Archive of SID

فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی (دوره۳-شماره ۱)..... صفحات ۵۳ تا ۶۶

بررسی تأثیر عصاره‌های گیاهی علیه بیماری کپک خاکستری سیب با عامل *Botrytis cinerea*

جلال غلام نژاد*[1]

[1]دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه اردکان، اردکان، یزد

چکیده

برای کنترل بیماریزا گیاهی از قارچ‌کش‌های شیمیایی استفاده می‌شود. مصرف این قارچ‌کش‌ها باعث مخاطراتی برای انسان و محیط‌زیست می‌شود. دراین‌بین، به‌عنوان یک جایگزین مناسب برای سموم شیمیایی، از عصاره‌های گیاهی به‌عنوان یک روش سازگاربامحیط‌زیست می‌توان استفاده کرد. در این پژوهش از عصاره‌های آبی و متانولی اسطوخودوس (*Lavandula officinalis*L.)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، پونهٔ آبی (*Mentha aquatica*)، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و اکالیپتوس (*Eucalyptuscamaldulensis dehn*) جهت کنترل بیماریزا کپک خاکستری سیب با عامل *بوتریتس سینرآ*، در آزمایشگاه و در انبار ۴°C استفاده شد. بر اساس نتایج در مورد آزمون دیسک گذاری در محیط کشت، عصارهٔ آبی اسطوخودوس با غلظت ۵۰۰µg/ml و ۲۲ mm قطر ممانعت از قارچ بیماریزا، دارای بیشترین اثر کنترل‌کنندگی و عصارهٔ پونهٔ‌آبی با غلظت µg/ml ۵۰ و ۳/۲۲mm قطر ممانعت از قارچ بیماریزا، دارای کمترین اثر کنترل‌کنندگی، درزمینهٔ کاهش رشد قارچ بود. در مورد عصاره-های متانولی نیز عصارهٔ اسطوخودوس با غلظت ۵۰۰µg/ml و ۳۱/۶۲ mm قطر ممانعت از قارچ بیماریزا، بهترین عصاره بود. در آزمون اختلاط با محیط کشت نیز عصاره‌های آبی و الکلی اسطوخودوس با میزان ۶۳/۰۵ و ۷۷/۶۱ درصد ممانعت از قارچ بیماریزا به ترتیب، نسبت به شاهد در غلظت µg/ml ۵۰۰ بهترین کنترل‌کنندگی را نشان داد. بر اساس نتایج آزمایشگاهی بعد از اسطوخودوس، عصارهٔ گیاه رازیانه در حلال‌های آبی و عصارهٔ گیاه اکالیپتوس در حلال الکلی بهترین اثر کنترل‌کنندگی را در هر دو آزمون داشتند. در آزمون انبار °C ۴ سطح لکهٔ ایجادشده در تیمار عصاره‌های آبی اسطوخودوس و رازیانه با غلظت شش در ۱۰۰۰ به میزان cm^2 ۸/۵۷ و cm^2 ۱۱/۷۲ کمترین میزان خود را در مقایسه با سایر تیمارها و همچنین تیمار شاهد (با میزان cm^2 ۳۰/۴۷) داشتند. بر اساس نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی و انباری عصارهٔ گیاهان اسطوخودوس و رازیانه به‌عنوان ترکیبات طبیعی با پتانسیل کنترل‌کنندگی بالا معرفی می‌شوند.

کلمات کلیدی: اسطوخودوس، اکالیپتوس، آویشن‌دار، *بوتریتس سینرآ*، پونهٔ‌آبی، رازیانه، سیب، عصارهٔ گیاهان و کپک خاکستری

