

استخراج و شناسایی متابولیت‌های ثانویه (6022) *Trichoderma atroviridae* و بررسی اثرات

ضدقارچی آنها

مائه شهیری طبرستانی^۱ - کامران رهنما^{۲*} - محسن جهانشاهی^۳ - سعید نصرالله نژاد^۴ - محمدحسین فاطمی^۵

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۰۵/۱۸

چکیده

فعالیت ضدقارچی جدایه (6022) *Trichoderma atroviridae* در برابر قارچ‌های بیمارگر خاکزاد *Macrophomina phaseolina* و *Sclerotinia sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاه، مورد بررسی قرار گرفت. در آزمون کشت متقابل، جدایه آنتاگونیست به سرعت، رشد قارچ‌های بیمارگر را متوقف نمود. متابولیت‌های فرار جدایه آنتاگونیست در کشت همزمان، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته در برابر قارچ‌های بیمارگر، اثرات بازدارندگی چشمگیری نشان دادند که با گذشت زمان و مسن تر شدن پرگنه قارچ تریکودرما، میزان تولید این متابولیت‌ها افزایش و در نتیجه اثرات بازدارندگی بیشتری مشاهده شد. غلظت‌های مختلف متابولیت‌های غیرفرار استخراج شده از محیط غذایی مایع و توده قارچی، توانستند به خوبی رشد میسیلیومی و تولید اسکروتوت قارچ‌های بیمارگر را کنترل نمایند. متابولیت‌های غیرفرار استخراجی از توده قارچی، بازدارندگی بهتری نشان دادند و توانستند در غلظت ۱۵ درصد به ترتیب تا ۸۷/۶۲ و ۱۰۰ درصد از رشد *M. phaseolina* و *S. sclerotiorum* جلوگیری نمایند. از طریق چهار فرایند ساده آزمایشگاهی جهت استخراج (با حلال‌های آلی آن-هگزان و متانول؛ تکنیک Headspace و سوکسله توده قارچی) و با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی، ۶۱ ترکیب متابولیت ثانویه شناسایی شدند که بیشتر آن‌ها از گروه آلکان‌ها بودند. کلیه ترپنوئیدهای شناسایی شده در این بررسی، فقط در تکنیک Headspace مشاهده شدند. از ترکیبات ضدقارچی شناسایی شده در این جدایه، ۱-پنتانول، ایزوآمیل الکل و ۲-اتیل-۱-هگزانول؛ پالمیتیک اسید و استیریک اسید؛ بیس (۲-اتیل هگزیل) فتالات و دی-ان-کتیل فتالات می‌باشند. وجود این ترکیبات، اثرات ضدقارچی متابولیت ثانویه را توجیه می‌نماید. این تحقیق برای اولین بار در ایران انجام می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: GC/MS، *Macrophomina phaseolina*، *Sclerotinia sclerotiorum*

مقدمه

تولید آنتی‌بیوتیک نقش مهمی در کارکرد بیولوژیک دارد. متابولیت‌های ثانویه با فعالیت آنتی‌بیوتیکی در تریکودرما به دو دسته اصلی تقسیم می‌شوند. متابولیت‌های فرار با وزن مولکولی پایین که در تعاملات پیچیده گیاه و عامل بیماری‌زا شرکت دارند و به چندین گروه شیمیایی نظیر مونو و سسکوئی‌ترپن‌ها، الکل‌ها، آلکان‌ها، آلدی‌دها، ترکیبات آروماتیک، فوران‌ها، کتون‌ها، لاکتون‌ها، استرها و تعدادی از پلی‌کتیدها نظیر پیرون‌ها و بوتنولیدها، ترپن‌های فرار و متابولیت‌های ایزوسیانیدی تعلق دارند. اکثر این ترکیبات نسبتاً غیر قطبی هستند و فشار بخار بالایی دارند، لذا می‌توانند به راحتی در محیط خاک حرکت و بر فیزیولوژی عامل بیمارگر اثر بگذارند. دسته دیگر، متابولیت‌ها با وزن مولکولی بالا (نظیر پپتیدول‌ها) می‌باشند. این ترکیبات قطبی به وسیله‌ی تماس مستقیم بین گونه‌های تریکودرما و بیمارگرها عمل می‌کنند (۳، ۱۷، ۱۹، ۲۳ و ۳۰).

متابولیت‌های فرار در تعدادی از جدایه‌های *T. atroviride*، *T. longibrachiatum*، *T. viride*، *harzianum* و *pseudokoningii* شناسایی شده است. این ترکیبات در یک گونه یا جدایه مشخص بسته به دوره رشدی، نوع مواد مغذی، دما و سایر پارامترهای محیطی، متفاوتند (۱۶ و ۲۷).

قارچ‌ها دامنه وسیعی از متابولیت‌های ثانویه تولید می‌نمایند. این ترکیبات به طور مستقیم برای رشد مورد نیاز نمی‌باشند، اما در فعالیتهای مختلف زیستی نقش مهمی دارند (۲۵ و ۳۲). گونه‌های تریکودرما منبع غنی از متابولیت‌های ثانویه و از شناخته‌شده‌ترین عوامل بیوکنترول قارچی هستند که به عنوان قارچ‌کش و کودهای بیولوژیکی در گلخانه و مزرعه، با موفقیت مورد استفاده قرار می‌گیرند. این گونه‌ها، در تعاملات آنتاگونیستی با سازوکار آنتی‌بیوز (از طریق تولید بسیاری از ساختارها با فعالیت آنتی‌بیوتیکی)، مایکوپارازیتسم، رقابت جهت مواد مغذی، فعالیت آنزیم‌های تجزیه‌کننده دیواره سلولی و القای مقاومت سیستمیک، ایفای نقش می‌کنند که در این میان،

۱- استادیار گروه کشاورزی دانشگاه پیام نور، تهران- ایران

۲- دانشیار بخش گیاهپزشکی، دانشکده تولید گیاهی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

(*) نویسنده مسئول: (Email: amranrahnama1995@gmail.com)

۳- پژوهشکده نانو تکنولوژی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، مازندران، ایران

۵- گروه شیمی، دانشگاه مازندران، بابل، ایران

کشت، یک حلقه از حاشیه پرگنه قارچ برداشته و روی محیط غذایی PDA^۱ کشت داده شد و پس از تست بیماری‌زایی مورد استفاده قرار گرفت.

قارچ *Trichoderma atroviridae* جدایه 6022 که در این تحقیق مورد مطالعه قرار گرفت، از کلکسیون قارچ‌شناسی آزمایشگاه بیماری‌شناسی گیاهی دانشکده تولیدات گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان دریافت شده است. این جدایه از خاک مزارع جالیز (طالبی و خربزه) استان خراسان رضوی جداسازی و توسط رهنما و همکاران شناسایی شده بود (۲۱). کشت تک اسپور این جدایه بر روی محیط غذایی PDA تهیه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و به‌عنوان منبع ماده فعال بیولوژیک استفاده شد.

