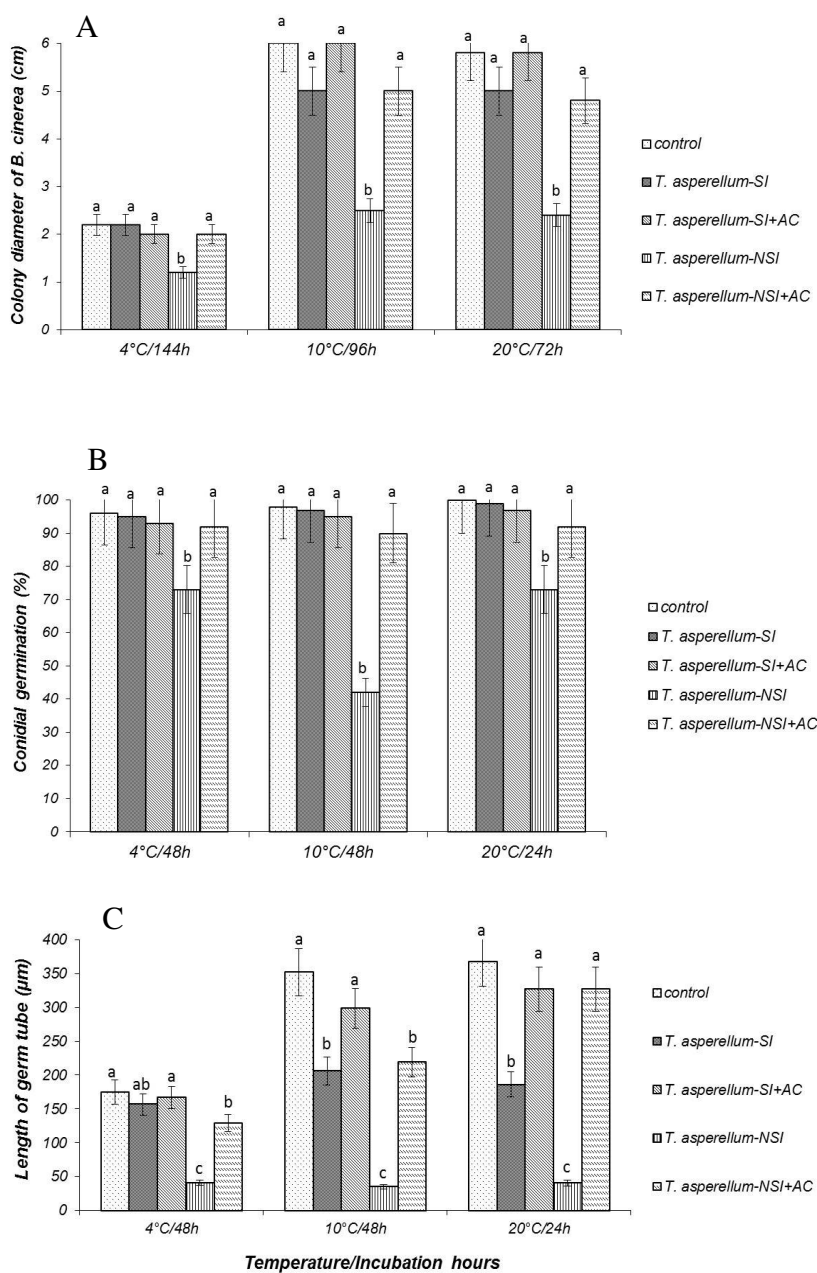
آلی فرار منتخب *T. asperellum* از میان محصولات سنتز شده‌ی شش ترکیب با بیشترین فراوانی تولید توسط *T. asperellum*، دو ترکیب ایزوبوتیریک اسید و دی متیل سولفید، با  $IC_{50}$  ۲۶/۵ و ۱۰ میکرولیتر بر لیتر، به ترتیب بیشترین تأثیر را در بازداری از رشد میسلیم و جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea* داشتند. ترکیب ۱، ۳، ۵، ۷-سیکلوآکتاترئان از نظر بازداری از رشد میسلیم *B. cinerea* در جایگاه بعدی قرار داشت. برای بازداری از رشد *B. cinerea*

