

بررسی کارایی ترکیبات آلی فرار *Trichoderma asperellum* در کنترل *Botrytis cinerea* عامل کپک خاکستری توت‌فرنگی

۱. فرناز جلالی؛ ۲. دوستم‌راد ظفری*؛ ۳. هومن سالاری

۱ و ۲. 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: ۱۳۹۵/۲/۲۸ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۴/۲۴)

چکیده

این مطالعه، به منظور تعیین کارایی ترکیبات آلی فرار *Trichoderma asperellum* در بازداری از رشد میسلیم و جوانه‌زنی کنیدیوم *Botrytis cinerea* و کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه توت‌فرنگی صورت گرفت. کاهش معنی‌داری 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 میوه توت‌فرنگی را نیز به میزان معنی‌داری کاهش دادند. الگوی ترکیبات آلی فرار *T. asperellum*، با استفاده از تکنیک ریزاستخراج از فاز جامد همراه با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (SPME-GC-MS) شناسایی شد. از میان ۳۴ ترکیب آلی فرار شناسایی شده در این الگو، شش ترکیب شامل ایزوبوتیریک اسید، ۱، ۳، ۵، ۷-سیکلوآکتاترئین، دی‌متیل سولفید، پارا-متنا-۶، ۸، دین-۲-ال-استات، فنیل اتیل الکل و ۱-بوتانول-۳-متیل-استات، فراوان‌ترین بودند. ترکیبات سنتز شده ایزوبوتیریک اسید و دی‌متیل سولفید به ترتیب با غلظت بازداری ۵۰٪ (IC₅₀) ۲۶/۵ و ۱۰ میکرولیتر بر لیتر، بیشترین تأثیر را در بازداری از رشد میسلیم و جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea* داشتند.

کلیدواژه‌گان: زیست‌سنجی، کنترل زیستی، وقوع و شدت بیماری، IC₅₀، ترکیبات آلی فرار.

Efficacy of the volatile organic compounds of *Trichoderma asperellum* in control of *Botrytis cinerea*, the causal agent of strawberry gray mold

Farnaz Jalali¹, Doustmorad Zafari^{2*} and Hooman Salari³

1, 2. Ph. D. Student and Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran

3. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture and Natural Resources, Razi University, Kermanshah, Iran

(Received: May 17, 2016 - Accepted: Jul. 14, 2016)

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 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 reduced by exposure to the VOCs of 5-day old *T. asperellum* cultures. VOCs profile of *T. asperellum* was identified using solid phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS) technique. Six compounds out of 34 VOCs identified in this including isobutyric acid, 1,3,5,7-cyclooctatetraene, dimethyl sulfide, para-mentha-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 IC₅₀ of 26.5 and 10 µl/ liter, respectively.

Keywords: Bioassay, biocontrol, disease incidence and severity, IC₅₀, volatile organic compounds.

مقدمه

میوه توت‌فرنگی از ارزش غذایی بالا و اهمیت اقتصادی زیادی برخوردار است. پوسیدگی بوتریتیسی میوه Botrytis Fruit Rot (BFR) یا کپک خاکستری یکی از بیماری‌های مهم توت‌فرنگی در سراسر جهان است. عامل این بیماری، *Botrytis cinerea* (تلمورف: *Botrytinia fuckeliana*)، یک قارچ بیماری‌زای گیاهی هوازاد با شیوه زندگی نکروتروفی است که به بیش از ۲۰۰ گونه گیاهی حمله می‌کند (Williamson et al. 2007). این بیمارگر از طریق تولید سموم، گونه‌های اکسیژن فعال و القای انفجار اکسیداتیو، 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 دوره 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 محدودکننده 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 هیچ‌یک از کولتیوارهای 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 این وجود، افزایش نگرانی‌های زیست‌محیطی در مورد اثر باقی‌مانده 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 intermedia*, *Aureobasidium pullulans*, *Clonostachys rosea*, *Candida oleophila*, *Metschnikowia* (= *Gliocladium roseum*), *Rhodotorula*, *Pichia guilliermondii fructicola*, *Trichoderma* spp. و *Ulocladium atrum*, *glutinis* عوامل مؤثری برای کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه توت‌فرنگی تحت شرایط پیش یا پس از برداشت میوه هستند. مکانیسم‌های آنتی بیوز، میکوپارازیسم، رقابت برای مواد غذایی و فضا و کنترل اسپورزایی *B. cinerea* برای کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه 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, Bogumił et al. 2013).

در دهه‌های اخیر، انتشار ترکیبات آلی فرآر (VOCs)^۱ به‌عنوان یک جنبه مهم از تعاملات بین موجودات زنده مورد توجه قرار گرفته است (Liu and Zhang 2015). موجودات مختلف، مخلوط‌های متنوعی از ترکیبات کربنی در فاز گازی به‌نام ترکیبات آلی فرآر با جرم مولکولی کمتر از ۳۰۰ دالتون، قطبیت پایین و فشار بخار بالا تولید می‌کنند. این ترکیبات با توجه به اندازه کوچک خود قادر به انتشار از طریق اتمسفر و خاک بوده و در 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"^۲ با ترکیبات آلی فرآر باکتری‌ها، گونه‌های استرپتومایسس، قارچ‌های رشته‌ای، مخمرها و گیاهان عالی برای از بین بردن طیف گسترده‌ای از عوامل بیماری‌زای انباری و کنترل پوسیدگی‌های قارچی مؤثر بوده است (Mercier and Jimenez 2004). کنترل بیماری‌های پس از برداشت

1. Volatile Organic Compounds
2. Biofumigation

قرار گرفت، باتوجه به ویژگی‌های ریخت‌شناسی و توالی ITS DNA ریبوزومی (ITS1-5.8S rDNA-ITS2) شناسایی شده بود (Nazmi 2006). جدایه *B. cinerea* از میوه آلوده توت‌فرنگی نمونه‌برداری شده از مزرعه‌ای در روستای نشور وسطی، شهرستان کامیاران، استان کردستان (خرداد ۱۳۹۲) جداسازی شد. این جدایه براساس ویژگی‌های ریخت‌شناسی و باتوجه به کلید شناسایی قارچ‌های ناقص (Barnett and Hunter 1998) شناسایی شد.