ارزیابی فعالیت آنتاگونیستی جدایه تریکودرما

به‌منظور اثبات قدرت آنتاگونیستی جدایه تریکودرما از سه آزمون استفاده شد:

۱- آزمون کشت متقابل

یک دیسک هفت میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه جدایه قارچ‌های بیمارگر و یک دیسک هفت میلی‌متری از حاشیه فعال پرگنه جدایه قارچ تریکودرما در دو طرف تشتک پتری به فاصله ۱/۵ سانتی‌متر از حاشیه تشتک دارای PDA کشت داده شدند. تشتک‌ها به مدت چهار روز در دمای 28 ± 1 درجه سانتی‌گراد در تاریکی نگهداری شدند. در تیمار شاهد از دیسک هفت میلی‌متری محیط غذایی PDA استفاده شد. میزان بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در مقایسه با شاهد بر اساس فرمول یک محاسبه و یادداشت گردید. آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام گرفت و آزمایش دو بار تکرار شد (۳۵).

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

IG = درصد بازدارندگی از رشد میسیلیومی بیمارگر

C = قطر پرگنه قارچی بیمارگر در شاهد

T = قطر پرگنه قارچی بیمارگر در تیمار

۲- بررسی اثر متابولیت‌های فرار جدایه تریکودرما بر رشد

پرگنه قارچ‌های بیمارگر

این آزمایش در چهار حالت و به شرح زیر انجام گرفت:

۱- کشت همزمان قارچ‌های بیمارگر با جدایه تریکودرما

۲- کشت تریکودرما ۲۴ ساعت قبل از قارچ‌های بیمارگر

۳- کشت تریکودرما ۴۸ ساعت قبل از قارچ‌های بیمارگر

۴- کشت تریکودرما ۷۲ ساعت قبل از قارچ‌های بیمارگر

شناسایی متابولیت‌های فرار قارچی با دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی^۱ (به‌دلیل قدرت جداسازی و حساسیت بالای تشخیصی) انجام می‌گیرد (۲۲ و ۳۲). بدین منظور، پس از کشت قارچ‌ها در محیط غذایی مایع یا جامد، می‌توان ترکیبات فرار را به روش‌های مختلفی از جمله با استفاده از حلال‌های آلی یا استخراج فاز جامد^۲ با استفاده از ستون‌های سیلیکاژل یا C_{۱۸} جداسازی نمود (۳۰). شناسایی ترکیب از طریق مقایسه طیف‌های جرمی با طیف‌های کتابخانه‌ای یا بر اساس مقایسه‌ی زمان‌های ماند و طیف‌ها با استانداردهای شناخته شده، انجام می‌گیرد (۱۵).

در سال‌های اخیر، در زمینه شناسایی متابولیت‌های ثانویه گونه‌های تریکودرما و بررسی اثرات ضدقارچی آن‌ها مطالعات مختلفی در سایر کشورها انجام گرفته است (۸، ۱۸، ۲۵، ۲۷، ۳۱، ۳۳، ۳۴، ۳۶ و ۳۷).

در کشورمان سابقه مطالعاتی مناسبی در ارتباط با قارچ تریکودرما، در زمینه شناسایی گونه‌های موجود در ایران و پراکندگی آنها در نواحی مختلف (۲۶) و دامنه بیمارگرهای گیاهی مرتبط با آنها اعم از بیمارگرهای قارچی خاکزاد مانند *Rhizoctonia solani* (۲۰)، *Pythium sp.* (۲ و ۱۱) و *Macrophomina phaseolina* (۱) (۳۵ و ۹) بیمارگرهای قارچی غیرخاکزاد (۱۳ و ۱۴) وجود دارد. علاوه بر بررسی روابط آنتاگونیستی تریکودرما بر بیمارگرهای مختلف، در زمینه متابولیت‌های این قارچ به ویژه آنزیم‌های کیتیناز، گلوکاناز و سلولاز نیز، مطالعاتی صورت گرفته است (۱۰ و ۳۸). اما در زمینه شناسایی متابولیت‌های ثانویه گونه‌های تریکودرما به‌وسیله‌ی دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی و تکنیک Headspace، تحقیق مبسوطی صورت نگرفته است. در این تحقیق اثرات ضدقارچی متابولیت‌های ثانویه، جدایه *Trichoderma atroviridae* (6022) که در مطالعات قبلی جهت کنترل بیولوژیک بیمارگرهای قارچی مختلف موفق عمل نمود (۲ و ۱۰)، مورد بررسی قرار گرفت و متابولیت‌های ثانویه آن با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی و تکنیک Headspace شناسایی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه جدایه‌های بیمارگر و آنتاگونیست

قارچ *Sclerotinia* و *Macrophomina phaseolina* از مرکز تحقیقات کشاورزی استان مازندران - بخش آفات و بیماری‌های گیاهی، دریافت شد. این قارچ‌ها به ترتیب از ساقه‌های سویای آلوده به بیماری پوسیدگی ذغالی و ساقه‌های کلزای آلوده به بیماری پوسیدگی سفید جداسازی شده بودند. به‌منظور تجدید

1- Gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS)

2- Solid phase extraction

3- Potato dextrose agar

آماری قرار گرفت (۳۶).

استخراج و شناسایی متابولیت‌های ثانویه جدایه تریکودرما

به منظور استخراج و شناسایی متابولیت‌های ثانویه جدایه تریکودرما مطابق روش روش وینال و همکاران (۳۶) ابتدا محیط غذایی مایع یک-پنجم قدرت PDB در ارلن مایر تهیه و پس از استریل نمودن آن با اتوکلاو، دو دیسک هفت میلی‌متری از حاشیه پرگنه پنج روزه جدایه تریکودرما در آن کشت داده شد. ۳۱ روز پس از نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، محیط غذایی به‌وسیله‌ی قیف بوخنر تحت شرایط خلأ با کاغذ واتمن شماره چهار صاف و مایع صاف شده جهت بررسی‌های بعدی در دمای دو درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. استخراج متابولیت‌های ثانویه براساس روش سی‌دی‌کویی و همکاران (۲۷)، با استفاده از حلال‌های آلی‌ان-هگزان و متانول انجام و جهت شناسایی متابولیت‌های ثانویه، از دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی استفاده شد.

