# اثرات ضدقارچی عصاره و اسانس گیاهان اکلیل کوهی و میخک بر رشد قارچ *Botrytis cinerea*

# The Effect of Clove Buds and Rosemary Extracts and Essences on Control of *Botrytis cinerea* Growth

**زهرا وصال طلب[۱] و منصور غلامی[۲]***

**چکیده**

استفاده از ترکیبات طبیعی گیاهان با ویژگی ضدقارچی، ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی در کنترل ضایعات پس از برداشت محصولات باغی به‌ویژه کنترل پوسیدگی آن‌ها رو به پیشرفت است. در این مطالعه، عصاره اکلیل‌کوهی و میخک با استفاده از حلال اتانول و اسانس گیاهان مذکور با استفاده از دستگاه کلونجر استخراج شد. تاثیر عصاره‌ها روی رشد قارچ بیماری‌زای *Botrytis cinerea* به روش غذای مسموم و اسانس‌ها در حالت تماسی (غذای مسموم) و نیز تدخینی در غلظت‌های مختلف از صفر تا ۶۰۰ پی‌پی‌ام بررسی شد. عصاره اتانولی هر دو گیاه به کلی فاقد اثر قارچ ایستایی بود. اسانس میخک در روش غذای مسموم در غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام و در روش تدخینی در غلظت ۴۵۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام فعالیت قارچ‌کشی از خود نشان داد. اسانس اکلیل‌کوهی در روش تدخینی در غلظت‌های ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام فعالیت قارچ‌ایستایی داشت. در غلظت‌های مشابه، اسانس نسبت به عصاره، روش تدخینی نسبت به تماسی و فرآورده‌های گیاه میخک نسبت به اکلیل‌کوهی فعالیت ضد قارچی بالاتری نشان داد.

**واژه‌های کلیدی:** *Rosmarinus officinalis*، *Eugenia caryophyllata*، روش غذای مسموم، روش تدخینی، ضدقارچی

Archive of SID

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

۲. دانشیارگروه باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

*: نویسنده مسوول Email: mgholami@basu.ac.ir

این مقاله بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نویسنده اول می‌باشد که در دانشگاه بوعلی سینا انجام شده است

www.SID.ir

**مقدمه**

قارچ‌های بیماری‌زا به تنهایی نزدیک به ۲۰ درصد کاهش در بازده بیش‌تر محصولات کشاورزی را سبب می‌شوند و روش‌های قبل و بعد از برداشت متعددی برای کنترل پوسیدگی‌های قارچی استفاده شده است (*تزورتزاکیس*[1]، 2007). استفاده از مواد شیمیایی به‌عنوان ابتدایی‌ترین روش کنترل بیماری‌های پس از برداشت، به‌علت سرطان‌زائی، دوره تجزیه طولانی، آلودگی محیط زیست و سایر اثرات سوء آن‌ها روی مواد غذایی (نظیر سمیت و ایجاد رایحه بد) و سلامتی انسان‌ها، محدود شده است (*تریپاتی* و *دوبی*[2]، 2004). جایگزینی قارچ‌کش‌های صنعتی به‌وسیله ترکیبات طبیعی (به‌ویژه با منشأ گیاهی) که سمی نیستند، توجه زیادی را به خود معطوف کرده است. سودمندی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مشتق شده از اندام‌های گیاهی به‌عنوان جانشین مواد شیمیایی از سویی و ویژگی‌های ضد میکروبی این ترکیبات که قرن‌هاست به‌طور تجربی تشخیص داده شده و اخیراً مورد توجه علمی قرار گرفته (*بارت*[3]، 2004)، از سوی دیگر، تحقیق راجع به منابع جدید در زمینه کاهش ضایعات پس از برداشت را ترغیب کرده است.

اکلیل کوهی (*Rosmarinus officinalis*)، گل‌سرخ دریایی یا رزماری، متعلق به خانواده Labiatae می‌باشد (نراقی[4]، ۱۳۸۱). ترکیبات شیمیایی مختلفی از جمله آلفا-توجن، کامفن، آلفا- ترپینن، ۱و۸- سینئول، گیجرن، وربنول، بورنئول، ژرانیول و کارواکرول در اسانس اکلیل کوهی که از نواحی مختلف برداشت شده بود، گزارش شده است (*آنجیونی*[5] و همکاران، ۲۰۰۴). در بررسی‌های مختلف، فعالیت‌های ضدقارچی (*پانیزی*[6] و همکاران، 1993؛ *باراتا*[7] و همکاران، 1998؛ *دافررا*[8] و همکاران، 2003؛ *آنجیونی*[9] و همکاران، 2004 و *پاوار* و *تاکر*[10]،2007) ضدباکتریایی (*بارا* و *وانتی*[11]، 1996؛ *اواترا*[12] و همکاران، 1997؛ *اسمیت-پالمر*[13] و همکاران، 1998 و *هامر*[14] و همکاران، 1999) و آنتی‌اکسیدانی قوی (*اینا‌تانی*[15] و همکاران، 1982؛ *وارلتزیس*[16] و همکاران، 1997؛ *کلیسکیک*[17] و همکاران، 2000 و *دیجنان*[18] و همکاران، 2002) فرآورده‌های اکلیل کوهی، به‌صورت اسانس، عصاره و حتی پودر برگ‌های این گیاه مطالعه شده است. میخک (*Eugenia caryophillata*) درختی از خانواده مورد Myrtaceae می‌باشد. در اسانس غنچه‌های میخک علاوه بر اوژنول، موادی نظیر ۴-(۲-پروپنیل)-فنل، آلفا-کوپائن، کاریوفیلن، آلفا-هومولن، آلفا- فارنسن ، کادینن، اکسید کاریوفیلن نیز یافت می‌شود (*ونکیانگ*[19] و همکاران، 2007). به‌طور کلی در مطالعات مختلف انجام شده روی فرآورده‌های میخک فعالیت‌های ضد قارچی (*تامسون*[20]، 1989؛ *لین* و *مهامد*[21]، 1999؛ *جابلینگ*[22]، 2000؛ *کالمبا* و *کونیکا*[23]، 2003 و یحیی‌زاده[24]، 2008)، ضدباکتری (*آرورا* و *کاور*[25]، 1999؛ *درمن* و *دینز*[26]، 2000؛ *لارهسینی*[27] و همکاران، 2001؛ *لی*[28] و همکاران، 2005؛ *اوسالا*[29] و همکاران، 2006 و *آقاوقلو*[30]، 2007)، آنتی‌اکسیدانی (*کرامر*[31]، 1985 و *میشارینا* و *ساموسنکو*[32]، 2008)، نماتدکشی (*سانگوان*[33] و همکاران، 1990)، ضد ویروسی (*چایب*[34] و همکاران، 2007) و نیز حشره‌کشی (*پارک* و *شین*[35]، 2005 و *پومنوان*[36] و همکاران، 2008) اثبات شده است.