* jgholamnezhad@ardakan.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماریزا کپک خاکستری توسط گونه‌های *بوتریتیس سینرآ*[1] و *بوتریتیس مالی*[2] ایجاد می‌شود و یکی از مهم‌ترین بیماریزا بعد از برداشت میوهٔ سیب می‌باشد (۱). در حال حاضر سهل‌الوصول‌ترین روش مدیریت بیماریزا بعد از برداشت میوه‌ها و به‌خصوص سیب استفاده از قارچ‌کش‌های سنتزی است (۲). کنترل بیماریزا کپک خاکستری به دلیل ویژگی زیستی این بیماریزا، سازگاری با شرایط محیطی متفاوت، قدرت تخریب در زمان برداشت و مقاومت به قارچ‌کش‌های مختلف همچنان موردبحث است (۳). ازیک‌طرف به دلیل نگرانی‌هایی که در مورد آلودگی محیط‌زیست و همچنین به مخاطره افتادن سلامت انسان وجود دارد و از طرف دیگر ایجاد مقاومت در جدایه‌های عوامل بیماریزا علیه این قارچ‌کش‌ها، تحقیق در مورد یافتن روش‌های کم زیان‌تر و کم‌خطرتر را افزایش داده است. در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی در استفاده از مواد با منشأ طبیعی برای کنترل بیماریزا بعد از برداشت انجام و تحقیقات زیادی در این زمینه صورت گرفته است (۴). به علت ایجاد مقاومت به قارچ‌کش‌ها و مخاطرات زیست‌محیطی، استفاده از این قارچ‌کش‌های شیمیایی علیه این بیماریزا محدودشده است. نژادهای مقاوم این بیماریزا نسبت به قارچ‌کش‌های بنومیل، دیکلران، ایپرودین و همچنین کاپتان مقاوم گزارش‌شده است (۵). نظر به خسارت‌بین ترکیبات شیمیایی، استفاده از ترکیباتی که منشأ طبیعی دارند می‌تواند راه‌حل مؤثری برای کنترل این بیماریزا و به‌طورکلی بیماریزا بعد از برداشت محصولات باشد. تا حالا گزارشی مبنی بر مقاومت بیماریزا نسبت به اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی گزارش نشده است که این موضوع را می‌توان به تعدد ترکیبات سازندهٔ اسانس‌ها و نیز عصاره‌ها و همچنین چند عملکرده بودن این عصاره‌ها در سلول‌های گیاهی مرتبط دانست (۶). از دیگر مزایای استفاده از عصاره‌های گیاهی برای مدیریت بیماریزا بعد از برداشت این است که pH و دمای پایین و همچنین کم بودن سطوح اکسیژن فعالیت ضد قارچی و ضدمیکروبی عصاره‌های گیاهی را بهبود می‌بخشد و درواقع این شرایط مشابه شرایط نگهداری محصولات باغی به‌خصوص سیب است (۷).

ازآنجایی‌که پوسیدگی خاکستری سیب یکی از مهم‌ترین بیماریزا بعد از برداشت سیب می‌باشد و از طرفی عصاره‌های گیاهی ازجمله ترکیبات سازگار با محیط‌زیست با منشأ گیاهی است، درنتیجه در این پژوهش اثر عصاره‌های گیاهی شامل اسطوخودوس[3]، رازیانه[4]، پونهٔ آبی[5]، آویشن شیرازی[6] و اکالیپتوس[7] هم در آزمایشگاه هم در محیط انبار (دمای ۴ °C) بر قارچ بیماریزا بوتریتیس سینرا ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

عامل بیماریزا

در این بررسی قارچ بیماریزا *بوتریتس سینرآ* از سردخانه نعیم‌آباد شهر یزد از روی سیب آلوده به بیماریزا کپک خاکستری، جداسازی و در این مطالعه استفاده شد. قارچ عامل بیماریزا روی محیط PDA[8] در دمای ۴ °C نگهداری شد. برای جداسازی بوتریتس سینرآ قطعهٔ نیم تا ۱ cm از میوه‌ای آلودهٔ سیب درروی محیط کشت PDA کشت داده شد. برای شناسایی سویه جدا شده بر روی محیط PDA کشت و در دمای ۲۰ تا ۲۲°C به مدت هفت روز در روشنایی قرار داده‌شده و خصوصیات مورفولوژیکی قارچ ازجمله طول کنیدیوفور، ابعاد کنیدیوم و اسکلروت قارچ اندازه‌گیری شد. برای تهیهٔ اسکلروت قارچ، محیط کشت حاوی قارچ در تاریکی و دمای ۸°C نگهداری شد. ابعاد ۵۰ عدد از کنید یوم‌ها و طول ۳۰ عدد از کنیدیوفورها، به‌عنوان پارامترهای شناسایی قارچ اندازه‌گیری شد. علاوه بر این، شکل و رنگ کلنی قارچ، شکل کنیدیوم، رنگ، نحوهٔ توزیع اسکلروت‌های قارچ بر روی محیط PDA

[1] *Botrytis cinerea* Pers ex Fr
[2] *B.mali* Ruehle
[3] *Lavandula officinalis* L.
[4] *Foeniculum vulgare*
[5] *Mentha aquatica*
[6] *Zataria multiflora*
[7] *Eucalyptus camaldulensis dehn*
[8] Potato Dextrose Agar

www.SID.ir

Archive of SID

مشاهده و موردبررسی قرار گرفت. خصوصیات مورفولوژیکی بر اساس کلید شناسایی الیس[1] و همکاران در سال ۱۹۷۱ موردبررسی قرار گرفت (۸).