توده قارچی جدایه تریکودرما که بر روی کاغذ صافی باقی ماند، به مدت یک هفته در معرض هوا خشک شد. سپس پودر آن داخل کارتوش قرار گرفت و به‌وسیله حلال متانول، طی سه روز متوالی سوکسله شد تا مواد مؤثره آن استخراج شود. متانول موجود در عصاره حاصل، توسط روتاری تحت خلأ با دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، تبخیر شد. مقداری از عصاره قرمز قهوه‌ای حاصل جهت شناسایی متابولیت‌های مؤثر به دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی تزریق شد (۸). به منظور بررسی اثر عصاره توده قارچی حاصل از سوکسله، از صافی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد و غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ درصد محلول پایه با محیط غذایی PDA استریل، تهیه گردید. جهت تیمار شاهد از غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد آب مقطر استریل با محیط غذایی PDA استریل استفاده شد. پس از بستن محیط غذایی، دیسک هفت میلی‌متری قارچ بیمارگر در وسط تشتک کشت شد. تشتک‌ها در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری و پس از ۹۶ ساعت، میزان تولید اسکروت و قطر پرگنه قارچ بیمارگر، اندازه‌گیری و با تیمار شاهد مقایسه گردید. در نهایت درصد بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در این مدت براساس فرمول یک محاسبه شد. آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام و داده‌های بدست آمده از آزمایشات، با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد به‌وسیله نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

متابولیت‌های ثانویه با نقطه جوش کمتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از تکنیک Headspace و دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی شناسایی شدند. جهت بررسی، دیسک هفت میلی‌متری از

در این آزمون بر اساس روش دنیس و وبستر (۷) از روش تشتک‌های روی هم استفاده شد، به‌طوری‌که تشتک حاوی قارچ بیمارگر در بالا و تشتک حاوی جدایه تریکودرما در پایین قرار گرفت. دور تشتک‌های روی هم قرار گرفته با پارافیلیم به‌خوبی مسدود شد تا ارتباط دو ظرف با محیط خارج به‌طور کامل قطع شده و از خروج ترکیبات فرار به خارج جلوگیری گردد. در تیمارهای شاهد نیز به‌جای استفاده از جدایه تریکودرما (در تشتک پایینی) از دیسک دارای محیط غذایی PDA استفاده شد. ظروف تشتک در انکوباتور با دمای 1 ± 28 درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و پس از ۹۶ ساعت قطر پرگنه قارچ بیمارگر و میزان تولید اسکروت در تیمارهای مختلف، اندازه‌گیری و با تیمار شاهد مقایسه شد. در نهایت درصد بازدارندگی از رشد شعاعی بیمارگر در این مدت براساس فرمول یک محاسبه و یادداشت شد. آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد (۷).

۳- بررسی اثر متابولیت‌های غیر فرار جدایه تریکودرما بر رشد پرگنه قارچ‌های بیمارگر

دو دیسک هفت میلی‌متری از حاشیه پرگنه پنج روزه جدایه *T. atroviridae* (6022) روی محیط غذایی PDA برداشته شد و در شرایط استریل در ارلن مایر یک لیتری حاوی ۵۰۰ میلی‌لیتر محیط غذایی مایع یک-پنجم قدرت PDB^۱ استریل کشت داده شد. محیط غذایی، در شرایط سکون و دمای 1 ± 26 درجه سانتی‌گراد و شرایط ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی به مدت ۳۰ روز نگهداری شد و سپس تحت شرایط خلأ از کاغذ صافی (واتمن شماره چهار) عبور داده شد و عصاره حاصل در دمای دو درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد (۳۶). متابولیت استخراجی به‌وسیله فیلتر میلی‌پور ۰/۲۲ میکرون، استریل شد. غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد محلول پایه با محیط غذایی PDA استریل تهیه گردید. جهت تیمار شاهد از غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد آب مقطر استریل با محیط غذایی PDA استریل، استفاده شد. پس از انعقاد محیط کشت، قرص‌هایی به قطر هفت میلی‌متر از پرگنه پنج روزه قارچ‌های بیمارگر جدا و در مرکز هر یک از تشتک‌های فوق قرار داده شد. برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. قطر رشد پرگنه قارچ و میزان تولید اسکروت، چهار روز پس از نگهداری در دمای 1 ± 26 درجه سانتی‌گراد، اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری نسبت به شاهد طبق رابطه یک محاسبه گردید. آزمون در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. داده‌های بدست آمده از آزمایشات، با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال یک درصد به‌وسیله نرم افزار SAS مورد تجزیه و تحلیل

1- One-fifths strength potato dextrose broth

متوقف نمودن رشد قارچ‌های بیمارگر، شروع به پیشروی و اسپورزایی بر روی ریشه‌های قارچ‌های بیمارگر نمود (شکل ۱). به‌طوری‌که میزان بازدارندگی از رشد میسیلیومی *M. phaseolina* و *S. sclerotiorum* چهار روز پس از کشت، به ترتیب ۸۴/۱۶ و ۸۹ درصد بود.

نتایج بررسی اثر متابولیت‌های فرار جدایه تریکودرما بر

رشد پرگنه قارچ‌های بیمارگر

درصد بازدارندگی متابولیت‌های فرار جدایه آنتاگونیست، در کشت همزمان، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته در برابر قارچ بیمارگر *M. phaseolina* به ترتیب، ۴۸/۵۷، ۹۰، ۹۰ و ۸۵/۷۱ درصد (جدول ۱) و در برابر قارچ بیمارگر *S. sclerotiorum* نیز به ترتیب ۳۳/۳۳، ۱۰۰، ۹۰ و ۹۰ درصد بوده است (جدول ۲). در هیچ کدام از تیمارها تولید اسکروت، مشاهده نشد (شکل ۲ و ۳).

بررسی اثر متابولیت‌های غیرفرار جدایه تریکودرما بر

رشد پرگنه قارچ‌های بیمارگر

اثر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های غیرفرار جدایه آنتاگونیست بر رشد میسیلیومی *M. phaseolina* و *S. sclerotiorum* در جدول ۳ و ۴ نشان داده شده است. مطابق این جداول، همه‌ی غلظت‌های مورد استفاده، توانستند از رشد میسیلیومی قارچ‌های بیمارگر جلوگیری نمایند. درصد بازدارندگی از ۱۰/۹۵ تا ۶۹/۹۹ متغیر بود. با افزایش غلظت عصاره در هر تشتک، درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ بیمارگر نیز افزایش یافت و با توجه به کاهش رشد میسیلیومی قارچ‌های بیمارگر، میزان تولید اسکروت نیز کاهش یافت اما هیچ کدام از غلظت‌ها، نتوانستند مانع از تشکیل اسکروت شوند.

نتایج استخراج و شناسایی متابولیت‌های ثانویه جدایه

تریکودرما

متابولیت‌های ثانویه جدایه تریکودرما که براساس چهار فرایند استخراج با حلال‌های آلی ان-هگزان و متانول؛ تکنیک Headspace و همچنین استخراج از توده قارچی، با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی شناسایی شدند، در جدول ۷ آمده‌اند. در مجموع ۶۱ ترکیب شناسایی شدند که ۲۱ ترکیب از آلکان‌ها، ۱۴ ترکیب از استرها، هشت ترکیب از ترپنوئیدها، پنج ترکیب از ترکیبات حلقوی، چهار ترکیب از آلکن‌ها، چهار ترکیب از اسیدهای آلی، یک ترکیب از ترکیبات آروماتیک و یک ترکیب نیز از ترکیبات حاوی نیتروژن و گوگرد بوده‌اند.