کپک خاکستری توسط قارچ *Botryotinia fuckeliana* ایجاد می‌شود که فرم کنیدیایی آنامورف آن *Botrytis cinerea* شناخته شده‌تر است (*تورستن* و *هوندورف*[37]، 2007). *B. cinerea* شایع‌ترین گونه این جنس است و روی دامنه وسیعی از محصولات مهم باغی و زراعی

1. Tzortzakis
2. Tripathi and Dubey
3. Burt
4. Naraghy
5. Angioni *et al.*
6. Panizzi *et al.*
7. Baratta *et al.*
8. Daferera *et al.*
9. Angioni *et al.*
10. Pawar and Thaker
11. Bara and Vanetti
12. Ouattara *et al.*
13. Smith-Palmer *et al.*
14. Hammer *et al.*
15. Inatani *et al.*
16. Vareltzis *et al.*
17. Kliskic *et al.*
18. Djenane *et al.*
19. Wenqiang *et al.*
20. Thompson
21. Lean and Mohamed
22. Jobling
23. Kalemba and Kunicka
24. Yahyazadeh
25. Arora and Kaur
26. Dorman and Deans
27. Larhsini *et al.*
28. Li *et al.*
29. Oussalah *et al.*
30. Agaoglu
31. Kramer
32. Misharina and Samusenko
33. Sangwan *et al.*
34. Chaieb *et al.*
35. Park and Shin
36. Pumnuan *et al.*
37. Thorsten H. and Huhndorf.



Archive of SID

www.SID.ir

به‌عنوان یک پارازیت یا ساپروفیت رشد می‌کند و مهم‌ترین عامل بیماری محصولاتی نظیر انگور می‌باشد (*الاد*[1]، 2004). کنترل عامل بیماری کپک خاکستری به‌دلیل ویژگی زیستی این پاتوژن، سازگاری با شرایط محیطی مختلف، قدرت تخریب در زمان برداشت و مقاومت قارچ‌کشی آن، هم‌چنان مورد بحث است (*ویرت* و همکاران[2]، 2004). کاربرد کنترل شیمیایی در مدیریت بیماری‌های ناشی از .*Botrytis* spp با ایجاد مقاومت به بسیاری از ترکیبات قارچ‌کش‌ها و عدم پذیرش آن‌ها توسط عموم محدود شده است (*گولینو* و *کوجیپرز*[3]، 1994). نژادهای مقاوم بوتریتیس نسبت به بنومیل، دیکلران، ایپرودیون و حتی کاپتان گزارش شده است (*اگریوس*[4]، 2005). باید در نظر داشت که به‌علت تعدد ترکیبات سازنده اسانس‌ها و چندگانگی اهداف آن‌ها در سلول میکروارگانیسم‌ها، تا به حال گزارشی مبنی بر پیدایش مقاومت یا سازگاری در جمعیت میکروارگانیسم‌ها به‌ویژه در غلظت‌های کشنده منتشر نشده است (*باکالی*[5]، 2008). ضمن این‌که pH پایین، دمای پایین و سطوح اکسیژن پایین (شرایط مشابه انبارداری محصولات باغی نظیر انگور و توت فرنگی) فعالیت ضد قارچی اسانس‌ها را بهبود می‌بخشد (*بارت*، 2004). بنابر این استفاده از ترکیبات طبیعی می‌تواند راه‌کار مناسبی در جهت کنترل بیماری پوسیدگی کپک خاکستری محصولات باغی به‌ویژه طی عمر پس از برداشت آن‌ها باشد.

این مطالعه با هدف بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره و اسانس میخک و اکلیل کوهی در ترکیب با محیط کشت (حالت تماسی) و نیز اسانس این دو گیاه در حالت تدخینی در غلظت‌های مختلف بر رشد قارچ بیماری‌زای گیاهی *Botrytis cinerea* و تعیین حداقل غلظت بازدارندگی کامل هر تیمار انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

### آماده‌سازی گیاهان و جدایه قارچی

سر شاخه‌های گیاه اکلیل کوهی، در مرحله گلدهی در اواخر مرداد به‌صورت تازه از باغ گیاهان دارویی جهاد کشاورزی همدان و گیاه میخک هندی خشک از یکی از مراکز فروش گیاهان دارویی خریداری شد. قارچ *B. cinerea* از حبه‌های آلوده انگور جداسازی و به شیوه تک اسپور روی محیط آب-آگار (WA) خالص‌سازی شد. سپس تشخیص مورفولوژیکی قارچ انجام و نیز بیماری‌زایی آن در روی انگور تأیید شد.

### تهیه عصاره و اسانس اکلیل کوهی و میخک

به‌منظور تهیه اسانس هر یک از گیاهان، هر بار ۸۰ گرم از سرشاخه‌های جوان اکلیل کوهی تازه و یا پودر غنچه-های خشک میخک استفاده شد. اسانس‌گیری به روش تقطیر با بخار آب به کمک دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت صورت گرفت. به‌منظور تهیه عصاره، گیاه اکلیل کوهی ابتدا به مدت ۷ روز در دمای اتاق و در محیط سایه خشک شد. ۶۰ گرم از پودر غنچه‌های میخک یا اکلیل کوهی در ۱۲۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶ درصد به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۰°C در تاریکی خیسانیده شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن ۴۲ بقایای پودر گیاه از محلول جدا و مجدداً به همین روش خیسانیده شد. عمل تغلیظ محلول به دست آمده، با استفاده از دستگاه تغلیظ در خلأ چرخان ( Rotary Vacuum Evaporator) در دمای ۵۰°C تا رسیدن به حجم ۱۰ میلی‌لیتر صورت گرفت. عصاره و اسانس حاصل تا زمان استفاده در ظرف شیشه‌ای در بسته، در شرایط تاریکی در یخچال با دمای ۴ °C نگهداری شد.