مواد گیاهی

در این تحقیق، از عصارهٔ گیاهان آویشن[2] (قسمت‌های های هوایی)، اکالیپتوس (برگ)، اسطوخودوس (برگ)، پونه آبی (برگ) و رازیانه (میوه یا همان بذر) استفاده شد، برگ اکالیپتوس از درخت مزبور که در فضای سبز استان یزد به‌وفور وجود دارد جداسازی شد. بقیهٔ مواد گیاهی از مراکز فروش گیاهان دارویی زیر نظر متخصص گیاه‌شناسی در استان یزد خریداری شد. این گیاهان ابتدا شستشوی سطحی شده و سپس به‌وسیلهٔ هیپوکلریت ۲ درصد به مدت min ۵ ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل سه مرتبه شسته شدند (۹). نمونه‌های گیاهی در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش مستقیم نور آفتاب خشک شدند. سپس اندام‌های هوایی به‌وسیلهٔ خردکن پودر شده و از الک یک مش عبور داده شدند (۱۰).

تهیهٔ عصاره‌های گیاهی به دو روش استفاده از متانول و آب انجام شد. درروش استفاده از متانول، پنج گرم از مادهٔ خشک گیاهی در ml۱۰۰ متانول خالص (شرکت Merk) خیسانده شد و بعد از h ۲۴ مادهٔ گیاهی همراه متانول در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل صاف‌شده و در rpm ۵۰۰۰ به مدت min ۱۰ سانتریفوژ شد، mm ۷۵ از محلول رویی به یک استوانهٔ مدرج منتقل‌شده، mm ۲۵ آب مقطر استریل به آن اضافه شد تا حجم آن به mm ۱۰۰ برسد، سپس هم‌حجم با آن هگزان اضافه شد. این مخلوط h ۲ روی شیکر قرار داده شد، پس‌ازاین مرحله، بخش‌های مختلف به کمک دکانتور جداشده و بخش متانولی جهت تبخیر متانول و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد (۱۱).

درروش دوم بعد از ضدعفونی سطحی نمونه‌های گیاهی g ۵ از مادهٔ خشک گیاهی در ml ۱۰۰ آب مقطر استریل خیسانده شد و پس از h ۲۴ از صافی عبور داده شد و سانتریفوژ شد. در این مرحله به‌منظور استریل کردن عصارهٔ آبی از صافی میکروبیولوژیک µm ۰.۲استفاده شد (۱۲).

تأثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیماریزا با استفاده از روش دیسک کاغذی

مقدار ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰ و mg ۵۰۰ از هر عصاره در ml ۱از حلال مناسب حل شد و مورداستفاده قرار گرفت (۱۳). در مورد عصاره‌های آبی از آب مقطر و در مورد عصاره‌های متانولی از متانول ۴۵ درصد به‌عنوان حلال استفاده شد. سپس µl ۵۰ از هر نمونه (طی پنج مرحله، هر بار µl ۱۰) با استفاده از سمپلر روی دیسک‌های کاغذ صافی به قطر mm ۶ بارگذاری شده و برای تبخیر حلال در فضای آزمایشگاه قرار داده شد. برای بررسی اثر آنتی‌میکروبیال عصاره‌های گیاهی از حاشیهٔ کلنی هفت‌روزهٔ قارچ بیماریزا روی محیط PDA، قرص‌هایی به قطر mm ۶ توسط چوب‌پنبه سوراخ‌کن تهیه و در وسط پتری حاوی محیط PDA قرار داده شد. در دمای ^{o}C ۲۵ در انکوباتور، قطر کلنی قارچ بیماریزا بعد از h ۲۴ به حدود cm ۱/۵ رسید. پس‌ازاین مرحله دیسک‌های حاوی عصاره‌ها در فاصلهٔ cm ۲ حاشیهٔ روییده قارچ قرار داده شد، سپس در فواصل زمانی مختلف، شعاع هالهٔ بازدارندگی از روبرو پتری یادداشت‌برداری شد و میانگین آن در محاسبات لحاظ شد. در این آزمایش، از حلال موردنظر به‌عنوان شاهد منفی استفاده شد. آزمایش در چهار تکرار انجام شد. به‌منظور بررسی اثر قارچ‌کشی و یا قارچ ایستایی عصاره‌های مؤثر گیاهی قطعهٔ کوچکی از میسلیوم قارچ برداشته و روی محیط PDA واکشت شد تا رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت جدید بررسی شود (۱۴).