میسیلیوم قارچی کشت پنج روزه جدایه تریکودرما روی محیط غذایی PDA، تهیه و در شرایط استریل روی سطح مورب محیط غذایی PDA استریل، درون ویال‌های Headspace، قرار داده شد. ویال‌ها در غیاب نور در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج روز نگهداری شدند. سپس جهت شناسایی متابولیت‌های ثانویه با نقطه جوش کمتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد، ویال‌ها به دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی متصل گردید (۳۰).

شرایط دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی

دستگاه کروماتوگرافی گازی Agilent مدل 7890 A مجهز به طیف‌سنج جرمی Agilent سری C 5975 (ساخت ایالات متحده)، با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و ستون ناقطبی DB-5 به طول ۶۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرون مورد استفاده قرار گرفت. گاز هلیوم هم با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه به‌عنوان گاز حامل به‌کار گرفته شد. برنامه دمایی آون به شرح ذیل بود:

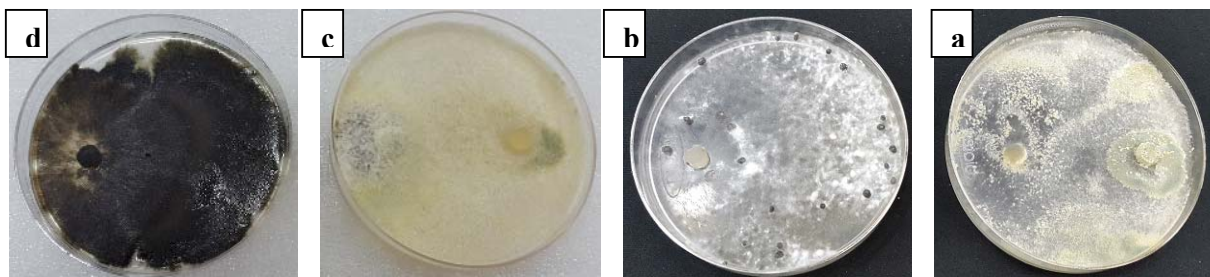
ابتدا در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه ثابت نگه داشته شد سپس با سرعت پنج درجه بر دقیقه، به دمای ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت و در این دما به مدت ۲۰ دقیقه، ثابت نگه داشته شد. درجه حرارت محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و دمای ترانسفر لاین ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. برنامه دمایی آون در تکنیک Headspace به شرح ذیل بود:

ابتدا در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه ثابت نگه داشته شد سپس با سرعت ۱۰ درجه بر دقیقه، به دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. پس از آن با سرعت ۲۵ درجه به دمای ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافته و در این دما به مدت ۲۵ دقیقه، ثابت نگه داشته شد. درجه حرارت محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم گردید. در HS-Inj، حجم بخار تزریق شده ۲۰۰۰ میکرولیتر، سرعت به‌همزدن ۵۰۰ rpm، دمای سرنگ ۸۵ درجه سانتی‌گراد، دمای محفظه ۹۰ درجه سانتی‌گراد و زمان جمع‌آوری بخارات ۱۰ دقیقه بود. شناسایی طیف‌ها به کمک بانک اطلاعات جرمی، مطالعه طیف‌های جرمی هریک از اجزای عصاره و بررسی الگوهای شکست آنها و مقایسه آنها با طیف‌های استاندارد صورت گرفت. درصد کمی هر ترکیب نیز با محاسبه سطوح زیر منحنی در کروماتوگرام‌ها محاسبه شد.

نتایج

آزمون کشت متقابل

نتایج حاصل از این آزمون نشان داد که جدایه آنتاگونیست بعد از



شکل ۱- کشت متقابل جدایه تریکودرما (دیسک سمت راست (a و c) در برابر *S. sclerotiorum* (دیسک سمت چپ a) و *M. phaseolina* (دیسک سمت چپ c) در مقایسه با شاهد (b و d).

Figure 1- Dual culture of *Trichoderma* isolate (right disc in a and c) against *S. sclerotiorum* (left disc in a) and *M. phaseolina* (left disc in c) in comparison to control (b and d)

جدول ۱- میانگین درصد بازدارندگی متابولیت‌های فرار کشت همزمان، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته جدایه تریکودرما در برابر رشد قارچ *M. phaseolina*
Table 1- Mean inhibition percent of *Trichoderma* isolate volatile metabolites in 24, 48, 72 h and Co-cultures on *M. phaseolina*

تیمار	کشت همزمان	Std	کشت ۲۴ ساعته	Std	کشت ۴۸ ساعته	Std	کشت ۷۲ ساعته	Std
Treatment	Co-culture		24h culture		48h culture		72h culture	D
تیمار	48.57 b	8.78	90.00a	0	90.00a	0	85.71 a	0
شاهد	0 c	0	0 c	0	0 c	0	0 c	0
Control								

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$)



شکل ۲- اثر متابولیت‌های فرار جدایه تریکودرما در کشت همزمان (a)، ۲۴ (b)، ۴۸ (c) و ۷۲ (d) ساعته، بر رشد پرگنه و تولید اسکروت (e) *M. phaseolina* در مقایسه با شاهد (e)

Figure 2- Effect of *Trichoderma* isolate volatile metabolites in 24(b), 48 (c), 72 h (d) and Co-cultures (a) on *M. phaseolina* colony growth and sclerotia production in comparison to control (e)

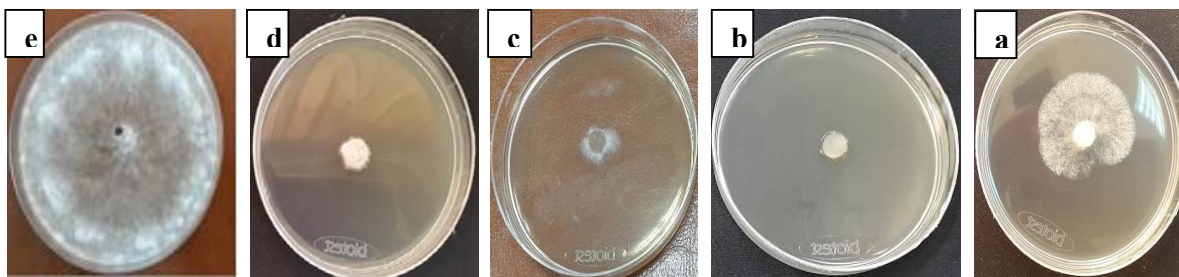
جدول ۲- میانگین درصد بازدارندگی متابولیت‌های فرار کشت همزمان، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعته جدایه تریکودرما در برابر رشد قارچ *S. sclerotiorum*