### سنجش فعالیت ضدقارچی عصاره و اسانس گیاه میخک و اکلیل کوهی به شیوه غذای مسموم (تماسی)

به این منظور، ابتدا اسانس‌ها و عصاره‌ها در شرایط استریل با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون سرنگی ضد عفونی شدند. هر پتری‌دیش حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت سیب‌زمینی-دکستروز-آگار (PDA) بود. عصاره و اسانس اکلیل کوهی و میخک در غلظت‌های صفر، ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام به همراه ۰/۰۰۵ درصد توئین ۸۰ به محیط کشت اضافه شد (*تریپاتی* و همکاران، ۲۰۰۸). به‌منظور بررسی اثر رقت محیط کشت بر سرعت رشد میسلیوم قارچ، در غلظت صفر، از یک شاهد (۱) حاوی محیط PDA به تنهایی و شاهد دیگر (۲) محیط کشت PDA حاوی آب مقطر استریل استفاده شد. یک حلقه میسلیومی از حاشیه کشت ۷ روزه قارچ بوتریتیس در مرکز هر پتری‌دیش قرار داده شد و تا روز پنجم قطر میسلیومی اندازه‌گیری شد. تمامی مراحل در شرایط استریل و در سه تکرار (پتری) صورت گرفت و کلیه آزمایش‌ها دو بار انجام شد. درصد بازدارندگی رشد میسلیومی هر تیمار از فرمول زیر محاسبه گردید:

1. Elad
2. Viret *et al.*
3. Gullino and Kuijpers
4. Agrios
5. Bakkali



Archive of SID
www.SID.ir

۱۰۰× [ قطر کلنی در شاهد / (قطر کلنی در تیمار - قطر کلنی در شاهد) ] = درصد بازدارندگی رشد قارچ

**سنجش فعالیت ضدقارچی اسانس گیاه میخک و اکلیل کوهی به شیوه تدخینی**

به‌منظور اجتناب از تماس اسانس با حلقه میسلیومی قارچ، از قرار دادن دو تشتک پتری‌دیش یکسان روی یکدیگر استفاده شد. یک پتری‌دیش حاوی محیط کشت PDA و حلقه میسلیومی از حاشیه کشت ۷ روزه قارچ بوتریتیس و در پتری‌دیش دیگر کاغذ صافی به ابعاد ۲×۱/۵ سانتی‌متر در مرکز چسبانیده‌شد. غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام اسانس اکلیل کوهی و میخک روی کاغذ صافی ریخته و بلافاصله دو پتری‌دیش به وسیله نوار چسب به یکدیگر متصل شدند (شکل ۱). درصد بازدارندگی رشد میسلیومی مشابه روش بخش قبل محاسبه شد. تمامی مراحل در شرایط استریل و در سه تکرار صورت گرفت و کلیه آزمایش‌ها دو بار انجام شد.

به‌منظور بررسی ویژگی قارچ‌کشی یا قارچ ایستایی اسانس‌ها، حلقه میسلیومی تیمارهایی که رشد قارچی در آن‌ها مشاهده نگردید، روی محیط کشت PDA واکشت شد و رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت پس از یک هفته بررسی گردید.

تجزیه آماری نتایج حاصل از این پژوهش به کمک نرم‌افزار SAS انجام و مقایسه میانگین‌ها نیز با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

**نتایج و بحث**

تمامی تیمارهای عصاره و اسانس به‌صورت تماسی و تدخینی اثر معنی‌داری (در سطح ۱ درصد) بر درصد بازدارندگی نرخ رشد رویشی قارچ تیمارهای مختلف نسبت به تیمار شاهد بر جای گذاشت (جدول ۱). در رشد میسلیومی بین شاهد حاوی آب مقطر و فاقد آن تفاوتی دیده نشد. نتایج آزمایش نشان داد، فعالیت ضد قارچی این ترکیبات به نوع گیاه، نوع فرآورده، غلظت به‌کار رفته و روش کاربرد فرآورده گیاهی بستگی داشت. اسانس در غلظت‌های مختلف، فعالیت ضد قارچی بالاتری نسبت به عصاره نشان داد (شکل ۱). میانگین درصد بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ در کاربرد اسانس به‌صورت تدخینی در غلظت‌های مشابه نسبت به‌حالت تماسی بیش‌تر بود و فعالیت ضدقارچی فرآورده‌های گیاه میخک بیش از اکلیل کوهی ارزیابی شد (اختلاف معنی‌دار در سطح ۱ درصد) (جدول ۲).

جدول ۱:درصد بازدارندگی اسانس و عصاره‌ی اکلیل کوهی و میخک بر کنترل قارچ *B. cinerea*

Table 1: Mycelia growth inhibition percent of clove and rosemary extracts and essences on control of *B. cinerea*

| Plants گیاهان | Treatment تیمار | Controls 1 شاهد ۱ | Controls 2 (distilled water) شاهد ۲ | Concentrations غلظت‌ها (ppm) 50 | 100 | 150 | 300 | 450 | 600 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Rosemary* / اکلیل کوهی | *extract* | $0^{a}$ | $0^{a}$ | - | - | $4/815^{ab}$ | $10/788^{cd}$ | $11/161^{cde}$ | $16/760^{e}$ |
| | *Essence (contact)* | $0^{a}$ | $0^{a}$ | - | - | $7/242^{bcd}$ | $27/585^{f}$ | $30/944^{f}$ | $66/405^{h}$ |
| | essence (vapor) | $0^{a}$ | $0^{a}$ | $38/78^{g}$ | $85/069^{j}$ | $94/774^{kl}$ | $100^{l}$ | $100^{l}$ | $100^{l}$ |
| Clove میخک | extract | $0^{a}$ | $0^{a}$ | - | - | $5/562^{abc}$ | $12/654^{de}$ | $16/760^{e}$ | $32/064^{f}$ |
| | Essence (contact) | $0^{a}$ | $0^{a}$ | - | - | $68/645^{h}$ | $100^{l}$ | $100^{l}$ | $100^{l}$ |
| | Essence (vapor) | $0^{a}$ | $0^{a}$ | $77/04^{i}$ | $85/816^{j}$ | $92/609^{k}$ | $92/90^{k}$ | $100^{l}$ | $100^{l}$ |

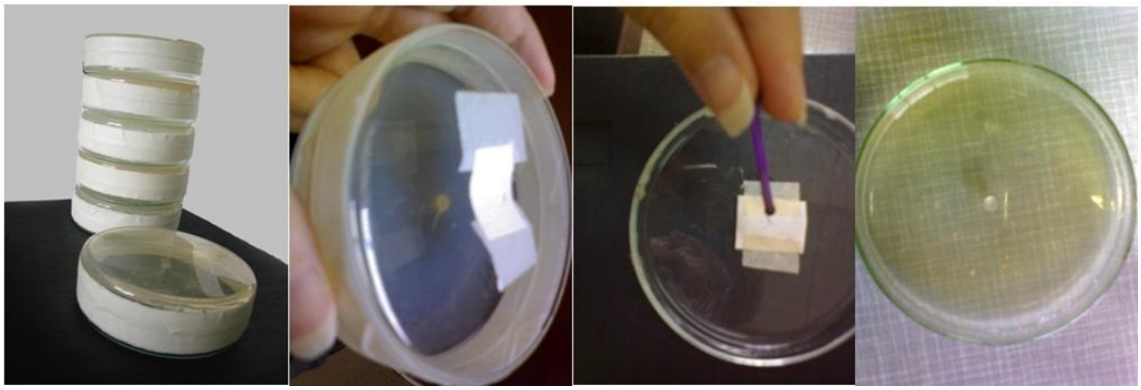
حروف غیر مشابه نشان دهنده‌ی اختلاف معنی دار بین تیمارها در سطح ۱٪ می‌باشند.