[1] Ellis
[2] *Thymus vulgaris*

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیماریزا با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت

در هر طرف پتری که حاوی ۲۰ml محیط‌زیست PDA عصاره بود. عصاره‌های گیاهی (رازیانه و اسطوخودوس) در غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ در هزار به همراه ۰/۰۰۵ درصد توین ۸۰ به محیط کشت اضافه شد. پلاکی از حاشیهٔ‌کشت هفت‌روزهٔ قارچ بیماریزا *بوتریتس سینرآ* در مرکز ظروف پتری قرار داده شد و تا روز پنجم قطر میسلیومی آن اندازه-گیری شد. تمامی مراحل در شرایط استریل و در سه تکرار صورت گرفت و همهٔ آزمایش‌ها دو بار انجام شد (۱۵). درصد بازدارندگی رشد میسلیومی هر تیمار از فرمول زیر (۱) محاسبه شد:

فرمول (۱) $\text{درصد بازدارندگی رشد قارچ} = \frac{(A-B)}{A}$

A: قطر کلنی در شاهد

B: قطر کلنی در تیمار

بررسی اثر عصاره‌ها در کنترل بیماریزا کپک خاکستری سیب در انبار

در این آزمون از میوه‌های سالم و بدون زخم رقم Golden deliciousکه از میدان‌ها میوه شهرستان یزد تهیه‌شده بود استفاده شد و نهایت دقت در استفاده از رقم مشابه به عمل آمد. در این آزمایش‌ها سعی بر استفاده از میوه‌ها با اندازهٔ یکسان بوده است. برای ضدعفونی سطحی، میوه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد غوطه‌ور و سپس دو بار با آب سترون شستشو داده شدند و درنهایت به مدت ۲۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند، سپس توسط یک میخ استریل سه سوراخ به قطرهای ۲/۵ mm و عمق ۳mm در هر سیب ایجاد شد. اسپورهای قارچ بیماریزا از کشت هفت‌روزه روی محیط کشت PDA تهیه شد. ابتدا یک لوپ از اسپور قارچ عامل بیماری از روی محیط کشت برداشته شد و بعد در ۱۰ ml آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد (حجم به حجم) توئین ۲۰ غوطه‌ور گردیدند. ازسوسپانسیون حاصل جهت تهیه غلظت‌های موردنیاز استفاده شد. غلظت موردنیاز که 10^6 کنیدی در هر میلی‌لیتر آب مقطر استریل بود، با استفاده از لام هماسیتومتر و افزودن آب مقطر سترون به دست آمد (۱۶). پس از گذشت h ۱و خشک شدن زخم‌ها، محل زخم با µl ۲۰ سوسپانسیون قارچ بیماریزا مایه‌زنی شد. پس از خشک شدن زخم‌ها میوه‌ها به‌وسیلهٔ محلول‌های تهیه‌شده از عصاره-ها با غلظت‌های ۱، ۲، ۴ و ۶ در هزار محلول‌پاشی و در ظروف یک‌بارمصرف بسته‌بندی‌شده و به مدت یک هفته در اتاق کشت با دمای ۲۴ °C و رطوبت نسبی ۸۰ درصد در شرایط سترون نگهداری شد. بعد از طی دورهٔ نگهداری زخم‌ها ازنظر ایجاد پوسیدگی چهار بار (هر پنج روز یک‌بار)، بررسی‌شده و قطر لکه‌ها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد. در این آزمایش برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد که هر تکرار شامل سه میوه و هر میوه دارای دو زخم بود. همچنین از قارچ‌کش تیابندازول با غلظت ۱، ۲و ۴ در هزار به‌عنوان یک تیمار جهت مقایسه استفاده شد. سیب‌های محلول‌پاشی شده با توین ۸۰ بدون اسپور قارچ به‌عنوان شاهد سالم در نظر گرفته شد (۱۷).

این آزمایش به‌صورت آزمون فاکتوریل با دو فاکتور A و B در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. فاکتور A شامل عصاره‌های مختلف و فاکتور B نیز شامل غلظت‌های مختلف عصاره است که در آزمون‌های مختلف دارای تعداد سطوح مختلف است.