بررسی تأثیر ترکیبات آلی فرآر *T. asperellum* بر رشد

میسلیوم *B. cinerea*

این آزمون زیست‌سنجی برمبنای روش Huang et al. (2011) همراه با تغییراتی صورت گرفت. پنج تیمار شامل: (۱) شاهد؛ (۲) مایه‌زنی هم‌زمان^۱ *T. asperellum* + *T. asperellum*-SI (۳) مایه‌زنی هم‌زمان + کربن فعال^۲ (*T. asperellum*-SI+AC)، (۴) مایه‌زنی غیرهم‌زمان^۴ یا کشت پنج روزه *T. asperellum* (*T. asperellum*-NSI) و (۵) مایه‌زنی غیرهم‌زمان *T. asperellum* + کربن فعال (*T. asperellum*-NSI+AC) در نظر گرفته شد. تیمارهای شاهد، شامل پتری‌های حاوی محیط کشت PDA سترون بودند. برای تیمارهای مایه‌زنی هم‌زمان *T. asperellum*، قرصی به قطر پنج میلی‌متر از میسلیوم 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 میسلیوم در حال رشد *T. asperellum* در مرکز PDA موجود در ظروف پتری قرار داده شد و تا زمان شروع آزمایش، کشت‌ها در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. کربن فعال به‌عنوان جاذب ترکیبات فرآر *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

میوه توسط ترکیبات آلی فرآر *Muscodor albus* کنترل پوسیدگی بوتریتیسی انگور *Vitis vinifera* L. کیوی به‌وسیله ترکیبات آلی فرآر انگور روباه (*V. labrusca* L.) و کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه توت‌فرنگی توسط ترکیبات آلی فرآر *Streptomyces platensis* F-1 و *Candida intermedia* C410 نمونه‌هایی از این شیوه کنترل می‌باشند (Kulakiotu et al. 2004 a, Kulakiotu et al. 2004 b, 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 فرآر برخی از گونه‌های تریکودرما، توانایی کنترل بیمارگرهای گیاهی و تحریک رشد گیاهان را دارند (Vinale et al. 2008, Hung et al. 2013). با این وجود، مطالعات کمی در مورد الگوی ترکیبات فرآر تریکودرما (Stoppacher et al. 2010, Siddiquee et al. 2012) و یا عملکرد بیولوژیکی مواد فرآر 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، *T. asperellum* مؤثرترین گونه برای کاهش رشد میسلیوم *B. cinerea* از طریق تولید ترکیبات آلی فرآر در شرایط درون شیشه‌ای است (Younesi bane 2009). این نتیجه نشان می‌دهد که *T. asperellum* ممکن است بتواند یک تدخین‌گر زیستی^۱ بالقوه برای کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه توت‌فرنگی باشد. بنابراین، هدف از این مطالعه: (۱) تعیین کارایی ترکیبات آلی فرآر *T. asperellum* در کنترل رشد میسلیوم و جوانه‌زنی کنیدیوم قارچ *B. cinerea* و کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه توت‌فرنگی و (۲) شناسایی ترکیبات آلی فرآر منتشرشده توسط این جدایه و بررسی اثر برخی از این ترکیبات در بازداری از رشد *B. cinerea* بود.

مواد و روش‌ها

جدایه‌های قارچی

جدایه *T. asperellum* که در این مطالعه مورد استفاده

2. Simultaneous inoculation
3. Active carbone
4. Non-Simoultaneous inoculation

1. Biofumigant

اول، کشت‌های پنج روزه *T. asperellum* روی محیط کشت PDA و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس آماده شدند. مقدار متوسط بیومس زنده تریکودرما در هر پتری، پنج روز پس از مایه‌زنی از طریق شمارش کنیدیوم با کمک لام هموسیتومتر محاسبه شد. درب‌های 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 میوه توت‌فرنگی سالم (عاری از هرگونه زخم) با اندازه 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 (1×10^8 کنیدیوم/میلی‌لیتر) *B. cinerea* روی سطح میوه توت‌فرنگی مایه‌زنی شدند. این میوه‌ها روی صفحه سرمایی متخلخل بالای پتری‌های 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 درجه سلسیوس تحت یک دوره 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.

مرحله 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 روزه *T. asperellum* و در یکی دیگر از دسیکاتورها هشت پتری حاوی کشت پنج روزه *T. asperellum* همراه با کربن 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.

میکرومتر) روی گاز استریل قرار داده شد. ظروف PDA مایه‌زنی شده با قرص میسلیمیوم پنج میلی‌متری *B. cinerea* (از حاشیه کشت دو روزه این قارچ) در مرکز محیط کشت، بالای ظروف تیمار قرار داده شدند تا یک مجموعه 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 درجه سلسیوس، گروه دو به مدت چهار روز در دمای ۱۰ درجه سلسیوس و گروه سه به مدت سه روز در دمای ۲۰ درجه 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 فرآر *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 (1×10^8 کنیدیوم/میلی‌لیتر) بر سطح محیط کشت WA در ظروف پتری پخش شد. این پتری‌ها روی پتری‌های 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 درجه سلسیوس، گروه دو به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۱۰ درجه سلسیوس و گروه سه به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از این مدت، درصد کنیدیوم‌های جوانه‌زده و طول لوله تندشی *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 فرآر *T. asperellum* بر کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه توت‌فرنگی

این آزمایش زیست‌سنجی در دسیکاتورهای شیشه‌ای بسته (حجم حدوداً ۵/۸ لیتر) و در دو مرحله انجام شد. در مرحله

جدول ۱. مقیاس صفر تا هشت نمره‌ای برای ارزیابی شدت بیماری پوسیدگی بوتریتیسی میوه‌های توت‌فرنگی (Huang *et al.* 2010)

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%

و تغلیظ شدند. پس از آن، فیبر از لوله‌های آزمایش خارج شد و به‌منظور جداسازی ترکیبات آلی فرآر 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) به‌عنوان گاز حامل به‌کار 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 فرآر با مقایسه طیف جرمی و زمان شناسایی^۳ با ترکیبات استاندارد موجود در پایگاه داده‌های کتابخانه موسسه ملی استاندارد و فن‌آوری^۴ (NIST 2005) و پایگاه داده‌های طیف جرمی (وایلی^۵) انجام شد. آنالیز ترکیبات آلی فرآر در نمونه کشت *T. asperellum* و محیط کشت سترون، دو بار تکرار شد. ترکیب‌های مشترک شناسایی‌شده در کشت *T. asperellum* و محیط کشت سترون از فهرست ترکیب‌های نهایی حذف شدند.