جدول ۳- ترکیبات آلی فرار منتشر شده از *Trichoderma asperellum*

Table 3. VOCs released from *Trichoderma asperellum*

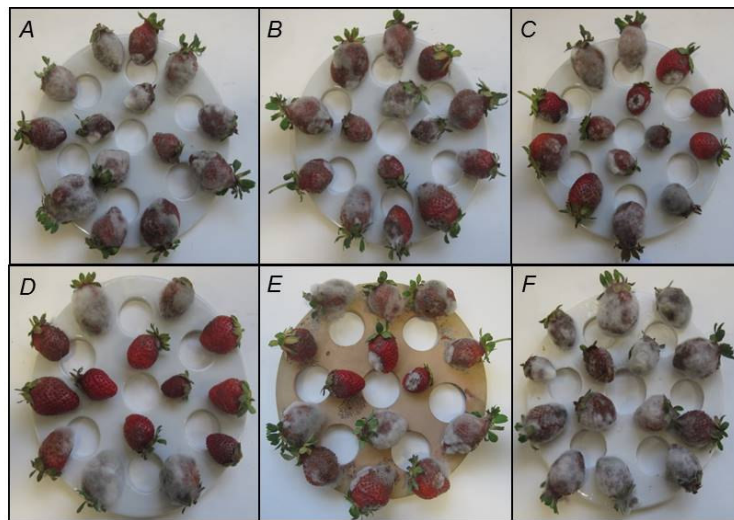
Pick no.	RT (Min)	Possible Compound (TICs)	RA(%)	MW (Da)
1	2.10	1-hexanol	0.81	102
2	2.55	2-hexanone	1.19	100
3	3.68	1-Tridecyne	0.92	180
4	4.01	2-pentanol	1.44	88
5	4.73	3-Octanol	1.07	144
6	4.95	3-Octyne	0.85	110
7	5.26	1-Octen-3-ol	2.63	128
8	5.66	Dimethyl sulfide	8.89	62
9	6.43	2-methoxy propene	1.07	72
10	6.72	Alpha-pinene	3.50	136
11	7.21	Sabinene	0.84	136
12	7.64	1,3,4-Hexatriene,3-methoxy	1.43	110
13	7.82	1,8-cineole	1.54	154
14	7.95	Isobutyric acid	11.26	88
15	8.04	2-hydroxy ethyl propionate	2.16	118
16	8.36	Ethyl acetate	1.28	88
17	8.53	3-ethyl-heptane	2.69	120
18	9.26	Propanoic acid ethylester	1.86	102
19	11.40	Ethyl pentanoate	1.13	130
20	12.51	Dimethyl disulfide	1.45	94
21	16.43	1-Butanol-3-methyl-acetate	5.10	130
22	17.21	2-Methyl furan	1.06	82
23	17.46	Isopentyl ether	1.73	158
24	17.81	1,3,5,7-cycloocta tetraene	9.25	104
25	19.21	Para-menta-6,8,dien-2-ol-acetate	5.92	194
26	20.63	2-hydroxyethyl octanoate	1.34	188
27	21.53	Pentanoic acid,4-methyl-ethyl ester	1.10	144
28	22.40	Alpha-farnesene	1.03	204
29	24.11	10,12-octadecadiynoic acid	1.65	276
30	27.4	Dihydro carveol acetate	2.95	196
31	28.1	2,6-diethyl Pyrazin	1.84	136
32	30.31	Caryophyllen oxide	1.05	220
33	31.5	Phenyl ethyl alcohol	6.48	122
34	33.1	2-methyl-isoborneol	1.50	169

RT: زمان نگهداری در کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی؛ TICs: ترکیبات شناسایی شده به صورت آزمایشی؛ RA: مساحت نسبی پیک؛ MW: وزن مولکولی  
RT: Retention time in gas chromatography-mass spectrometry; TICs: Tentatively Identified Compounds; RA: relative peak area; MW: molecular weight.