Table 2- Mean inhibition percent of *Trichoderma* isolate volatile metabolites in 24, 48, 72 h and Co-cultures on *S. sclerotiorum*

تیمار	کشت همزمان	Std	کشت ۲۴ ساعته	Std	کشت ۴۸ ساعته	Std	کشت ۷۲ ساعته	Std
Treatment	Co-culture		24h culture		48h culture		72h culture	
تیمار	33.33 b	10.94	100.00a	0	90.00a	0	90.00a	0
شاهد	0 c	0	0 c	0	0 c	0	0 c	0
Control								

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$)



شکل ۳- اثر متابولیت‌های فرار جدایه تریکودرما در کشت هم‌زمان (a)، ۲۴ (b)، ۴۸ (c) و ۷۲ (d) ساعته، بر رشد پرگنه و تولید اسکلوئوت S. sclerotiorum در مقایسه با شاهد (e)

Figure 3- Effect of *Trichoderma* isolate volatile in 24(b), 48 (c), 72 h (d) and Co-cultures (a) on *S. sclerotiorum* colony growth and sclerotia production in comparison to control

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های غیرفرار جدایه تریکودرما در برابر رشد قارچ *M. phaseolina*

Table 3- Effect of different concentrations of *Trichoderma* isolate non volatile metabolites on *M. phaseolina*

غلظت عصاره در هر تشتک (%)	میانگین قطر پرگنه (mm)	Std	میانگین درصد بازدارندگی	Std
Concentration of extract in each plate (%)	Mean of colony diameter (mm)		Mean of inhibition percent	
10	62.33 a	2.52	10.95 b	3.59
20	44.00 b	8.71	37.47 a	13.02
30	36.00 b	3.60	48.57 a	5.15
10 شاهد (control)	70 a	0	0 b	0
20 شاهد (control)	70 a	0	0 b	0
30 شاهد (control)	70 a	0	0 b	0

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$)

جدول ۴- اثر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های غیرفرار جدایه تریکودرما در برابر رشد قارچ *S. sclerotiorum*

Table 4- Effect of different concentrations of *Trichoderma* isolate non volatile metabolites on *S. sclerotiorum*

غلظت عصاره در هر تشتک (%)	میانگین قطر پرگنه (mm)	Std	میانگین درصد بازدارندگی	Std
Concentration of extract in each plate (%)	Mean of colony diameter (mm)		Mean of inhibition percent	
10	50.00 b	2	28.57 c	2.85
20	36.33 c	3.21	48.09 b	4.59
30	21.00 d	3.60	69.99 a	5.15
10 شاهد (control)	70 a	0	0 d	0
20 شاهد (control)	70 a	0	0 d	0
30 شاهد (control)	70 a	0	0 d	0

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$)

۲-متیل-تری‌دکان (۴۴/۷۲ درصد)، ان-پنتادکان (۲۳/۴۷ درصد)، دودکان (۱۶/۵۵ درصد)، ایزودکان (۱۳/۴۶ درصد)، ان-آن‌دکان (۱۲/۶۵ درصد)، ان-دکان (۹/۵۸ درصد) و هگزادکان (۸/۹۷ درصد) می‌باشد.

اثر غلظت‌های مختلف عصاره توده قارچی حاصل از سوکسله

۱۱ ترکیب با تکنیک Headspace جداسازی شدند که بیشترین مقادیر به ترتیب شامل ایزوآمیل‌الکل (۱۰/۷۱ درصد)، پنتانول (۹/۳۷ درصد)، دی-ال-لیمونن (۷/۶۵ درصد) و سمبرن (۵/۵۲ درصد) می‌باشد (جدول ۷). ترکیبات شناسایی شده با فراوانی بیشتر در هر گروه به صورت پررنگ در جدول مشخص شده که در آلکان‌ها شامل:

جدایه آنتاگونیست بر رشد میسیلیومی *M. phaseolina* و *S. sclerotiorum* در جدول ۵ و ۶ نشان داده شده است.

جدول ۵- اثر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های ثانویه استخراجی از توده قارچی جدایه تریکودرما در برابر *M. phaseolina*

Table 5- Effect of different concentrations of *Trichoderma* isolate secondary metabolites extracted from mycelial mass on *M. phaseolina*

غلظت عصاره در هر تشتک (%)	میانگین قطر پرگنه (mm)	Std	میانگین درصد بازدارندگی	Std
Concentration of extract in each plate (%)	Mean of colony diameter (mm)		Mean of inhibition percent	
5	28.33 b	5.02	59.52 b	13.02
10	12.00 c	2.86	82.85 a	5.15
15	8.67 c	2.18	87.62 a	3.59
5 شاهد (control)	70 a	0	0 c	0
10 شاهد (control)	70 a	0	0 c	0
15 شاهد (control)	70 a	0	0 c	0

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$)

جدول ۶- اثر غلظت‌های مختلف متابولیت‌های ثانویه استخراجی از توده قارچی جدایه تریکودرما در برابر *S. sclerotiorum*

Table 6- Effect of different concentrations of *Trichoderma* isolate secondary metabolites extracted from mycelial mass on *S. sclerotiorum*

غلظت عصاره در هر تشتک (%)	میانگین قطر پرگنه (mm)	Std	میانگین درصد بازدارندگی	Std
Concentration of extract in each plate (%)	Mean of colony diameter (mm)		Mean of inhibition percent	
5	10.67 b	1.15	84.76 b	1.65
10	0 c	0	100.00 a	0
15	0 c	0	100.00 a	0
5 شاهد (control)	70 a	0	0 c	0
10 شاهد (control)	70 a	0	0 c	0
15 شاهد (control)	70 a	0	0 c	0

اعداد با حروف مشترک در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0.01$) نمی‌باشند

Numbers followed by the same letter are not significantly differentns ($P < 0.01$)

معنی‌داری از نظر آماری نداشتند. این نتایج با مطالعات واصبی و همکاران هم‌خوانی دارد (۳۰ و ۳۵).

در استخراج متابولیت‌های ثانویه جدایه تریکودرما با حلال آلی ان-هگزان و متانول، ۱۹ ترکیب با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی شناسایی شدند. بیشتر این ترکیبات از گروه آلکان‌ها می‌باشند که در بین آنها ۲- متیل-تری‌دکان (۴۴/۷۲ درصد) بیشترین فراوانی را داراست. تعداد زیادی از این آلکان‌ها توسط سی‌دی کویی و همکاران (۲۷ و ۲۸) گزارش شده بود. از آن‌جا که اکثر ترکیبات آلی فرار از ترکیبات غیر قطبی می‌باشند، شناسایی تعداد زیادی از ترکیبات غیر قطبی، نظیر آلکان‌ها و آلکن‌ها دور از انتظار نمی‌باشد (۱۸ و ۲۸). همچنین با توجه به اینکه در دستگاه گاز کروماتوگرافی جرمی از ستون ناقطبی استفاده شد، این امر قابل توجیه است.