Mean values followed by different letters are significantly different between treatments (P< 0.01).

Archive of SID



www.SID.ir



شکل ۱: نحوه اعمال تیمار اسانس در روش تدخینی

Fig 1: The way essential oils applied in fumigation method

جدول ۲: مقایسه گروهی تیمارهای آزمایشی بر کنترل رشد میسلیوم *B. cinerea*

Table 2: Orthogonal contrast treatments on mycelial growth control of *B. cinerea*

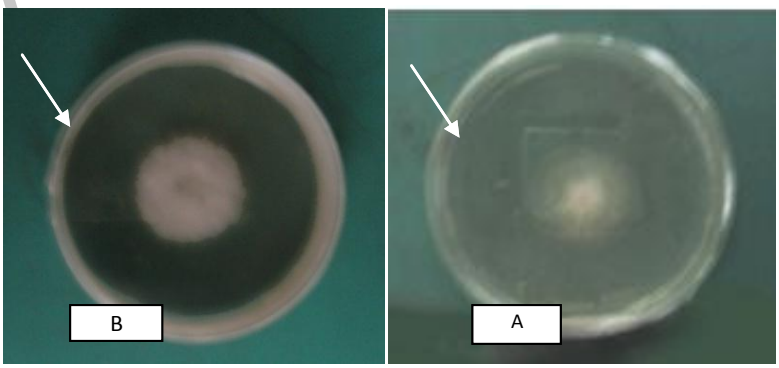
| Some of square's mycelia growth<br>مجموع مربعات | Degree of Freedom<br>درجه آزادی | Contrasts<br>مقایسات |
|---|---|---|
| 1/65** | 1 | clove & rosemary extract |
| 167/21** | 1 | clove & rosemary essence (contact) |
| 1/76** | 1 | clove & rosemary essence (vapor) |
| 227/72** | 1 | essence & extract product |
| 116/78** | 1 | contact & vapor method |

**: اختلاف معنی‌دار گروه‌های تیماری مورد مقایسه در سطح ۱٪

**Means significant differences between different treatment groups at (P< 0.01)

**اثر بازدارندگی عصاره میخک و اکلیل کوهی به شیوه‌ی غذای مسموم (تماسی)**

میانگین رشد میسلیومی در غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام هیچ‌یک از عصاره‌ها با شاهد تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۱). اگرچه در غلظت‌های پایین عصاره که از نظر قطر رشد میسلیوم تفاوت چندانی با شاهد نداشتند، کاهش حجم توده میسلیومی به وضوح قابل مشاهده بود (شکل ۲). کاربرد عصاره‌ی اتانولی میخک اثر کنترلی قابل قبول‌تری در مقایسه باعصاره اکلیل کوهی عرضه داشت (معنی داری در سطح ۱ درصد) (جدول ۲).




شکل۲: اثر عصاره میخک غلظت ۱۵۰ پی‌پی‌ام (A) بر کاهش حجم توده میسلیوم قارچ *B. cinerea* نسبت به شاهد (B) در روز دوم بعد از تیمار

Fig 2: The effect of 150 ppm of clove extract (A) on decreasing mycelial mass volume of *B. cinerea* than control (B) in second day after application

Archive of SID



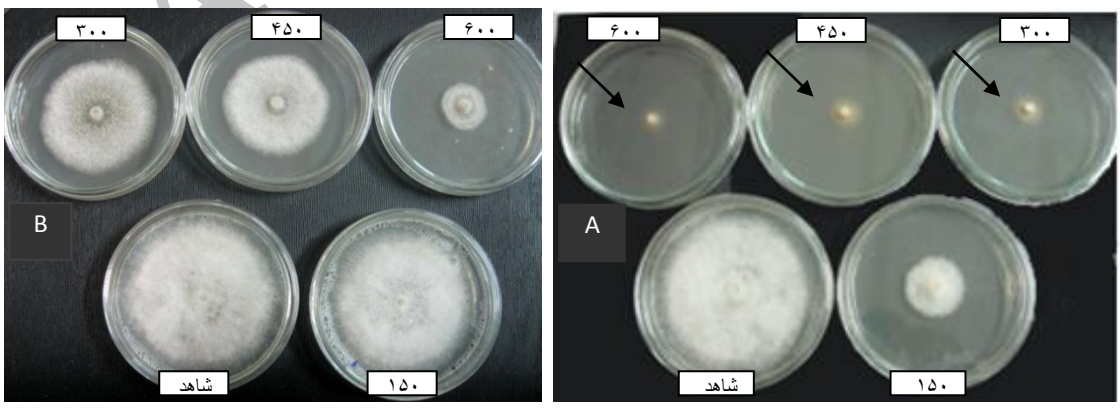
www.SID.ir

**اثر بازدارندگی اسانس میخک و اکلیل کوهی به شیوه‌ی غذای مسموم (تماسی)**

کاربرد غلظت‌های مختلف اسانس اکلیل کوهی تفاوت معنی‌داری در بازدارندگی رشد قارچ در سطح ۱ درصد با یکدیگر و نیز با شاهد نشان دادند (جدول ۱). بررسی اثر کاربرد این اسانس نشان داد که قابلیت کنترل زیستی آن در غلظت معینی افزایش یافته‌است. به‌طوری‌که در غلظت ۱۵۰، ۳۰۰ و ۴۵۰ پی‌پی‌ام افزایش تدریجی بازدارندگی تا ۳۰/۹۴ درصد را نشان می‌دهد، در حالی‌که در غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌ام بازدارندگی تا ۶۶/۴۰ درصد افزایش یافته است. اسانس میخک در غلظت ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام کاملاً از رشد قارچ جلوگیری کرد. بعد از واکشت حلقه میسلیومی قارچ غلظت‌های مذکور اسانس میخک، با مشاهده‌ی عدم رشد قارچ پس از یک هفته در هر سه غلظت، غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام به‌عنوان حداقل غلظت بازدارندگی کامل اسانس میخک با فعالیت ضد قارچی به‌روش تماسی در این پژوهش معرفی می‌شود. در این بخش نیز اسانس میخک فعالیت ضدقارچی بیش‌تری در مقایسه با اکلیل کوهی به نمایش گذاشت (شکل ۳).