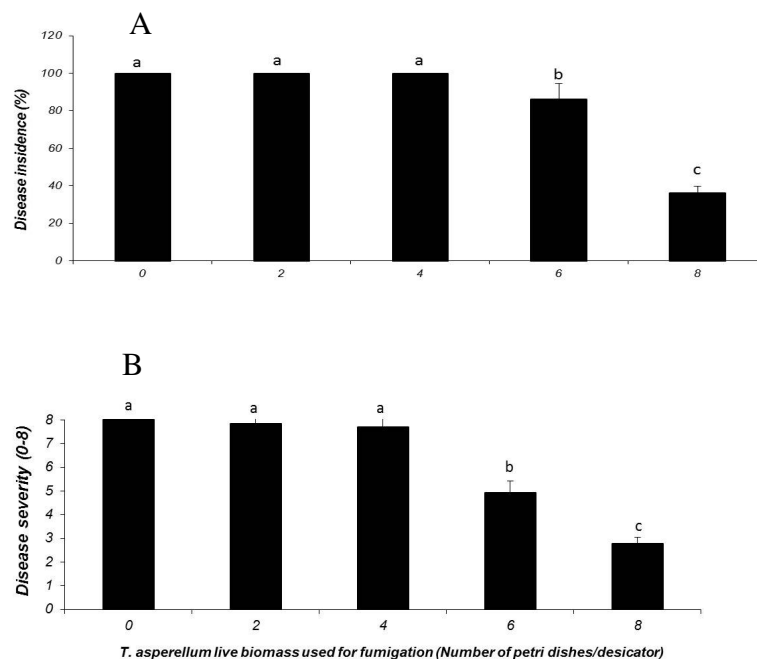
شکل ۱- اثر ترکیبات آلی فرار تولید شده توسط کشت هم‌زمان *Trichoderma asperellum* (*T. asperellum-SI*)، کشت هم‌زمان *T. asperellum* + کربن فعال (*T. asperellum-SI+AC*)، کشت پنج روزه *T. asperellum-NSI* و کشت پنج روزه *T. asperellum* + کربن فعال (*T. asperellum-NSI+AC*) بر A- قطر پرگنه، B- جوانه‌زنی کنیدیوم و C- طول لوله تندشی *Botrytis cinerea* تحت دماهای مختلف. مقادیر میانگین تیمارهای مختلف در هر دما با حروف متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

**Fig. 1.** Effects of the VOCs produced by *T. asperellum-SI*, *T. asperellum-SI+AC*, *T. asperellum-NSI* and *T. asperellum-NSI+AC* treatments on A- colony diameters, B- conidial germination and C- germ-tube extension of *Botrytis cinerea* under different temperatures. Mean values for different treatments at each temperature labeled with different letters indicate significant difference ( $P < 0.01$ ) according to Duncan's multiple range test.



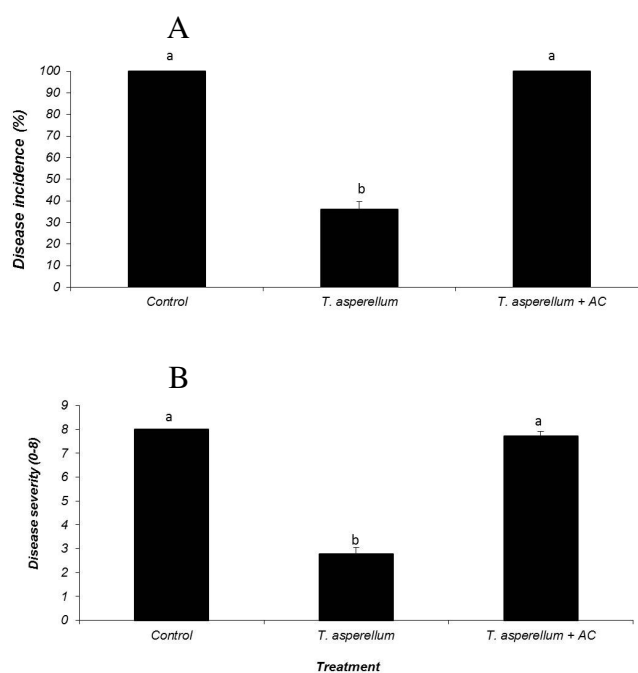
شکل ۲- اثر ترکیبات آلی فرار *Trichoderma asperellum* بر کاهش وقوع و شدت پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌ی توت‌فرنگی (۲۰ درجه‌ی سلسیوس، هشت روز). مقدار بیومس زنده‌ی *T. asperellum* بر مبنای تعداد پتری در هر دسیکاتور به صورت A- دو پتری، B- چهار پتری، C- شش پتری، D- هشت پتری، E- هشت پتری + کربن فعال و F- هشت پتری حاوی PDA سترون یا شاهد بود.

**Fig. 2.** Effect of the VOCs of *Trichoderma asperellum* on reduction of incidence and severity of strawberry botrytis fruit rot (20°C, 8 days). Amount of *T. asperellum* live biomass (number of petri dishes per desiccator) was as follow: A- two petri dishes, B- four petri dishes, C- six petri dishes, D- eight petri dishes, E- eight petri dishes+active carbon and F- eight petri dishes including sterile PDA (control).