بررسی تأثیر ترکیبات آلی فرآر منتخب *T. asperellum*

بر رشد *B. cinerea*

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

شناسایی ترکیبات آلی فرآر جدایه *T. asperellum* با استفاده از کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی آماده‌سازی نمونه و آنالیز فضای فوقانی نمونه به‌وسیله تکنیک ریزاستخراج از فاز جامد همراه با کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی^۱ (HS-SPME-GC-MS) مطابق روش *Stoppacher et al.* (2010) همراه با تغییرات اندکی به‌شرح زیر صورت گرفت.

آماده‌سازی کشت *T. asperellum*

یک حلقه پنج میلی‌متری از میسلیوم *T. asperellum* بر مرکز سطح اریب محیط کشت شامل پنج میلی‌لیتر PDA در لوله‌های آزمایش (۱۶×۱۶۰ میلی‌متر - ارتفاع × قطر) قرار داده شد. لوله‌های آزمایش با درپوش‌های لاستیکی و پارافیلیم بسته و در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به‌مدت پنج روز نگهداری شدند. لوله‌های آزمایش یکسان و حاوی محیط کشت تازه PDA سترون به‌عنوان شاهد برای ثبت پس‌زمینه کروماتوگرام (برای ارزیابی مواد نشات گرفته از محیط کشت) مورد استفاده قرار گرفتند.

آنالیز HS-SPME-GC-MS

این بخش از آزمایش توسط آقای دکتر بوجار، استادیار بیوشیمی دانشگاه خوارزمی انجام شد. به‌طور خلاصه، پس از ۱۵ دقیقه متعادل‌سازی لوله‌های شاهد و حاوی کشت قارچ در دمای ۳۰ درجه سلسیوس، یک فیبر مخصوص میکرواستخراج از فاز جامد از جنس پلی دی متیل سیلوکسان^۲ (PDMS) با قطر ۱۰۰ میکرومتر بر روی نگهدارنده (Supelco) تا ۲۱ میلی‌متر و به‌مدت ۳۰ دقیقه درون لوله‌های آزمایش به صورت کاملاً ثابت قرار گرفت. با این روش ترکیبات آلی فرآر از فضای فوقانی کشت *T. asperellum* یا محیط کشت سترون استخراج

3. Retention time

4. National Institute of Standards and Technology

5. Mass Spectral Database (Wiley 7)

1. Head Space-Solid Phase Micro Extraction-Gas Chromatography-Mass Spectrometry

2. Polydimethylsiloxane

سوسپانسیون کنیدیوم (1×10^5 کنیدیوم/ میلی‌لیتر) روی سطح محیط کشت *B. cinerea* در ظروف پتری (به قطر ۹ سانتی‌متر) پخش شد. پس از برداشتن درب پتری‌ها، پتری‌های WA مایه‌زنی‌شده با کنیدیوم *B. cinerea* بالای پتری حاوی اتانول خالص (شاهد) و یا هر یک از رقت‌های ترکیبات فرآر 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 درجه 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 لوله تندش آن برابر یا بیشتر از قطر کنیدیوم باشد. درصد مهار جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea* توسط هر ترکیب فرآر، بر مبنای تفاوت درصد کنیدیوم جوانه‌زده در پتری شاهد و پتری حاوی آن ترکیب محاسبه شد. مقدار IC_{50} برای هر ترکیب فرآر، بر مبنای داده‌های مربوط به درصد مهار جوانه‌زنی کنیدیوم و غلظت ترکیب فرآر به‌کاررفته در مجموعه پتری‌های دوتایی به‌دست آمد.

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. برای تجزیه‌های آماری مربوط به این پژوهش از نرم‌افزارهای میکروسافت اکسل^۲ (۲۰۱۰)، SAS (نسخه ۹/۱) و SPSS (نسخه ۱۷) استفاده شد. تجزیه واریانس و مقایسه میانگین داده‌های مربوط به قطر پرگنه، درصد کنیدیوم جوانه‌زده، طول لوله تندشی، وقوع بیماری و شدت بیماری پس از ورود به اکسل با کمک نرم‌افزار SAS و آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد. تعیین IC_{50} با کمک نرم‌افزار SPSS و رگرسیون پروبیت^۳ در سطح احتمال ۹۵٪ صورت گرفت.

در آزمایش مهار رشد میسلیم، یک حلقه میسلیمی از حاشیه پرگنه کشت دو روزه *B. cinerea* روی محیط کشت PDA جداسازی و در پتری دیگری (به قطر ۹ سانتی‌متر) حاوی محیط کشت PDA مایه‌زنی شد. هم‌زمان، یک تکه کاغذ صافی (با ابعاد $1/5 \times 1/5$ سانتی‌متر) در مرکز پتری‌های دیگر حاوی محیط کشت PDA قرار داده شد. ترکیبات فرآر (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 شده هر یک از این ترکیبات روی قطعه کاغذ صافی موجود در پتری قرار داده شد. برداشتن درب پتری‌ها، پتری‌های PDA مایه‌زنی شده با میسلیم *B. cinerea* بالای پتری‌های حاوی ترکیبات فرآر مورد بررسی قرار گرفتند. مجموعه‌های دو ظرفی با استفاده از دو لایه پارافیلیم برای ایجاد یک محفظه 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 حلقه 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 درجه سلسیوس نگهداری شدند. قطر پرگنه *B. cinerea* در هر مجموعه اندازه‌گیری شد. درصد مهار رشد میسلیم *B. cinerea* به‌وسیله هر ترکیب فرآر در هر رقت بر اساس تفاوت قطر پرگنه بین شاهد و تیمار محاسبه شد. غلظت مورد نیاز برای ۵۰ درصد مهار رشد میسلیم (IC_{50})^۱ که به‌صورت میکرولیتر بر لیتر بیان می‌شود، بر مبنای داده‌های مربوط به درصد کنترل و غلظت ترکیب فرآر به‌کاررفته در هر مورد محاسبه گردید. برای آزمایش مهار جوانه‌زنی کنیدیوم، ۱۰۰ میکرولیتر