**اثر بازدارندگی اسانس میخک و اکلیل کوهی به شیوه‌ی تدخینی**

نتایج این بخش از آزمایش نشان داد، با افزایش غلظت اسانس اکلیل کوهی از ۵۰ به ۱۰۰ پی‌پی‌ام درصد بازدارندگی بیش از دو برابر افزایش یافت (جدول ۱) و در غلظت ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام اسانس توانست به‌طور کامل از رشد قارچ جلوگیری کند. بعد از واکشت حلقه میسلیومی غلظت‌های مذکور در محیط PDA میسلیوم قارچ رشد کرد و این نتیجه حاکی از فعالیت قارچ ایستایی اسانس اکلیل کوهی می‌باشد. این درحالی است که در هیچ‌یک از غلظت‌های این اسانس در حالت تماسی عدم رشد میسلیوم مشاهده نشد. به‌نظر می‌رسد، اسانس اکلیل کوهی زمانی‌که مستقیماً به محیط اضافه می‌شود، فعالیت ضدقارچی کم‌تری نسبت به کاربرد تدخینی نشان می‌دهد. فعالیت ضدقارچی در روش تدخینی نتیجه اثر مستقیم بخار اسانس روی میسلیوم قارچ است و بدیهی است که ماهیت چربی‌دوستی اسانس‌ها این امکان را فراهم می‌کند که توسط میسلیوم قارچ جذب شود. پیش از این نیز برتری فعالیت ضد قارچی اسانس رزماری در روش تدخینی نسبت به تماسی گزارش شده است (*سویلو* و همکاران، 2006). بیان علت این مشاهده پژوهش‌های بیشتری را طلب می‌کند. غلظت ۵۰ پی‌پی‌ام اسانس میخک ۷۷/۰۴ درصد بازدارندگی رشد میسلیومی نشان داد. غلظت ۴۵۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام اسانس میخک کاملاً از رشد قارچ جلوگیری کرد. پس از واکشت حلقه میسلیومی این غلظت‌ها در یک تکرار از سه تکرار تیمار ۴۵۰ پی‌پی‌ام و هر سه تکرار ۶۰۰ پی‌پی‌ام رشد میسلیوم مشاهده نشد. حداقل غلظت دارای فعالیت قارچکشی این اسانس در روش تماسی ۳۰۰ پی‌پی‌ام است در صورتی‌که در روش تدخینی، تیمار ۴۵۰ پی‌پی‌ام نیز فعالیت قارچ ایستایی بیش‌تری نسبت به قارچ‌کشی نشان می‌دهد. از این جهت به نظر می‌رسد اسانس میخک در شرایط درون شیشه‌ای در حالت تماسی فعالیت قارچ‌کشی بیشتری نشان می‌دهد.



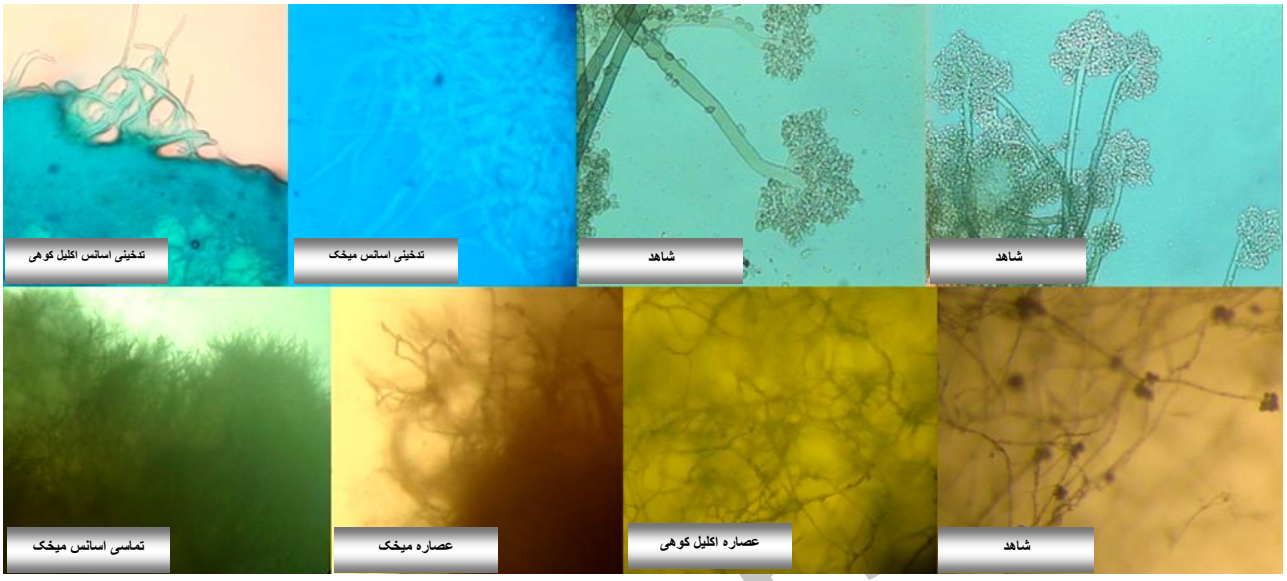

شکل ۳: اثر غلظت‌های مختلف (پی‌پی‌ام) اسانس میخک (A) و اکلیل کوهی (B) به روش تماسی بر کنترل رشد میسلیوم قارچ *B. cinerea*

Fig 3- The effects of different concentrations (ppm) of clove (A) and rosemary essence (B) in contact method on mycelial growth control of *B. cinerea*