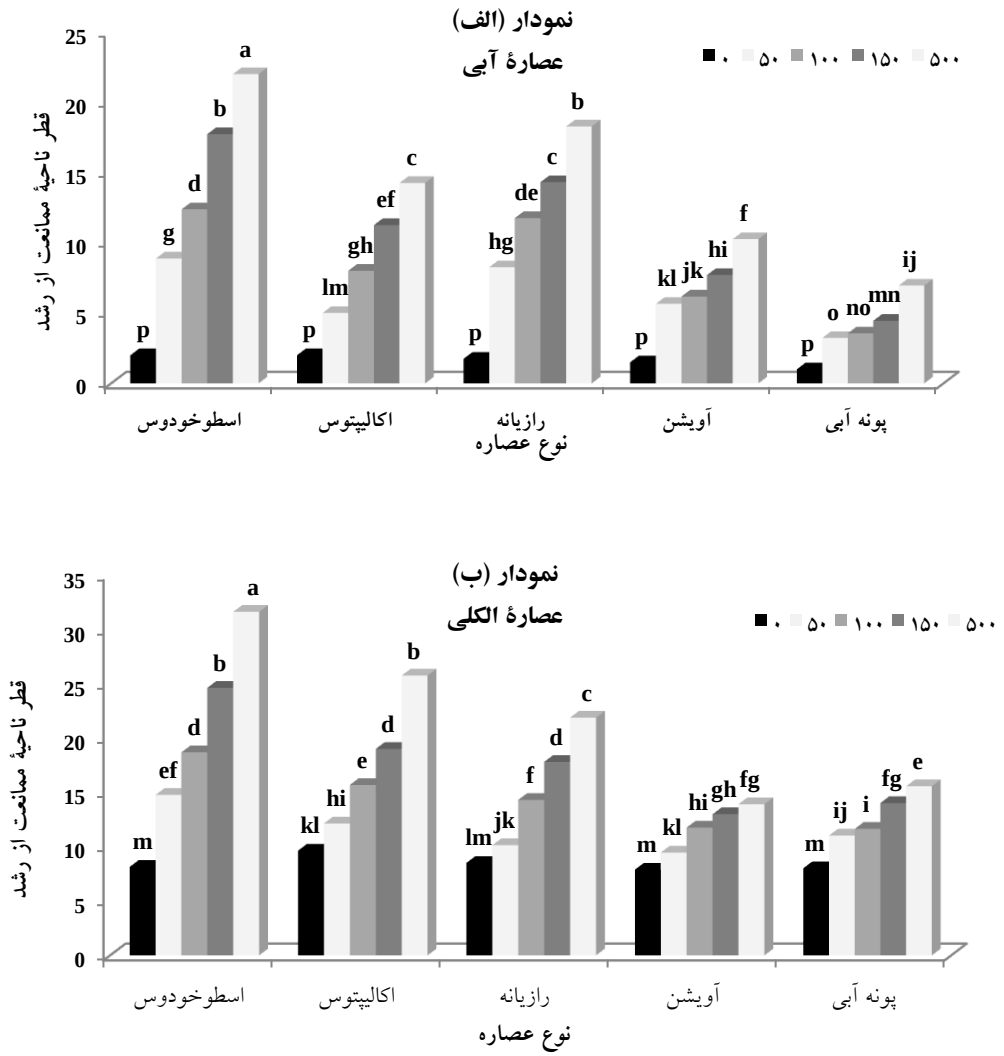
نتایج

بر اساس کلید الیس و واکر[1] قارچ بیماریزا جداسازی شده از سیب *بوتریتس سینرآ* تشخیص داده شد.

[1] Ellis & Walker

www.SID.ir

Archive of SID



شکل (۱) تأثیر عصاره‌های آبی (شکل الف) و متانولی (شکل ب)

آویشن، اکالیپتوس، اسطوخودوس، پونه آبی و رازیانه بر میزان ممانعت از رشد میسلیومی قارچ بیماریزا *B. cinerea* به‌صورت قطر ناحیهٔ بازدارندگی (میلی-متر) به روش استفاده از دیسک کاغذی؛ اعداد میانگین چهار تکرار است. عصاره‌های مختلف در غلظت‌های ۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میکرو لیتر استفاده شدند.

جدول (۱) تجزیه واریانس مربوط به آزمون تأثیر عصاره‌های آبی و الکلی گیاهی بر میزان رشد قارچ *B. cinerea* به روش استفاده از دیسک کاغذی

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)		F	
		آبی	الکلی	آبی	الکلی
عصاره‌ها (فاکتور A)	۴	۹۷۴/۸۵	۲۳۰/۳۱	۴۲۹/۵۵**	۳۳۲/۴۳**
غلظت (فاکتورB)	۴	۴۶۱/۳۸	۵۴۱/۰۴	۸۱۳/۲۰**	۷۸۰/۹۴**
قارچ× غلظت(فاکتورA×فاکتورB)	۱۶	۰/۰۴۷	۳۰/۷۰	۳۹/۵۸**	۳۰/۷۰**
خطای آزمایش	۷۵	۰/۵۶	۰/۶۹		
کل	۹۹				

** به‌احتمال ۹۹/۹۹ درصد ($P\leq$۰/۰۵) اختلاف معنی‌دار است.

C.V= ٪۹/۰۳ برای عصاره آبی و C.V= ٪۵/۶۴، برای عصارهٔ الکلی، داده‌ها نرمال بودند.