جدول ۲. ترکیبات آلی فرآر 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, $\geq 99\%$
1,3,5,7-Cyclooctatetraene		138924 Aldrich	98%
Dimethyl sulfide	DMS, Methyl sulfide	274380 Sigma-Aldrich	anhydrous, $\geq 99.0\%$
Isobutyric acid	2-Methylpropionic acid	11754 Sigma	99%
Para-mentha-6,8,dien-2-ol-acetate	Carvyl acetate	W225002 Aldrich	Food Grade, $\geq 98\%$
Phenyl ethyl alcohol	β -PEA, 2-Phenylethanol, 2-Phenylethyl alcohol, Benzyl carbinol, PEA	W285811 Aldrich	Food Grade, $\geq 99\%$

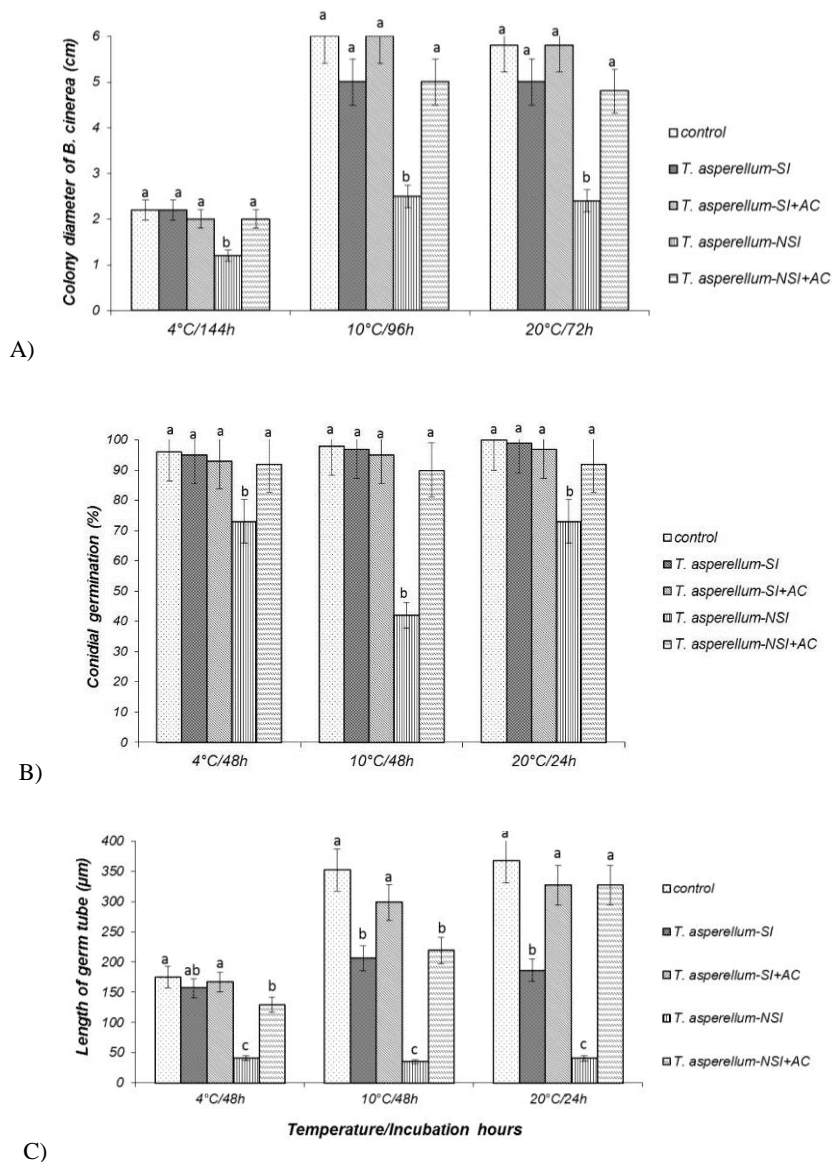
2. Microsoft Excel
3. Probit regression

1. Inhibition Concentration

کاهش، در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار با ترکیبات آلی فرآر حاصل از مایه‌زنی هم‌زمان *T. asperellum* معنی‌دار بود ($p \leq 0.01$). اثر بازدارنده تیمار ترکیبات آلی فرآر *T. asperellum* بر رشد *B. cinerea* در صورت استفاده از کربن فعال خنثی می‌شد (شکل ۱ A).