شکل ۳- اثر ترکیبات آلی فرار *Trichoderma asperellum* بر A- کاهش وقوع و B- شدت پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌ی توت‌فرنگی (۲۰ درجه‌ی سلسیوس، ۸ روز). مقادیر میانگین تیمارهای مختلف در هر دما با حروف متفاوت، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

**Fig. 3.** Effect of the VOCs of *Trichoderma asperellum* on reduction of A- incidence and B- severity of strawberry botrytis fruit rot (20°C, 8 days). Mean values for different treatments at each temperature labeled with different letters indicate significant difference ( $P < 0.01$ ) according to Duncan's multiple range test.



شکل ۴- اثر ترکیبات آلی فرار *Trichoderma asperellum* و ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* همراه با کربن فعال بر A- کاهش وقوع و B- شدت پوسیدگی بوتریتیسی میوه توت‌فرنگی (۲۰ درجه‌ی سلسیوس، ۸ روز). مقادیر میانگین تیمارهای مختلف در هر دما با حروف متفاوت، نشان‌دهنده‌ی تفاوت معنی‌دار ( $p < 0.01$ ) بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

**Fig. 4.** Effect of the VOCs of *Trichoderma asperellum* and the VOCs of *T. asperellum* plus activated carbon (AC) on reduction of A- incidence and B- severity of strawberry botrytis fruit rot (20°C, 8 days). Mean values for different treatments at each temperature labeled with different letters indicate significant difference ( $P < 0.01$ ) according to Duncan's multiple range test.

جدول ۴- مقادیر غلظت بازداری ۵۰٪ ترکیبات آلی فرار سنتز شده برای بازداری از رشد میسلیم و جوانه‌زنی کنیدیوم *Botrytis cinerea*

**Table 4.** Values of the 50% inhibition concentration (IC50) of the synthetic volatile organic compounds for suppression of mycelial growth and conidial germination of *Botrytis cinerea*

Compound	IC50 value (mean)	
	(μl/liter)	
	Mycelial Growth	Conidial Germination
1-Butanol, 3-methyl-acetate	143.55	154.33
1,3,5,7-Cyclooctatetraene	89.68	147.77
Dimethyl sulfide	73.74	10.01
Isobutyric acid	26.51	94.27
Para-menta-6,8,dien-2-ol-acetate	433.88	118.27
Phenyl ethyl alcohol	360.72	553.35

(Mauriello *et al.*, 2004)، ولی گزارشی از بررسی نقش بیولوژیکی آن در دست نیست. ترکیب پارا-متا-۶، ۸-دین-۲-ال-استات ترکیب جدیدی محسوب می‌شود که گزارش قبلی در مورد منشا میکروبی برای آن وجود ندارد. سه ترکیب دیگر از مخمر *Candida intermedia* گزارش شده بودند و

با توجه به نتایج مثبت حاصل از کاربرد این ترکیب منفرد برای بازداری از رشد بیمارگر، آزمایش‌های تکمیلی با استفاده از ترکیب استاندارد ماده برای کمیت سنجی تولید آن توسط کشت‌های *T. asperellum* قابل توصیه است. ترکیب دی متیل سولفید از گونه‌های متنوعی از *Tuber spp.* گزارش شده بود