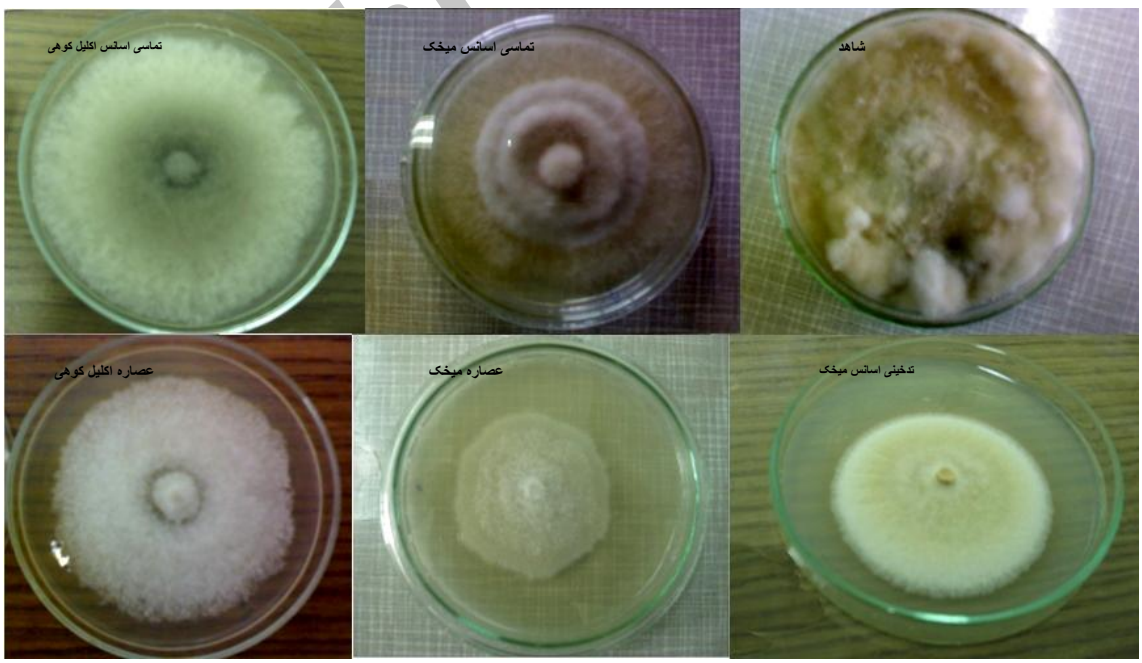
Archive of SID
www.SID.ir

تغییرات مورفولوژیکی ناشی از تأثیر اسانس‌ها و عصاره‌ها هم در سطح میکروسکوپی (شکل ۴) و هم در سطح پرگنه (شکل ۵) مشاهده شد. افزایش انشعابات میسلیومی، چروکیدگی و مجعد شدن میسلیوم‌ها و کاهش تولید اسپورها از آن جمله بود.




شکل ۴: اثر عصاره‌ها و اسانس‌ها در غلظت زیر حد کشنده بر فشرده شدن، افزایش انشعابات میسلیومی، چروکیدگی و مجعد شدن میسلیوم‌ها و کاهش تولید اسپورها در بزرگنمایی‌های مختلف

Fig 4: The effect of extracts and essences at the under lethal concentrations on compacting, increasing mycelial branches, shriveling and crisping of mycelium and reducing sporolation at different magnifications




شکل ۵: اثر عصاره‌ها و اسانس‌ها در غلظت‌های زیر حد کشنده بر نحوه رشد پرگنه، ۲۰ روز پس از کشت

Fig 5: The effect of under lethal concentrations of extracts and essences on the colonial growth after 20 days



www.SID.ir

در تحقیقات متعددی فعالیت ضدقارچی اسانس‌ها وعصاره‌های گیاهی از جمله اکلیل کوهی (*سویلو*[1] و همکاران، 2006 و *الموگی* و *عبدالقادر*[2]، 2007) و میخک (*چامی*[3] و همکاران، 2004؛ *پاوار* و *تاکر*، 2007؛ *چایب* و همکاران، 2007 و امیری[4] و همکاران، 2008) اثبات شده است. فعالیت ضدقارچی قوی اسانس میخک در بین تعداد زیادی از اسانس‌ها (*کالمبا* و *کونیکا*[5]، 2003) و نیز عملکرد بهتر این اسانس نسبت به اکلیل کوهی در جلوگیری از جوانه‌زنی اسپور بوتریتیس (*ویلسون*[6] و همکاران، 1997) و در کنترل قارچ *Alternaria porri* (*سویلو* و همکاران، 2006)گزارش شده است و با نتایج این پژوهش مطابقت دارد. فعالیت قارچ ایستایی در غلظت‌های پایین و قارچ‌کشی در غلظت‌های بالاتر رخ می‌دهد (شاهی[7] و همکاران، 2003)، که از دلایل بدیهی توصیف فعالیت قارچ ایستایی بیش‌تر نسبت به قارچ‌کشی در تیمار ۴۵۰ پی‌پی‌ام وفعالیت قارچ‌کشی تیمار ۶۰۰ پی‌پی‌ام اسانس میخک در روش تدخینی محسوب می‌شود. سطح اثر ضدقارچی اسانس کاملاً به روش مورد استفاده در آزمایش بستگی دارد (*آنتونی*[8] و همکاران، 2004). فعالیت اسانس‌ها در مقابل میکروارگانیسم‌ها بسته به نوع اسانس و نژاد میکروبی متفاوت است؛ اما همیشه به مقدار اسانس بستگی دارد (*کالمبا* و *کونیکا*، 2003). محققان اثرات بازدارندگی ترکیبات فنلی نظیر اوژنول و تیمول را در مقایسه با ترپن‌هایی نظیر بورنئول و کارون مطالعه کردند. نتایج آن‌ها نشان داد رابطه‌ای بین ساختار شیمیایی ترکیبات با فراوانی بیش‌تر در اسانس و اثرات قارچ‌کشی آن وجود دارد (*ازکان* و *بویراز*[9]، 2000). در فعالیت ضدقارچی ترکیبات اسانس‌ها، ویژگی‌های چربی-دوستی ساختمان هیدروکربنی و ویژگی آب‌دوستی گروه‌های تابع آن‌ها در اهمیت اصلی هستند. فعالیت ضدقارچی ترکیبات اسانس‌ها به این ترتیب است: فنل‌ها >آلدهیدها >کتون‌ها >الکل‌ها >اترها >هیدروکربن‌ها. بیش‌ترین فعالیت برای فنل‌های تیمول، کارواکرول و اوژنول گزارش شده است که به‌وسیله طبیعت اسیدی گروه هیدروکسیل که به آسانی با جایگاه فعال آنزیم‌ها اتصال تشکیل می‌دهد، شرح داده می‌شود (*ازکان* و *بویراز*، 2000 و *دوبی*[10] و همکاران، 2007). بنابراین اسانس‌های شامل ترکیبات عمده‌ی فنلی، بیش‌ترین فعالیت را علیه میکروارگانیسم‌ها نشان می‌دهند و اسانس میخک از آن جمله است، در صورتی‌که اسانس اکلیل کوهی از ۱و۸- سینئول از گروه اترها (با فعالیت ضدقارچی ضعیف‌تر نسبت به فنل‌ها) غنی می‌باشد (*کالمبا* و *کونیکا*، 2003). این یافته‌ها علت نتایج پژوهش حاضر را مبنی بر عملکرد بهتر فرآورده‌های میخک نسبت به اکلیل کوهی شرح می‌دهد. مکانیسم عمل اسانس‌ها علیه میکروارگانیسم‌ها پیچیده است و هنوز کاملاً مشخص نیست. اسانس‌ها به‌علت تعداد زیاد ترکیبات سازنده احتمالاً بیش از یک مکان عمل دارند (*تریپاتی* و همکاران، 2004 و *باکالی* و همکاران، 2008). *کالمبا* و *کانیکا* (2003) با مشاهده تغییرات مورفولوژیکی هنگام کاربرد اوژنول (ترکیب عمده اسانس میخک) و کارواکرول علیه قارچ کلادوسپوریوم - مشابه آن‌چه در این مطالعه رؤیت شد - تغییرات مورفولوژیکی قارچ را به عمل این ترکیبات روی تعدادی از آنزیم‌های دیواره سلولی نظیر کیتینازها و گلوکانازها نسبت دادند. هم‌چنین ترکیب اوژنول بازدارنده تولید آنزیم آمیلاز و پروتئاز در *Bacillus ceraceus* معرفی شده است (*بارت*، 2004). *سویلو* و همکاران (2006) نیز پیشنهاد کردند، تغییرات مورفولوژیک میسلیوم می‌تواند به‌علت نقص در دیواره سلولی باشد، که به دنبال آن نفوذ پذیری غشای پلاسمایی اتفاق می‌افتد. اگرچه اثرات فوق ممکن است پاسخ‌گوی کاهش نرخ رشد میسلیومی باشد، با این وجود مکانیسم عمل این ترکیبات به‌خوبی روشن نیست. خسارت به دیواره سلولی و غشا می‌تواند منجر به نشت ماکرومولکول‌ها و زوال سلول شود. به‌نظر می‌رسد زنجیره انفعالات از دیواره سلولی یا غشای خارجی سلول شروع شده و تمام غشاهای اندامک‌های متفاوت مثل پراکسیزوم‌ها و میتوکندری‌ها را شامل می‌شود. نفوذپذیری غشاهای داخلی و خارجی میتوکندری منجر به مرگ سلول از طریق آپوتسیس و نکروسیس می‌شود. اسانس‌ها می‌توانند به چربی‌ها و پروتئین‌ها خسارت وارد کنند (*باکالی* و همکاران، 2008)، هم‌چنین از ساخت DNA و RNA، پروتئین‌ها و پلی-ساکاریدها در سلول‌های قارچ‌ها جلوگیری می‌کنند (*کالمبا* و *کونیکا*، 2003).