نتایج

بازداری از رشد میسلیم *B. cinerea* توسط ترکیبات آلی فرآر *T. asperellum* متوسط قطر پرگنه *B. cinerea* در تیمارهای در معرض ترکیبات آلی فرآر کشت پنج روزه *T. asperellum* در همه دماهای مورد بررسی کاهش می‌یافت. این



شکل ۱. اثر ترکیبات آلی فرآر 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* (*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 ($p \leq 0.01$) بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

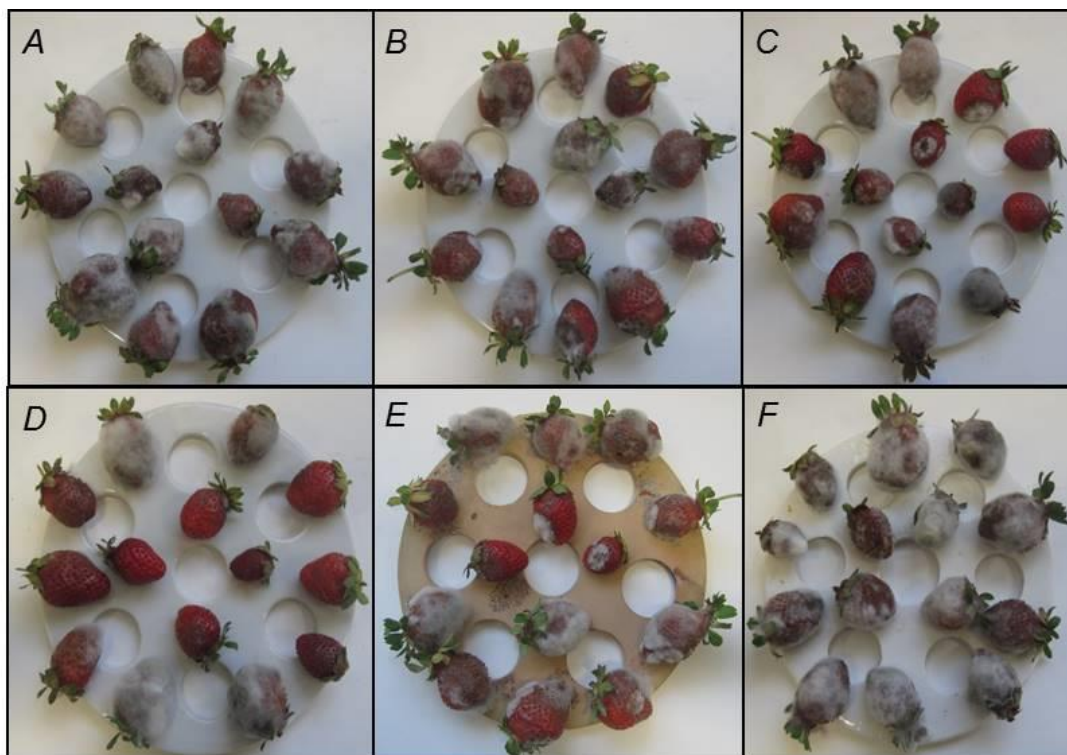
Figure 1. Effects of the VOCs produced by *T. asperellum-SI*, *T. asperellum-SI+AC*, *T. asperellum-NSI* and *T. asperellum-NSI+AC* treatments on A) colony diameters, B) conidial germination and C) germ-tube extension of *Botrytis cinerea* under different temperatures. Mean values for different treatments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

تأثیر ترکیبات آلی فرآر *T. asperellum* بر کنترل پوسیدگی بوتریتیسی میوه توت‌فرنگی

هشت روز پس از شروع آزمایش، همه میوه‌های توت‌فرنگی در معرض تیمار شاهد (PDA سترون) علائم پوسیدگی نرم و کپک خاکستری نشان دادند. شدت علائم در بیشتر این میوه‌ها به نمره ۸ رسید. در حضور ترکیبات آلی فرآر 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 نمره شدت بیماری به ۴/۹۲ و ۲/۷۸ کاهش یافت. این کاهش، در مقایسه با شاهد معنی‌دار ($p \leq 0/01$) بود (شکل‌های ۲ و ۳). پنج روز پس از مایه‌زنی، مقدار بیومس زنده *T. asperellum* به‌طور میانگین $2/5 \times 10^6$ کنیدیوم در میلی‌لیتر در هر پتری محاسبه گردید. اثر بازدارنده ترکیبات آلی فرآر *T. asperellum* بر گسترش بیماری در نتیجه کاربرد کربن فعال از بین رفت (شکل‌های ۲ و ۴).

بازداری از جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea* توسط ترکیبات آلی فرآر *T. asperellum*

درصد جوانه‌زنی و طول لوله تندشی کنیدیوم‌های *B. cinerea* در پتری‌های در معرض ترکیبات آلی فرآر کشت پنج روزه *T. asperellum* در همه دماهای مورد بررسی کاهش می‌یافت. این کاهش، در مقایسه با تیمار شاهد و تیمار با ترکیبات آلی فرآر حاصل از مایه‌زنی هم‌زمان *T. asperellum* معنی‌دار بود ($p \leq 0/01$). تیمار ترکیبات آلی فرآر حاصل از مایه‌زنی هم‌زمان *T. asperellum* نیز در دماهای ۱۰ و ۲۰ درجه سلسیوس طول لوله تندشی 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 ۱ B و C).



شکل ۲. اثر ترکیبات آلی فرآر *Trichoderma asperellum* بر کاهش وقوع و شدت پوسیدگی بوتریتیسی میوه توت‌فرنگی (۲۰ درجه سلسیوس، هشت روز). مقدار بیومس زنده *T. asperellum* بر مبنای تعداد پتری در هر دسیکاتور به‌صورت (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.

Figure 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).