## References

- BARNETT, H. L. and B. B. HUNTER, 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4<sup>ed</sup>. APS Press, Saint Paul, Minnesota, USA.
- BEHDAD, M., N. ETEMADI, E. BEHDAD and H. ZEINALI, 2011. The Study of Antifungal *Satureja hortensis* on the *Botrytis cinerea* and Effect on Strawberry Postharvest Physiology. In: National Conference on New Ideas in Agriculture, 5-16 Febuary, Khorasgan Branch, Islamic Azad University of Isfahan, Iran. (In Persian with English summary).
- BLACHARSKI, R. W., J. A. BARTZ, C. L. XIAO and D. E. LEGARD, 2001. Control of postharvest botrytis fruit rot with pre-harvest fungicide applications in annual strawberry. *Plant Disease*, 85: 597-602.
- BOFF, P., J. KÖHL, M. JANSEN, P. J. F. M. HORSTEN, C. LOMBAERS-VAN DER PLAS and M. GERLAGH, 2002. Biological control of gray mold with *Ulocladium atrum* in annual strawberry crops. *Plant Disease*, 86: 220-224.
- BOGUMIL, A., L. S. PASZT, A. LISEK, P. TRZCIŃSKI, and H. HARBUZOV, 2013. Identification of new *Trichoderma* strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. *Folia Horticulturae*, 25: 123-132.
- BRAUN, G., M. VAILATI, R. PRANGE and E. BEVIS, 2012. *Muscodor albus* Volatiles Control Toxicogenic Fungi under Controlled Atmosphere (CA) Storage Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 15848-15858.
- CHOQUER, M., E. FOURNIER, C. KUNZ, C. LEVIS, J. M. PRADIER, A. SIMON and M. VIAUD, 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. *FEMS Microbiology Letters*, 227: 1-10.
- ELAD, Y., B. WILLIAMSON, P. TUDZYNSKI and N. DELEN, 2007. *Botrytis* spp. and Diseases They Cause in Agricultural Systems – An Introduction, In: ELAD, Y., WILLIAMSON, B., TUDZYNSKI, P. and DELEN, N. (eds.) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, Dordrecht, the Netherlands. pp. 1-16.
- موثر بودن آن‌ها برای مهار *B. cinerea*، عامل کپک خاکستری توت‌فرنگی، در آزمایش مشابهی اثبات گردیده بود (Hung *et al.*, 2011). با این وجود، ترکیب فنیل اتیل الکل در آزمایش‌های ما اثر بازدارندگی مناسبی بر رشد میسلیم یا جوانه‌زنی کنیدیوم نشان نداد. از این شش ترکیب، فنیل اتیل الکل قبلاً از (Stoppoche *et al.*, 2010) گزارش شده بود و بقیه برای اولین بار از یک گونه تریکودرما گزارش می‌شوند.
- نتیجه‌گیری کلی:** نتایج این مطالعه نشان داد که برخی از ترکیبات آلی فرار تولید شده توسط کشت پنج روزه‌ی *T. asperellum* می‌تواند از طریق بازدارندگی از رشد میسلیم و جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea*، این بیمارگر را روی محیط کشت و میوه‌ی توت‌فرنگی مهار کنند. در نتیجه، تولید ترکیبات آلی فرار ضد قارچی توسط *T. asperellum* می‌تواند مکانیسم مهمی برای کنترل آلودگی بافت‌های گیاهی توسط *B. cinerea* در شرایط کنترل شده محسوب شود. بنا به گزارش اداره‌ی ایمنی مواد غذایی اروپا (European Food Safety Authority, 2013) (www.efsa.europa.eu/efsajournal, 2013) داده‌های کافی برای نتیجه‌گیری قطعی در مورد احتمال ایجاد حساسیت، مسمومیت یا بیماری‌زایی در نتیجه‌ی استنشاق محصولات بیولوژیکی حاصل از سویه‌های *T. asperellum* مورد بررسی و تعیین میزان مجاز استفاده از آن‌ها در محصولات وجود ندارد. هرچند، با در نظر گرفتن این‌که میکروب‌ها معمولاً قابلیت ایجاد واکنش‌های حساسیت‌زا را دارا هستند، بر لزوم آزمایش‌های دقیق در این زمینه تأکید می‌شود. نتایج مطالعه‌ی ما برخی از ترکیبات آلی فرار *T. asperellum* را به‌عنوان یک مکانیسم تدخینی بالقوه برای کنترل پوسیدگی بوتریتیسی پس از برداشت میوه‌ی توت‌فرنگی معرفی می‌کند. با این وجود، تا حصول اطمینان از عدم مخاطرات احتمالی برای سلامتی انسان و محیط زیست، آزمایش‌های بیشتری مورد نیاز خواهد بود.