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج جدول تجزیه واریانس۱ نشان می‌دهد که به‌احتمال ۹۹ درصد بین عصاره‌های موردبررسی، در هر دو روش استفاده از عصاره‌های آبی و متانولی و غلظت‌های مختلف آن‌ها و همچنین بین اثرات متقابل این دو بر کاهش میزان رشد هالهٔ قارچ، به روش آزمون دیسک اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در این آزمون، عصارهٔ آبی اسطوخودوس با غلظت µg/ml ۵۰۰ و mm ۲۲ قطر ممانعت از قارچ و عصارهٔ رازیانه با غلظت µg/ml ۵۰۰ و ۱۸/۷۵mm قطر ممانعت از قارچ بیماریزا، بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین ممانعت کنندگی مربوط به شاهد و در بین تیمار عصاره‌ها مربوط به غلظت µg/ml ۵۰ پونهٔ آبی بود که میزان آن به ترتیب ۱و mm ۳/۲۲ قطر ممانعت از قارچ بود. در مورد عصاره‌های الکلی، عصاره‌های اسطوخودوس با غلظت‌های ۵۰۰ و µg/ml ۱۵۰ و ۳۱/۶۲ و mm ۲۴/۶۱ میلی‌متر قطر ممانعت از قارچ بیماریزا، بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین ممانعت کنندگی مربوط به شاهد و در بین تیمار عصاره‌ها مربوط به غلظت µg/ml۵۰ آویشن بود که میزان آن به ترتیب ۷/۸۰ و mm ۹/۴۵ قطر ممانعت از قارچ بود. (شکل ۱ الف و ب).

نتایج جدول تجزیه واریانس ۲ نشان می‌دهد که به‌احتمال ۹۹ درصد بین عصاره‌های موردبررسی، در هر دو روش استفاده از عصاره‌های آبی و متانولی و غلظت‌های مختلف آن‌ها و همچنین بین اثرات متقابل این دو بر کاهش میزان رشد هالهٔ قارچ، به روش آزمون اختلاط با محیط کشت اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در این آزمون، عصاره‌های آبی اسطوخودوس با غلظت‌های ۵۰۰ و µg/ml ۱۵۰ و با ۶۳/۰۵ و ۵۴/۷۵ درصد ممانعت از قارچ بیماریزا نسبت به شاهد به ترتیب بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین درصد ممانعت از رشد قارچ بیماریزا نسبت به شاهد، مربوط به غلظت µg/ml ۵۰ پونهٔ آبی بود که میزان ۸/۴۶ درصد ممانعت از رشد نسبت به شاهد بود. در مورد عصاره‌های الکلی، روند دقیقاً مانند عصاره‌های آبی بود. عصاره‌های الکلی اسطوخودوس با غلظت‌های ۵۰۰ و µg/ml ۱۵۰ و با ۷۷/۶۱ و ۶۷/۷۵ درصد ممانعت از قارچ بیماریزا نسبت به شاهد به ترتیب بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین درصد ممانعت از رشد قارچ بیماریزا نسبت به شاهد، مربوط به غلظت µg/ml ۵۰ پونهٔ آبی و آویشن بود که میزان آن به ترتیب ۲۰/۶۵ و ۲۱/۶۲ درصد ممانعت از رشد نسبت به شاهد بود (شکل ۲ الف و ب).

جدول (۲) تجزیه واریانس مربوط به آزمون تأثیر عصاره‌های آبی و الکلی گیاهی بر میزان رشد قارچ بیماریزا *B. cinerea* به روش استفاده از اختلاط با محیط کشت