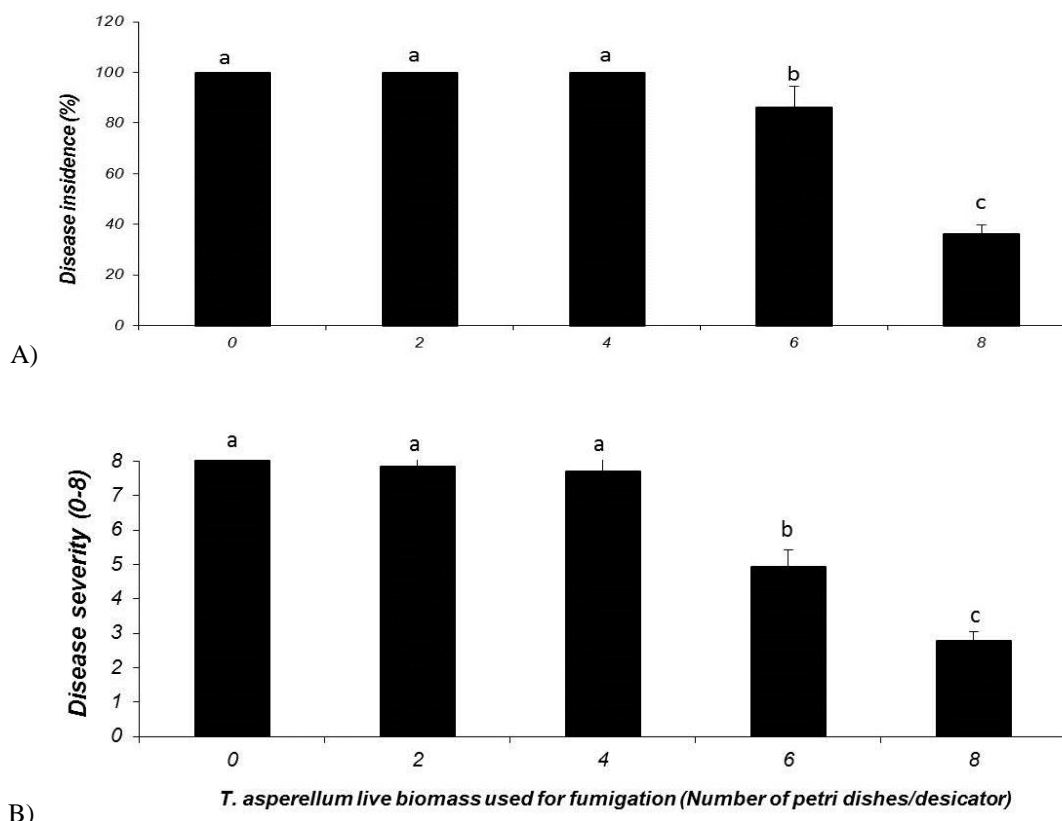
تولید را داشتند (مساحت نسبی پیک بیش از ۰/۵) (جدول ۳).

فعالیت ضد قارچی محصولات سنتز شده ترکیبات آلی فرآر منتخب *T. asperellum*

از میان محصولات سنتز شده 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 جوانه زنی کنیدیوم *B. cinerea* داشتند. ترکیب ۱، ۳، ۵، ۷-سیکلوآکتاترئین از نظر بازداری از رشد میسلیم *B. cinerea* در جایگاه بعدی قرار داشت. برای بازداری از رشد *B. cinerea* توسط بقیه ترکیبات، غلظت‌های بالاتر از ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر مورد نیاز بود (جدول ۴).

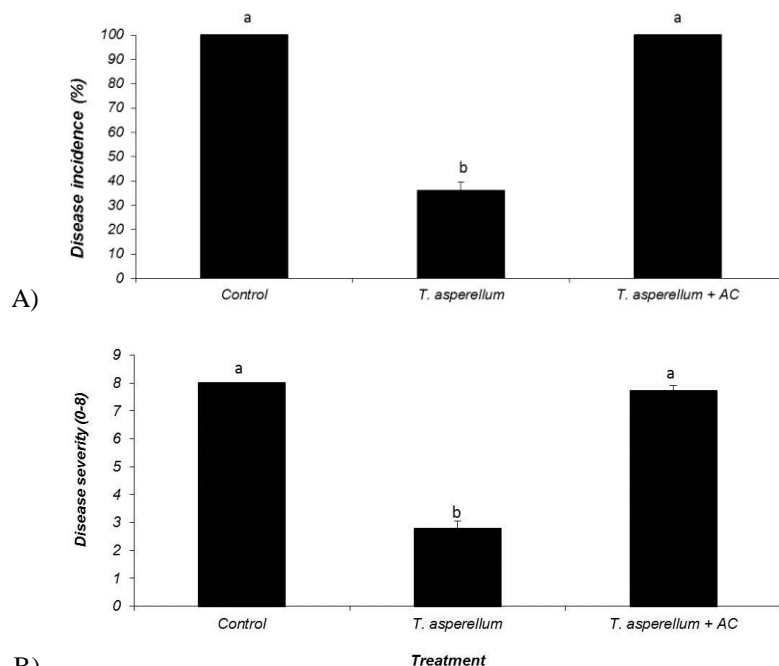
شناسایی ترکیبات آلی فرآر *T. asperellum*

با حذف ترکیبات مشترک ردیابی شده در نمونه شاهد و مقایسه طیف جرمی و زمان شناسایی هر ترکیب با ترکیبات استاندارد موجود در پایگاه داده‌ها، مجموعاً ۳۴ ترکیب آلی فرآر با بیش از ۰/۷٪ مطابقت، توسط آنالیز GC-MS از کشت پنج روزه *T. asperellum* تشخیص داده شدند. این ترکیبات متعلق به کلاس ترکیبات آلی اترها، استرها، الکل‌ها، آلکن‌ها، آلکن‌ها، آلکین‌ها، اسیدهای آلی، کتون‌ها، آلدئید فوران‌ها، مونوترپن‌ها، سزکوئی‌ترپن‌ها، 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-سیکلوآکتاترئین، دی متیل سولفید، پارا-متا-۶، ۸، دین-۲-ال-استات، فنیل اتیل الکل و ۱-بوتانول-۳-متیل-استات بیشترین فراوانی



شکل ۳. اثر ترکیبات آلی فرآر *Trichoderma asperellum* بر (A) کاهش وقوع و (B) شدت پوسیدگی بوتریتیسی میوه توت‌فرنگی (۲۰ درجه سلسیوس، ۸ روز). مقادیر میانگین تیمارهای مختلف در هر دما با حروف متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار ($P \leq 0.01$) بر مبنای آزمون چند دامنه‌ای دانکن است.

Figure 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 ($P \leq 0.01$) according to Duncan's multiple range test.



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

Figure 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 ($P \leq 0.01$) according to Duncan's multiple range test.