- HUANG, R., G. Q. LI, J. ZHANG, L. YANG, H. J. CHE, D. H. JIANG and H. C. HUANG, 2011. Control of postharvest botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. *Phytopathology*, 101: 859-869.
- HUNG, R., S. LEE and J. W. BENNETT, 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compounds. *Fungal ecology*, 6: 19-26.
- JU, K. H., S. H. LEE, C. S. KIM, E. K. LIM, K. H. CHOI, H. G. KONG, D. W. KIM, S. W. LEE, and B. J. MOO, 2006. Biological Control of Strawberry Gray Mold Caused by *Botrytis cinerea* Using *Bacillus licheniformis* N1 Formulation. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17: 438-444.
- KARABULUT, O. A., H. TEZCAN, A. DAUS, L. COHEN, B. WIESS and S. DROBY, 2004. Control of preharvest and postharvest fruit rot in strawberry by *Metschnikowia fructicola*. *Biocontrol science and technology*, 14: 513-521.
- KULAKIOTU, E. K., C. C. THANASSOULOPOULOS and E. M. SFAKIOTAKIS, 2004a. Biological control of *Botrytis cinerea* by volatiles of 'Isabella' grapes. *Phytopathology*, 94: 924-931.
- KULAKIOTU, E. K., C. C. THANASSOULOPOULOS and E. M. SFAKIOTAKIS, 2004b. Postharvest biological control of *Botrytis cinerea* on kiwifruit by volatiles of 'Isabella' grapes. *Phytopathology*, 94: 1280-1285.
- LIMA, G., A. IPPOLITO, F. NIGRO and M. SALERNO, 1997. Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology*, 10: 169-178.
- LIU, X. M. and H. ZHANG, 2015. The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 6:774.
- MAURIELLO, G., R. MARINO, M. DAURIA, G. CERONE and G. L. RANA, 2004. Determination of volatile organic compounds from truffles via SPME-GC-MS. *Journal of Chromatographic Science*, 42: 299-305.
- MERCIER, J. and J. I. JIMÉNEZ, 2004. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biology and Technology*, 31: 1-8.
- MERCIER, J. and J. I. JIMÉNEZ, 2005. Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *Biological Control*, 32: 401-407.
- MORATH, S. U., R. HUNG and J. W. BENNETT, 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal biology reviews*, 26: 73-83.
- NAZMI, F. 2006. Identification of *Trichoderma* species in Southern Shores of Caspian Sea. Degree of Master of Science. Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran (In Persian with English summary).
- NEMČOVIČ, M., L. JAKUBÍKOVÁ, I. VÍDEN and V. FARKAŠ, 2008. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiology Letters*, 284: 231-236.
- SCHNABEL, G. and J. MERCIER, 2006. Use of a *Muscodor albus* pad delivery system for the management of brown rot of peach in shipping cartons. *Postharvest Biology and Technology*, 42: 121-123.
- SIDDIQUEE, S., B. E. CHEONG, K. TASLIMA, H. KAUSAR and M. M. HASAN, 2012. Separation and identification of volatile compounds from liquid cultures of *Trichoderma harzianum* by GC-MS using three different capillary columns. *Journal of Chromatographic Science*, 50: 358-367.
- STOPPACHER, N., B. KLUGER, S. ZEILINGER, R. KRŠKA and R. SCHUHMACHER, 2010. Identification and profiling of volatile metabolites of the biocontrol fungus *Trichoderma atroviride* by HS-SPME-GC-MS. *Journal of Microbiological Methods*, 81: 187-193.
- SUTTON, J. C., D. W. LI, G. PENG, H. YU, P. G. ZHANG, and R. M. VALDEBENITO-SANHUEZA, 1997. *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease*, 81: 316-328.
- TRONSMO, A. and C. DENNIS, 1977. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 83: 449-455.
- VINALE, F., K. SIVASITHAMPARAM, E. L. GHISALBERTI, R. MARRA, M. J. BARBETTI, H. LI, S. L. WOO and M. LORITO, 2008. A novel role

- for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72: 80–86.
- WAN, M. G., G. Q. LI, J. B. ZHANG, D. H. JIANG and H. C. HUANG, 2008. Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biological Control*, 46: 552-559.
- WHEATLEY, R., C. HACKETT, A. BRUCE and A. KUNDZEWICZ, 1997. Effect of substrate composition on production of volatile organic compounds from *Trichoderma* spp. inhibitory to wood decay fungi. *International Biodeterioration and Bio-degradation*, 39: 199–205.
- WHITMORE, L. and B. A. WALLACE, 2004. The Peptaibol Database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Research*, 32(Database issue): D593-D594.
- WILLIAMSON, B., B. TUDZYNSKI, P. TUDZYNSKI and J. A. L. VAN KAN, 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8: 561–580.
- WSZELAKI, A. L. and E. J. MITCHAM, 2003. Effect of combinations of hotwater dips biological control and controlled atmospheres for control of gray mold on harvested strawberries. *Postharvest Biology and Technology*, 27: 255-264.
- YOUNESI BANE, S. 2009. Study on the possibility of non-chemical control of gray mold on strawberry at kurdestan province. Degree of Master of Science. Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran (In Persian with English summary).
- ZHANG, H. Y., L. WANG, Y. DONG, S. JIANG, J. CAO, and R. J. MENG, 2007. Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. *Biological Control*, 40: 287-292.