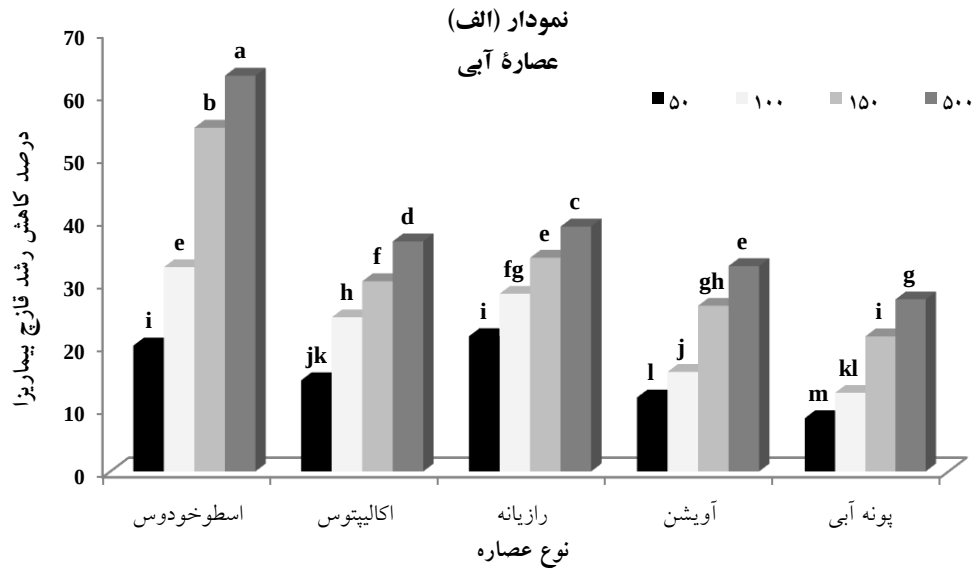
منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)	میانگین مربعات (MS)		F	
		آبی	الکلی	آبی	الکلی
عصاره‌ها (فاکتور A)	۴	۱۴۷۱/۳۴	۲۶۷۷/۹۶	۶۴۷/۲۸**	۱۱۸۱/۶۰**
غلظت (فاکتورB)	۳	۲۳۰۹/۸۷	۳۱۵۰/۳۶	۱۰۱۶/۱۷**	۱۳۹۰/۰۴**
قارچ× غلظت(فاکتورA×فاکتورB)	۱۲	۱۲۳/۰۹۷	۱۷۹/۲۴	۵۴/۱۵**	۱۷۹/۲۴**
خطای آزمایش	۶۰	۲/۷۳	۰/۶۹		
کل	۷۹				

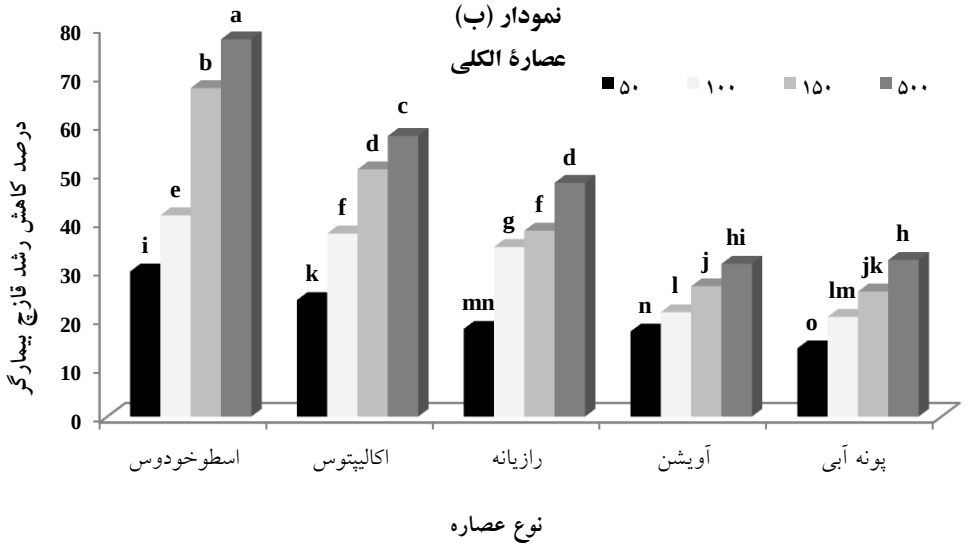
** به‌احتمال ۹۹/۹۹ درصد ($p\leq$۰/۰۱) اختلاف معنی‌دار است.

C.V= ٪۵/۴۳ برای عصاره آبی و C.V= ٪۵/۶۴، برای عصارهٔ الکلی، داده‌ها نرمال بودند.

www.SID.ir

Archive of SID





شکل (۲) تأثیر عصاره‌های آبی (شکل الف) و متانولی (شکل ب)