در ترکیبات شناسایی شده با تکنیک Headspace، ۱۱ ترکیب شناسایی شد که اکثر این ترکیبات از ترپنوئیدها و الکل‌ها

بحث

در این پژوهش، اثرات ضدقارچی متابولیت‌های ثانویه جدایه *T. atroviridae* (6022)، بر رشد میسیلیومی قارچ‌های بیمارگر *M. phaseolina* و *S. sclerotiorum* مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد، این جدایه در آزمون‌های کشت متقابل، اثر متابولیت-های فرار و غیرفرار، به‌خوبی توانست در شرایط آزمایشگاه رشد میسیلیومی قارچ‌های بیمارگر را کنترل نماید. اثرات ضدقارچی متابولیت‌های ثانویه گونه‌های مختلف تریکودرما بر قارچ‌های بیمارگر گیاهی، توسط محققان مختلف به اثبات رسیده است (۸، ۲۹، ۳۱ و ۳۶).

نتایج آزمون تولید مواد فرار ضد قارچی در این تحقیق نشان داد که با گذشت زمان و مسن تر شدن پرگنه قارچ تریکودرما، میزان تولید این متابولیت‌ها افزایش و بازدارندگی بیشتری مشاهده شد. مطابق جدول یک و دو، ۲۴ ساعت پس از کشت، بازدارندگی افزایش یافت. میزان درصد بازدارندگی ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت پس از کشت، تفاوت

مواد با آبگونی غشای سلولی و در نتیجه، خروج ترکیبات درون سلولی، مرگ سلول را موجب می‌شوند (۶). در تحقیق حاضر از اسیدهای چرب و مشتقات آن، ۳-نیترو-۱،۲-بنزن دی کربوکسیلیک اسید (۷/۷۷ درصد)، پالمیتیک اسید (۰/۱۲ درصد) و استیریک اسید (۰/۰۴ درصد) شناسایی شدند (جدول ۷) که پالمیتیک اسید سابقا توسط دابی و همکاران (۸) از توده میسلیومی جدایه‌های تریکودرما جداسازی شد و توسط سی‌دی‌کویی و همکاران (۲۸) نیز گزارش شد. برخی از ترکیبات هم در استخراج متابولیت مایع (جدایه تریکودرما) با حلال آلی متانول و همچنین در عصاره توده قارچی حاصل از سوکسله شناسایی شدند (جدول ۷). باتوجه به این‌که در هر دو روش، از حلال متانولی استفاده شده، ترکیبات مشترک قابل توجه است.

نتایج این پژوهش موجب درک بهتر متابولیسم جدایه *T. atroviridae* (6022) خواهد شد که به‌طور وسیعی در کنترل بیولوژیک بیمارگرهای خاکزاد مورد استفاده قرار می‌گیرد. با توجه به کارایی پایین سموم شیمیایی جهت کنترل این بیمارگرها و مشکلات زیست محیطی ناشی از کاربرد سموم شیمیایی، می‌توان ترکیبات مؤثر موجود در متابولیت‌های ثانویه تریکودرما را جداسازی و به تولید تجاری رساند تا در آینده بتوان جایگزین سموم شیمیایی ن‌مود. در حال حاضر در برخی کشورها بطور بسیار محدود، بیوفرمولاسیون‌هایی از *T. harzianum* و برخی از گونه‌های دیگر تریکودرما به کار می‌رود. این تحقیق موجب تولید بیوفرمولاسیون‌های مؤثرتر تریکودرما در آینده خواهد شد.

می‌باشند. ایزوآمیل الکل (۱۰/۷۱ درصد)، ۱-پنتانول (۹/۳۷ درصد) و لیمونن (۷/۶۵ درصد) به‌ترتیب بیشترین فراوانی را دارند (جدول ۷). گاما-کورکومن، بتا-سسکوئی‌فلاندرن، لیمونن و زین‌گیرن با همین روش توسط سایر محققین، در جدایه‌های تریکودرما شناسایی شدند (۳۰، ۳۲). لازم به ذکر است، کلیه ترپنوئیدهای شناسایی شده در این تحقیق، فقط با تکنیک Headspace مشاهده شدند.

متابولیت‌های ثانویه جداسازی شده از توده میسلیومی جدایه تریکودرما، ۳۵ ترکیب را شامل می‌شود که دی-ان‌کتیل فتالات (۷۸/۷۴ درصد) و بیس (۲-اتیل هگزیل) فتالات (۱۹/۷۴ درصد) بیشترین فراوانی را داشتند. از آن‌جا که فتالات‌ها خواص ضدقارچی دارند (۴)، فراوانی بالای فتالات‌ها در توده قارچی جدایه تریکودرما، اثر بالای ضدقارچی عصاره توده قارچی حاصل از سوکسله را توجیه می‌نماید (جدول ۵ و ۶).

رامان و همکاران (۲۴) نیز اعلام نمودند فنل‌ها، فلاونوئیدها، مشتقات الکی و فتالات‌ها در برابر بیمارگرهای مختلف فعالیت‌های ضدقارچی و ضدباکتریایی دارند. الکل‌های شناسایی شده در این تحقیق (۱-پنتانول، ایزوآمیل الکل و ۲-اتیل-۱-هگزانول)، توسط محققین مختلف از جدایه‌های تریکودرما گزارش شدند (۱۶، ۱۷ و ۲۸). لذا اثرات ضدقارچی متابولیت‌های ثانویه جدایه *T. atroviridae* (6022) می‌تواند مربوط به وجود ساختار ضدقارچی فوق باشد. فعالیت ضدقارچی ۲-اتیل-۱-هگزانول توسط بیتاس و همکاران (۵) نیز به اثبات رسید.

اسیدهای چرب، اسیدهای آلی هستند با فعالیت‌های ضدباکتریایی و ضدقارچی که نقطه اثر آنها بر روی غشای سلولی قارچ‌هاست. این

جدول ۷- ترکیب‌های شناسایی شده در متابولیت‌های ثانویه جدایه *T. atroviridae* (6022)
Table 7- Identified compounds in secondary metabolites of *T. atroviridae* (6022)

Category	Volatile metabolites*	RT(min)	Area (%)	
Alcohols	Iso Amyl Alcohol(HS)	7.171	10.71	
	2-ethyl-1-Hexanol(mass)	18.145	0.20	
	1-Pentanol(HS)	10.113	9.37	
	n-Decane(N)	10.035	9.58	
	IsoDecan(N)	10.307	13.46	
	Docosane(mass)	46.265	0.02	
	Dodecane(N)	16.802	16.55	
	Eicosane(mass)	42.563	0.02	
	Heptadecane(mass)	36.435	0.03	
	2,6,10,14-tetramethyl- Heptadecane(mass)	30.851	0.01	
	Alkanes	Hexadecane (M)	27.164	8.97
		Hexadecane(mass)	34.171	0.05
		2,6,10,14-tetramethyl- Hexadecane (M)	21.692	7.2
2,6,10,14-tetramethyl- Hexadecane(mass)		38.803	0.01	
Nonadecane(mass)		40.622	0.02	
Octadecane(mass)		38.584	0.04	
n-Pentadecane(M)		24.835	23.47	
n-Pentadecane(mass)	31.780	0.04		
2-methyl- Pentadecane(mass)	33.317	0.01		