جدول ۳. ترکیبات آلی فرآر منتشرشده از *Trichoderma asperellum*

Table 3. VOCs released from *Trichoderma asperellum*

Pick no.	RT (Min)	Possible Compound	RA (%)	MW (Da)
1	2.10	1-hexanol	0.81	102
2	2.55	2-hexanone	1.19	100
3	3.68	1-Tridecane	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، RA، مساحت نسبی پیک، MW، وزن مولکولی.

RT, Retention time in gas chromatography-mass spectrometry. RA, relative peak area; MW, molecular weight.

جدول ۴. مقادیر غلظت بازدارندگی ۵۰٪ ترکیبات آلی فرآر سنتز شده برای بازداری از رشد میسلیموم و جوانه‌زنی *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

بحث

T. atroviride تولید بیشتر ترکیبات آلی فرآر 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. در عین حال، کاهش معنی‌داری در وقوع و شدت پوسیدگی بوتریتیسی میوه توت‌فرنگی در نتیجه قرار دادن میوه‌های توت‌فرنگی مایه‌زنی شده با سوسپانسیون کنیدیوم *B. cinerea* در معرض مقدار کافی از ترکیبات آلی فرآر تولیدشده از محیط کشت‌های پنج روزه *T. asperellum* مشاهده شد. نتیجه مشابهی در نتیجه کاربرد ترکیبات آلی فرآر مخمر *Candida intermedia* برای بازداری از رشد *B. cinerea* روی میوه توت‌فرنگی مشاهده شده بود (Huang et al. 2011). در نتیجه ترکیبات آلی فرآر *T. asperellum* نیز ممکن است نوید بخش ترکیب تدخینی زیستی نوینی برای کنترل پوسیدگی بوتریتیسی پس از برداشت میوه توت‌فرنگی باشند. در بررسی الگوی ترکیبات فرآر منتشرشده توسط *T. asperellum* ترکیب ایزوبوتیریک اسید فراوان‌ترین ماده در این الگو بود که از بین این شش ماده، بیشترین تأثیر را در بازداری از رشد میسلیموم *B. cinerea* داشت. با توجه به اینکه ترکیب α -آمینوایزوبوتیریک اسید به‌عنوان پیش‌ساز پپتیدهای ضد میکروبی (Wallace and Shitmore 2004) در گونه‌های تریکودرما شناخته شده است، ممکن است بتواند ارتباط این ماده را با نقش در بازداری از رشد میسلیموم *B. cinerea* توجیه کند. این ماده پیش از این به‌عنوان یکی از دو ماده اصلی در الگوی ترکیبات فرآر *Muscodor albus* شناخته شده بود و اثر آن در بازداری از رشد چند قارچ مولد میکوتوکسین به اثبات رسیده است (Mercier et al. 2005). ترکیب دی متیل سولفید از گونه‌های متنوعی از

نتایج این مطالعه نشان داد که ترکیبات آلی فرآر تولیدشده توسط کشت پنج روزه *T. asperellum* می‌توانند از طریق بازداری از رشد میسلیموم و جوانه‌زنی کنیدیوم *B. cinerea*، این بیمارگر را روی محیط کشت مهار کنند. خنثی شدن این اثر بازدارنده در نتیجه کاربرد کربن فعال، تأیید دیگری بر این یافته بود که اثر مهارکنندگی *T. asperellum* بر رشد *B. cinerea* از طریق تأثیر متابولیت‌های فرآر این قارچ رخ می‌دهد. در نتیجه، تولید ترکیبات آلی فرآر ضد قارچی توسط *T. asperellum* می‌تواند مکانیسم مهمی برای کنترل آلودگی بافت‌های گیاهی توسط *B. cinerea* در شرایط کنترل شده محسوب شود.

نوع، نسبت و غلظت ترکیبات آلی فرآر با توجه به گونه تولیدکننده و سن آن، نوع محیط کشت و شرایط محیطی تغییر پیدا می‌کند (Wheatley et al. 1997). نتایج مطالعه ما نیز، اهمیت سن کشت قارچی و دما را به‌عنوان دو فاکتور مهم برای اثرگذاری ترکیبات آلی فرآر *T. asperellum* بر بازداری از رشد *B. cinerea* تأیید می‌کند. مایه‌زنی هم‌زمان این قارچ نتوانست درصد جوانه‌زنی کنیدیوم بیمارگر را در هیچ یک از دماهای مورد بررسی کاهش دهد. کاهش طول لوله تندشی کنیدیوم‌های *B. cinerea* در حضور ترکیبات آلی فرآر منتشرشده از مایه‌زنی هم‌زمان *T. asperellum* نسبت به تیمارهای شاهد، تنها در دمای ۱۰ و ۲۰ درجه سلسیوس رخ داد. با وجود این، میزان بازداری از رشد بیمارگر در این تیمار نسبت به کشت پنج روزه *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

European Food Safety Authority,)
 داده‌های (www.efsa.europa.eu/efsajournal, 2013
 کافی برای نتیجه‌گیری قطعی در مورد احتمال ایجاد
 حساسیت، مسمومیت یا بیماری‌زایی در نتیجه 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
 میکرورها معمولاً قابلیت ایجاد واکنش‌های حساسیت‌زا را
 دارا هستند، بر لزوم آزمایش‌های دقیق در این زمینه تاکید
 می‌شود. نتایج مطالعه ما ترکیبات آلی فرآر *T. asperellum*
 را به‌عنوان یک مکانیسم تدخینی بالقوه برای کنترل
 پوسیدگی بوتریتیسی پس از برداشت میوه توت‌فرنگی
 معرفی می‌کند. با این وجود، تاحصول اطمینان از عدم
 مخاطرات احتمالی برای سلامتی انسان و محیط زیست،
 آزمایش‌های بیشتری مورد نیاز خواهد بود.