1. Soylu *et al.*
2. El-Mougy and Abdel-Kader
3. Chami *et al.*
4. Amiri *et al.*
5. Kalemba and Kunicka
6. Wilson *et al.*
7. Shahi *et al.*
8. Anthony *et al.*
9. Ozcan and Boyraz
10. Dubey *et al.*



Archive of SID

www.SID.ir

## منابع


Agaoglu, S., Dostbil, N. and Alemdar, S. 2006. Antimicrobial activity of some spices used in the meat industry. Bulletin of Veterinary Institute Pulawy 51: 53-57.

Agrios, GN. 2005. Plant disease caused by fungi: disease caused by ascomycetes and imperfect fungi. Science 922.

Amiri, A., Dugas, R., Pichot, A. L. and Bompeix, G. 2008. *In vitro* and *in vivo* activity of eugenol oil (*Eugenia caryophylata*) against four important postharvest apple pathogens. International Journal of Food Microbiology 126: 13–19.

Angioni, A., Barra, A., Cereti, E., Barile, D., Coisson, J. D., Arlorio, M., Dessi, S., Coroneo, V. and Cabras, P. 2004. Chemical composition plant genetic differences antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*. Agricultural Food Chemistry 52: 3530-3535.

Anthony, S., Abeywickrama, K., Dayananda, R., Wijeratnam, S. W. and Arambewela, L. 2004. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka and their treatment with essential oils. Mycopathologia 157: 91-97.

Arora, D. S. and Kaur, J. 1999. Antimicrobial activity of spices. International Journal of Antimicrobial Agents 12: 257-262.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and. Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food Chemistry Toxicology 46: 446–475.

Bara, M. T. F. and Vanetti, M. C. D. 1996. Antimicrobial effect of spices on the growth of *Yersinia enterocolitica*. Journal of Herbs Spices Medicinal Plants 3: 51-58.

Baratta, M. T. H. J., Damien Dorman, H. J. D., Stanley, G., Deans, S. G. D., Figueiredo, A. C., Jose, G., Barroso, J. G. and Ruberto, G. 1998. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. Flavour and Fragrance Journal 13(4):235-244.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223– 253.

Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A. B., Rouabhia, M., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. Phytotherapy Research 21: 501-506.

Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J. and Remmal, A. 2004. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immune suppressed rats. Brazilian Journal of Infectious Diseases 8: 217-226.

Daferera, D. J., Ziogas, B. N. and Polissiou, M. G. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth *of Botrytis cinerea Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Crop Protection 22: 39–44.

Djenane, D., Sanchez-Escalante, A., Beltran, J. A. and Roncales, P. 2002. Ability of a-tocopherol taurine and rosemary in combination with vitamin C to increase the oxidative stability of beef steaks packaged in modified atmosphere. Food Chemistry 76: 407–415.

Dorman, H. J. D. and Deans, S. G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. Journal of Applied Microbiology 88:308-316.

Dubey, R. K., Kumar, R., Jaya, A. and Dubey, N. K. 2007. Evaluation of *Eupatorium cannabinum* Linn. oil in enhancement of shelf life of mango fruits from fungal rotting. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23:467-473.

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. 2004. *Botrytis*: Biology Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers Dordrecht. The Netherlands 4 pp.

El-Mougy, N. S. and Abdel-Kader, M. M. 2007. Antifungal effect of powdered spices and their extracts on growth and activity of some fungi in relation to damping-off disease control. Journal of Plant Protection Research 47: 267-278.

Gullino, ML. and Kuijpers, L. 1994. Social and political implications of managing plant diseases with restricted fungicides in Europe. Annual Review of Phytopathology 32: 559-579.

Hammer, K. A., Carson, C. F. and Riley, T. V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. Journal of Applied Microbiology 86: 985–990.

Inatani, R., Nakatani, N. and Fuwa, H. 1983. Antioxidative effect of the constituents of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. Agricultural Biology Chemistry 47: 521-528.