	2,6,10,14-tetramethyl- Pentadecane(mass)	36.574	0.02
	Tetracosane(mass)	50.822	0.01
	n-Tetradecane(M)	24.092	4.92
	n-Tetradecane (mass)	29.245	0.02
	4-methyl-Tetradecane(N)	23.788	3.33
	3-methyl-Tetradecane(N)	24.092	1.67
	Tricosane(mass)	48.350	0.01
	2-methyl –Tridecane(M)	22.326	44.72
	n-Undecane(N)	23.865	12.65
Alkenes	5-Allyl-2-norbornene(N)	12.5	4.82
	2-Octene(mat)	43.891	0.01
	1-Tetradecene(mass)	35.939	0.04
	2-Tetradecene(mass)	40.669	0.01
Aromatic compound	Xylen(N)	6.594	0.86
Organic acids	3-nitro-1,2-Benzenedicarboxylic acid (M)	44.778	7.77
	n-Hexadecanoic acid or palmitic acid (mass)	41.824	0.12
	Octadecanoic acid or stearic acid (mass)	45.543	0.04
	9- Octadecenoic acid (mass)	45.150	0.01
Esters	1,2-Benzenedicarboxylic acid, butyl 2-methylpropyl ester(mass)	42.026	0.01
	Benzoic acid, 2-ethylhexyl ester (mass)	36.892	0.02
	Dodecanoic acid, methyl ester (mass)	32.358	0.01
	Hexadecanoic acid, methyl ester (mass)	41.136	0.04
	Methoxyacetic acid, 2-tetradecyl ester (mass)	33.496	0.01
	9,12-Octadecadienoic acid (Z,Z)-, methyl ester (mass)	44.411	0.06
	Octadecanoic acid, methyl ester (mass)	44.919	0.01
	cis-13-Octadecenoic acid, methyl ester (mass)	44.498	0.03
	Bis(2-ethylhexyl) phthalate (mass)	54.229	19.74
	Di-n-octyl phthalate (mass)	57.532	78.74
	Phthalic acid, cyclohexylmethyl methyl ester (mass)	43.412	0.45
	Phthalic acid, 2-pentyl 2-propyl ester (mass)	44.833	0.01
	2-Propenoic acid, 1,7,7- exo-trimethylbicyclo[2.2.1]hept-2-yl ester(HS)	17.983	0.74
	Tetradecanoic acid, methyl ester (mass)	36.972	0.01
	Sulphur and nitrogen compound	2-methyl- Benzenesulfonamide (mass)	35.211
Cyclic compounds	Tricyclo[5.2.1. 02,6]dec-3-ene (N)	12.325	4.61
	Bicyclopentane (N)	12.5	3.41
	decyl- Cyclopentane(N)	21.905	2.04
	Cyclotetradecane (N)	23.542	9.41
Terpenoid	(R)- (-) - Cembrene(HS)	24.031	5.52
	gamma.-curcumene(HS)	19.067	1.09
	Epizonarene(HS)	19.261	3.54
	italicene(HS)	21.130	0.25
	dl-Limonene(HS)	12.627	7.65
	Nerolidol(HS)	19.941	1.34
	.beta.-Sesquiphellandrene(HS)	19.648	2.58
	Zingiberene(HS)	19.319	1.08

* به انتهای نام ترکیبی که با حلال‌های آلی ان-هگزان و متانول؛ تکنیک Headspace و همچنین از توده فارچی استخراج شده، به ترتیب "N"، "M"، "HS" و "mass" اضافه شد. ترکیبات شناسایی شده با فراوانی بیشتر در هر گروه به صورت پررنگ مشخص شدند.

*To the end of each compound was extracted Via n-hexane and methanol, headspace technique and also from mycelial mass was added "N", "M", "HS" and "mass". Identified compounds with higher frequency are shown in bold face type.

منابع

- 1- Abaszade F., Mohammadi Goltapeh E., Pourjame E., khorasani A., Rezaei Y., and Verma A. 2013. Evaluation of the ability of antagonistic endophytic fungi on roots and fungi *Trichoderma* species on *Macrophomina phaseolina* in vitro. Plant Disease Research, 1(1): 1-15. (in Persian)
- 2- Abdolahian M., Rahnama K., Mardabi M., Ommati F., and Zaker M. 2012. The in vitro efficacy of *Trichoderma* isolates against *Pythium aphanidermatum*, the casual agent of sugar-beet root rot. Journal of Research Agricultural