جنس *Tuber* گزارش شده بود (Mauriello et al.)
 2004)، ولی گزارشی از بررسی نقش بیولوژیکی آن در
 دست نیست. ترکیب پارا-منا-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 مؤثر بودن آن‌ها برای مهار *B. cinerea* عامل کپک
 خاکستری توت‌فرنگی، در آزمایش مشابهی اثبات گردیده
 بود (Hung et al. 2011). باین وجود، ترکیب فنیل اتیل
 الکل در آزمایش‌های ما اثر بازدارندگی مناسبی بر رشد
 میسلیموم یا جوانه‌زنی کنیدیوم نشان نداد. از این شش
 ترکیب، فنیل اتیل الکل قبلاً از *T. atroviride*
 (Stoppocher et al. 2010) گزارش شده بود و بقیه برای
 اولین بار از یک گونه تریکودرما گزارش می‌شوند.
 بنابر گزارش اداره ایمنی مواد غذایی اروپا

REFERENCES

- Barnett HL, Hunter BB** (1998) Illustrated genera of imperfect fungi. 4^{ed}. APS Press, Saint Paul, Minnesota, USA.
- Behdad M, Etemadi N, Behdad E, Zeinali H** (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 RW, Bartz JA, Xiao CL, Legard DE** (2001) Control of postharvest Botrytis fruit rot with pre-harvest fungicide applications in annual strawberry. Plant Disease 85: 597-602.
- Boff P, Köhl J, Jansen M, Horsten, PJFM, Lombaers-van der Plas C, Gerlagh M** (2002) Biological control of gray mold with *Ulocladium atrum* in annual strawberry crops. Plant Disease 86: 220-224.
- Bogumil A, Paszt LS, Lisek A, Trzciński P, Harbuzov H** (2013) Identification of new Trichoderma strains with antagonistic activity against *Botrytis cinerea*. Folia Horticulturae 25: 123-132.
- Braun G, Vailati M, Prange R, Bevis E** (2012) Muscodor albus volatiles control toxigenic fungi under controlled atmosphere (CA) storage conditions. International Journal of Molecular Sciences 13: 15848-15858.
- Choquer M, Fournier E, Kunz C, Levis C, Pradier JM, Simon A, Viaud M** (2007) Botrytis cinerea virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. FEMS Microbiology Letters 227: 1-10.
- Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N** (2007) Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems-an introduction, In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (ed.), Botrytis: Biology, pathology and control. Springer, Dordrecht, the Netherlands. pp. 1-16.
- Huang R, Li GQ, Zhang J, Yang L, Che HJ, Jiang DH, Huang HC** (2011) Control of postharvest Botrytis fruit rot of strawberry by volatile organic compounds of *Candida intermedia*. Phytopathology 101: 859-869.
- Hung R, Lee S, Bennett JW** (2013) *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of Trichoderma volatile organic compounds. Fungal Ecology 6: 19-26.
- Ju KH, Lee SH, Kim CS, Lim EK, Choi KH, Kong HG, Kim DW, Lee SW, Moo BJ** (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 OA, Tezcan H, Daus A, Cohen L, Wiess B, Droby S** (2004) Control of preharvest and postharvest fruit rot in strawberry by *Metschnikowia fructicola*. Biocontrol Science and Technology 14: 513-521.
- Kulakiotu EK, Thanassouloupoulos CC, Sfakiotakis EM** (2004a) Biological control of *Botrytis cinerea* by volatiles of 'Isabella' grapes. Phytopathology 94: 924-931.
- Kulakiotu EK, Thanassouloupoulos CC, Sfakiotakis EM** (2004b) Postharvest biological control of *Botrytis cinerea* on kiwifruit by volatiles of 'Isabella' grapes. Phytopathology 94: 1280-1285.

- Lima G, Ippolito A, Nigro F, Salerno M** (1997) Effectiveness of *Aureobasidium pullulans* and *Candida oleophila* against postharvest strawberry rots. *Postharvest Biology and Technology* 10: 169-178.
- Liu XM, Zhang H** (2015) The effects of bacterial volatile emissions on plant abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science* 6: 774.
- Mercier J, Jiménez JI** (2004) Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biology and Technology* 31: 1-8.
- Mercier J, Smilanick JL** (2005) Control of green mold and sour rot of stored lemon by biofumigation with *Muscodor albus*. *Biological Control* 32: 401-407.
- Morath SU, Hung R, Bennett, JW** (2012) Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. *Fungal Biology Reviews* 26: 73-83.
- Mauriello G, Marino R, DAuria M, Cerone G, Rana GL** (2004) Determination of volatile organic compounds from truffles via SPME-GC-MS. *Journal of Chromatographic Science* 42: 299-305.
- Nazmi F** (2006) Identification of *Trichoderma* species in southern shores of caspian sea. Degree of Master of Science. Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
- Nemčovič M, Jakubíková L, Viden I, Farkaš V** (2008) Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. *FEMS Microbiology Letters* 284: 231-236.
- Schnabel G, Mercier J** (2006) Use of a *Muscodor albus* pad delivery system for the management of brown rot of peach in shipping cartons. *Postharvest Biology and Technology* 42: 121-123.
- Siddiquee S, Cheong BE, Taslima K, Kausar H, Hasan MM** (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, Kluger B, Zeilinger S, Krska R, Schuhmacher R** (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 JC, Li DW, Peng G, Yu H, Zhang PG, Valdebenito-Sanhueza RM** (1997) *Gliocladium roseum*: A versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease* 81: 316-328.
- Tronsmo A, Dennis C** (1977) The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 83: 449-455.
- Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti EL, Marra R, Barbetti MJ, Li H, Woo SL, Lorito M** (2008) A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 72: 80-86.
- Wan MG, Li GQ, Zhang JB, Jiang DH, Huang HC** (2008) Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biological Control* 46: 552-559.
- Wheatley R, Hackett C, Bruce A, Kundzewicz A** (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, Wallace BA** (2004) The Peptaibol database: a database for sequences and structures of naturally occurring peptaibols. *Nucleic Acids Research* 32(Database issue): D593-D594.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL** (2007) *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8: 561-580.
- Wszelaki AL, Mitcham EJ** (2003) Effect of 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.
- Zhang HY, Wang L, Dong Y, Jiang S, Cao J, Meng RJ** (2007) Postharvest biological control of gray mold decay of strawberry with *Rhodotorula glutinis*. *Biological Control* 40: 287-292.