Jobling, J. 2000. Essential Oils: A new idea for postharvest disease control. Good fruit and vegetables Magazine 11(3): 50-53.

Kalemba, D. and Kunicka, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry 10:813-829.

Kliskic, M., Radosevic, J., Gudic, S. and Katalinic, V. L. 2000. Aqueous extract of *Rosmarinus officinalis* as inhibitor of Al±Mg alloy corrosion in chloride solution. Journal of Applied Electrochemistry 30: 823-830.

Kramer, R. E. 1985. Antioxidants in Clove. Journal of the American Oil Chemists' Society 62:111-113.

Larhsini, M., Oumoulid, L., Lazrek, H. B., Wataleb, S., Bousaid, M., Bekkouche, K. and Jana, M. 2001. Short communication antibacterial activity of some Moroccan medicinal plants. Phytotherapy Research 15(3):250-252.

Lean, L. P. and Mohamed, S. 1999. Antioxidative and antimycotic effects of turmeric lemon-grass betel leaves clove black pepper leaves and *Garcinia atriviridis* on butter cakes. Journal of the Science of Food and Agriculture 79:1817-1822.


Archive of SID



www.SID.ir

Li, Y., Xu, C., Zhang, Q., Liu, J. Y. and Tan, R. X. 2005. *In vitro* anti-*Helicobacter pylori* action of 30 Chinese herbal medicines used to treat ulcer diseases. Journal of Ethnopharmacology 98:329-333.

Misharina, T. A. and Samusenko, A. L. 2008. Antioxidant properties of essential oils from lemon grapefruit coriander clove and their mixtures. Biochemistry Microbiology 45: 438–442.

Naraghy, M. 2003. Curative flowers and plants. Amir Kabir Press. Iran. 240 PP.

Ouattara, B., Simard, R. E., Holley, R. A., Piette, G. J. P. and Begin, A. 1997. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. International Journal of Food Microbiology 37:155-162.

Oussalah, M., Caillet, S., Saucier, L. and Lacroix, M. 2006. Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. Meat Science 73: 236–244.

Ozcan, M. and Boyraz, N. 2000. Antifungal properties of some herb decoctions. European Food Research Technology 212: 86-88.

Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P. L. and Morelli, I. 1993. Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean *Labiatae*. Journal of Ethnopharmacology 39(3):167-70.

Park, K. and Shin, S. C. 2005. Fumigant activity of plant essential oils and components from garlic (*Allium sativum*) and clove bud (*Eugenia caryophyllata*) oils against the Japanese termite (*Reticulitermes speratus* Kolbe). Journal of Agricultural Food Chemistry 53 (11): 4388 -4392.

Pawar, V. C. and Thaker, V. S. 2007. Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum sp. cicer* and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils. World Journal of Microbiology and Biotechnology 23:1099–1106.

Pumnuan, J., Insung, A. and Chandrapatya, A. 2008. Acaricidal effects of herb extracts on the mushroom mites *Luciaphorus perniciosus* rack and *Formicomotes heteromorphus* magowski. Systematic and Applied Acarology 13:33–38.

Sangwan, N. K., Verma, B. S., Verma, K. K. and Dhindsa, K. S. 1990. Nematicidal activity of some essential plant oils. Pesticide Science 28: 331-335.

Shahi, S. K., Patra, M., Shukla, P. A. C. and Dikshit, A. 2003. Use of essential oil as botanical-pestiside against postharvest spoilage in *Mallus pumilo* fruits. Biocontrol. 48: 223-232.

Smith-Palmer, A., Stewart, J. and Fyfe, L. 1998. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. Applied Microbiology 26:118-122.

Soylu, E. M., Soylu, S. and Kurt, S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia 161: 119-128.

Thompson, D. P. 1989. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. Mycologia 81: 151-153.

Thorsten, H. and Huhndorf, M. S. 2007. (eds.) Outline of Ascomycota. Department of Botany Myconet 13: 1403-1418.

Tripathi, P. and Dubay, N. K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables review. Postharvest Biology and Technology 32: 235-245.

Tripathi, P., Dubey, N. K. and Shukla, A. K. 2008. Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24:39–46.

Tzortzakis, N. G. 2007. Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. Innovative Food Science Emerging Technology 8: 111–116.

Vareltzis, K., Koufidis, D., Gavriilidou, E., Papavergou, E. and Vasiliadou, S. 1997. Effectiveness of natural rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract on the stability of filleted and minced fish during frozen storage. Springer-Verlag 205: 93–96.

Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V. G. and Cole, M. 2004. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. Phytopathology 94(8): 850-857.

Wenqiang, G., Shufen, L., Ruixiang, Y., Shaokun, T. and Can, Q. 2007. Comparison of essential oils of clove buds extracted with supercritical carbon dioxide and other three traditional extraction methods. Food Chemistry 101:1558-1564.

Wilson, C. L., Solar, J. M., El Ghaouth, A. and Wisniewski, M.E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant disease 81(2): 204-210.

Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R. and Taheri, H. 2008. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 1445–1450.

Archive of SID



www.SID.ir

# The Effect of Clove Buds and Rosemary Extracts and Essences on Control of *Botrytis cinerea* Growth

**Vesaltalab[1], Z. and Gholami[2*], M.**

**Abstract**

The use of natural compounds due to their antifungal, antibacterial and antioxidant properties is proceeding in control of post harvest wastes especially postharvest decay. In this study Clove and Rosemary extracts were prepared using ethanol extraction and the essences were extracted with Clevenger apparatus. The effect of extracts on *B. cinerea* as pathogenic fungi was investigated by poisoned food and the effect of essences by fumigation and also poisoned food (contact) method, using different concentrations from 0 to 600 ppm. The ethanol extract of both plants had no fungi static effect. Clove essence at concentration of 300 ppm in poisoned food method and at 450 and 600 ppm in fumigation method stopped the fungus growth showing fungicide properties. 300, 450 and 600 ppm of rosemary essence in fumigation method, stopped the fungus mycelia growth showing fungi static properties. In the same concentrations, essence compared to ethanol extract, fumigation method to poisoned food method and clove to rosemary, showed greater antifungal effects.

**Keywords:** *Rosmarinus officinalis*, *Eugenia caryophyllata*, Poisoned food method, Fumigation method, Antifungal activity

Archive of SID

1. MSC graduate in Horticultural,,Department of Horticultural Sciences,, BU-Ali sina University, Hamedan
2. Associate professor in Department of Horticultural Sciences, BU-Ali sina University, Hamedan
*: Coresponding author Email: mgholami@basu.ac.ir



www.SID.ir