- Sciences, 8(1): 87-79.
- 3- Ahluwalia V., Waliaa S., Satib P., Kumara J., Kundua A., Shankara J., and Paulc Y.S. 2014. Isolation, characterisation of major secondary metabolites of the Himalayan *Trichoderma koningii* and their antifungal activity. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 47(9): 1063–1071.
 - 4- Akpuaka A., Ekwenci M.M, Dashak D.A., and Dildar A. 2012. Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS) Analysis of Phthalate Isolates in n-Hexane Extract of *Azadirachta indica* A. Juss (Neem) Leaves. Journal of American Science, 8(12): 146-155.
 - 5- Bitas V., Kim H.S., Bennett J.W., and Kang S. 2013. Sniffing on Microbes: Diverse Roles of Microbial Volatile Organic Compounds in Plant Health. Molecular Plant- Microbe Interactions, 26(8): 835-843.
 - 6- Carolina H.P., Kock J.L.F., and Thibane V.S. 2011. Antifungal free fatty acids: A Review: 61-71. In Méndez-Vilas A.,(Eds.). Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances, Microbiology Series, 2(3), Spain: Formatex, 691p.
 - 7- Dennis C., and Webster J. 1971. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. Production of volatile antibiotics. Transactions of British Mycological Society. 57: 25-29.
 - 8- Dubey S.C., Tripathi A., Dureja P., and Grover A. 2011. Characterization of secondary metabolites and enzymes produced by *Trichoderma* species and their efficacy against plant pathogenic fungi. Indian Journal of Agricultural Sciences, 81(5): 455–61.
 - 9- Etebarian H.R. 2006. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biological control of charcoal stem rot in melon caused by *Macrophomina phaseolina*. Journal of Agricultural Science and Technology, 8: 243-250.
 - 10- Habibi R., Rahnema K, and Taghinasb M. 2015. Evaluating the effectiveness of native *Trichoderma* species in production of extracellular enzymes during interaction with plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum*. Journal of Applied Research Plant protection, 4(2): 73-85.
 - 11- Haidari Farooqi S.H., Zamanizadeh H.R., and Etebarian H.R. 2003. Evaluation of *Trichoderma* strains for biological control of plant disease miri melon (*Phytophthora drechsleri*) in the greenhouse. Plant Pests and Diseases, 72(2): 113-134.
 - 12- Hung R., Lee S., and Bennett J.W. 2013. *Arabidopsis thaliana* as a model system for testing the effect of *Trichoderma* volatile organic compound. Fungal Ecology, 6: 19-26.
 - 13- Iraqi M.M., Rahnema K., Zafari D., and Taghi Nasab M. 2006. Investigating biological control of *Ophiostoma novo-ulmi*, causal agent of Dutch Elm disease by *Trichoderma harzianum* and *T. virens* in vitro. Journal of Agricultural Sciences and natural resources, 14(5): 178-191. (in Persian with English abstract)
 - 14- Iraqi M.M., and Rahnema K. 2007. Investigating biological control of *Fusarium graminearum* by *Trichoderma harzianum* and *T. virens* in vitro. Pajouhesh Va Sazandgi, 81: 197-199. (in Persian)
 - 15- Jelen H.H. 2003. Use of solid phase microextraction (SPME) for profiling fungal volatile metabolites; Letters in Applied Microbiology, 36: 263–267.
 - 16- Jeleń H., Błaszczuk L., Chełkowski J., Rogowicz K., and Strakowska J. 2013. Formation of 6-n-pentyl-2H-pyran-2-one (6-PAP) and other volatiles by different *Trichoderma* species, Mycological Progress, DOI 10.1007/s11557-013-0942-2.
 - 17- Korpi A., Jarnberg J., and Pasanen A.L. 2009. Microbial volatile organic compounds; Critical Reviews in Toxicology, 39: 139–193.
 - 18- Morath S.H.U., Hung H., and Bennett J.W. 2012. Fungal volatile organic compounds: A review with emphasis on their biotechnological potential. Fungal Biology Reviews, 26: 73-83.
 - 19- Nemcovic M., Jakubikova L., Viden I., and Vladimir F. 2008. Induction of conidiation by endogenous volatile compounds in *Trichoderma* spp. FEMS Microbiology Letters, 284: 231–236.
 - 20- Nick Nejad M., Pedramfar H., and Elahi Nia A. 2001. Effect of some fungicides and antagonistic fungus *Rhizoctonia solani* Kuhn on rice sheath blight. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, Soil and Water Sciences, 6(4): 151-157. (in Persian with English abstract)
 - 21- Norouzi S., Rahnema K., Rabbani Nasab H., and Taqi Nasab M. 2014. Evaluation of efficacy of *Trichoderma* and *Bacillus* isolates in biological control of melon *Fusarium* wilt. Biocontrol in Plant Protection, 2(1): 43-55. (in Persian with English abstract)
 - 22- Pagans E., Font X., and Sanchez A. 2006. Emission of volatile organic compounds from composting of different solid wastes: abatement by biofiltration. Journal of Hazardous Materials, 131: 179-186.
 - 23- Polizzi V., Adams A., Picco A.M., Adriaens E., Lenoir J., Van Peteghem C., De Saeger S., and De Kimpe N. 2011. Influence of environmental conditions on production of volatiles by *Trichoderma atroviride* in relation with the sick building syndrome. Building and Environment, 46(4): 945–954.
 - 24- Raman V., La S., Saradhi P., Rao N., Krishna N.V., Sudhakar M., and Radhakrishnan T.M. 2012. Antibacterial, antioxidant activity and GC-MS analysis of *Eupatorium odoratum*. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 5(2): 99-106.
 - 25- Reino J.L., Guerriero R.F., Hernandez-Gala R., and Collado I.G. 2008. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. Phytochemistry Reviews, 7: 89–123.

- 26- Rohani H., and Safari nejad M. 1997. Introducing *Trichoderma* species in Iran. 16th Iranian Plant Protection Congress. (in Persian with English abstract)
- 27- Siddiquee S., Cheong B.E., Taslima K., Hossain K., and Hasan M.M. 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.
- 28- Siddiquee S. 2014. Recent advancements on the role and analysis of volatile compounds (VOCs) from *Trichoderma*. p. 139-175. In V.K. Gupta et al. (ed.) *Biotechnology and biology of Trichoderma*, Elsevier's Science & Technology Rights Department in Oxford, UK.
- 29- Singh R., Maurya S., and Upadhyay R.S. 2012. Antifungal potential of *Trichoderma* species against *Macrophomina phaseolina*. *Journal of Agricultural Technology*, 8(6): 1925-1933.
- 30- Stoppacher N., Kluger B., Zeilinger S., Krska R., and 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.
- 31- Sundar M.S., Vinodhkumar T., and Ramanathan G. 2013. Evaluation of antifungal activity of metabolites from *Trichoderma* species against fungal phytopathogens. *International Journal of Science Innovations and Discoveries*, 3(5): 528-538.
- 32- Tajick Ghanbari M. A., Mohammadkhani H.S., and Babaeizad V. 2014. Identification of some secondary metabolites produced by four *Penicillium* species, *Mycologia Iranica*, 1(2): 107 – 113.
- 33- Tarus P.K., Lang'at-Thoruwa C.C., Wanyonyi A.W., and Chhabra S.C. 2003. Bioactive metabolites from *Trichoderma harzianum* and *Trichoderma longibrachianum*. *Bulletin of the Chemistry Society Ethiopia*, 17(2): 185-190.
- 34- Ting A.S.Y., Mah S.W., and Tee C.S. 2010. Identification of volatile metabolites from fungal endophytes with biocontrol potential towards *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 5(2): 177-182.
- 35- Vasebi Y., Alizade A., and Safai N. 2011. Biological control of soybean charcoal rot disease caused by *Macrophomina phaseolina* using *Trichoderma harzianum*. *Journal of Agricultural Knowledge and sustainable production (agricultural knowledge)*, 22(1): 41-55. (in Persian with English abstract)
- 36- Vinale F., Marra R., Scala F., Ghisalberti E.L., Lorito M., and Sivasithamparam K. 2006. Major secondary metabolites produced by two commercial *Trichoderma* strains active against different phytopathogens. *Letters in Applied Microbiology*, 43: 143–148.
- 37- Vinale F., Girona I.A., Nigro M., Mazzei P., Piccolo A., Ruocco M., Woo SH., Rosa D.R, Herrera C.L., and Lorito M. 2011. Cerinolactone, a Hydroxy-Lactone Derivate from *Trichoderma cerinum*. *Journal of Natural Products*, dx.doi.org/10.1021/np200577t.
- 38- Zavvari F., Sahebani N.A., and Etebarian H.R. 2012. Measuring of b-1,3 glucanase activity in *Trichoderma virens* isolates and selection of the best isolates for biological control of cucumber root rot, *Journal of Agricultural Knowledge and Sustainable Production (agricultural knowledge)*: 22(4): 149-16. (in Persian with English abstract)