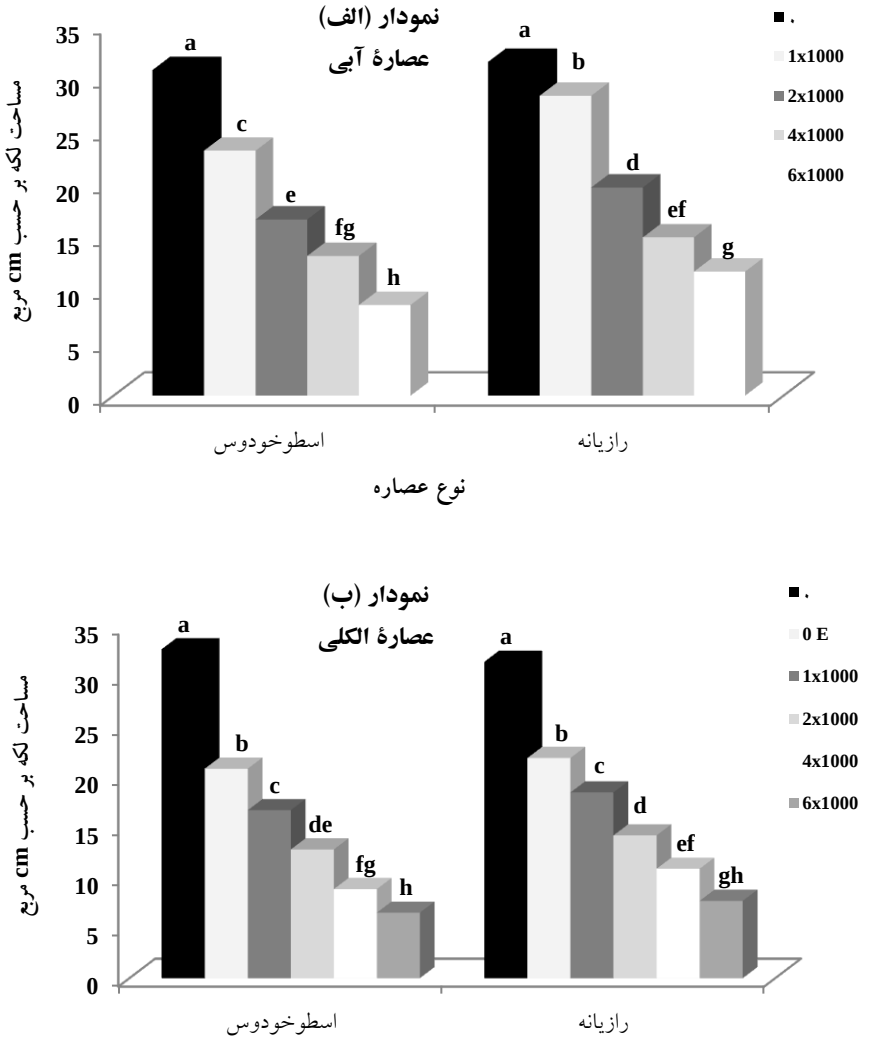
گیاهان آویشن، اکالیپتوس، اسطوخودوس، پونه آبی و رازیانه بر کاهش از رشد میسلیومی قارچ بیماریزا *B. cinerea* به‌صورت درصد بازدارندگی در مقایسه با شاهد به روش اختلاط با محیط کشت؛ اعداد میانگین چهار تکرار است. عصاره‌های مختلف در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میکرو لیتر استفاده شدند.

نتایج جدول تجزیه واریانس ۳ نشان می‌دهد که به‌احتمال ۹۹ درصد بین عصاره‌های موردبررسی، در هر دو روش استفاده از عصاره‌های آبی و متانولی و غلظت‌های مختلف آن‌ها و همچنین بین اثرات متقابل این دو بر میزان بیماریزا و کاهش سطح لکهٔ ایجادشده بر روی سیب که به‌صورت پاشش بر روی سیب در انبار استفاده شد، اختلاف معنی‌دار وجود دارد. در این آزمون، سطح لکهٔ ایجادشده در تیمار عصاره‌های آبی اسطوخودوس و رازیانه با غلظت شش در ۱۰۰۰ به میزان ۸/۵۷ و ۱۱/۷۲ cm^2 کمترین میزان خود را در مقایسه با سایر تیمارها همچنین تیمار شاهد (با میزان ۳۰/۴۷ cm^2) داشتند، به‌عبارت‌دیگر این غلظت از عصاره‌های اسطوخودوس و رازیانه بیشترین کنترل‌کنندگی را در انبار از خود نشان دادند. بیشترین میزان سطح لکه بعد از شاهد مربوط به تیمار یک در ۱۰۰۰ عصارهٔ‌آبی رازیانه در انبار بود. در مورد عصاره‌های الکلی، روند تقریباً مانند عصاره‌های آبی بود با این تفاوت که تیمار الکل تنها نیز، در

www.SID.ir

Archive of SID

مقایسه با تیمار آب مقطر تنها نیز باعث کاهش میزان سطح لکه‌ها شد، به‌طوری‌که میزان سطح لکه‌ها در تیمار الکل تنها ۲۰/۸۳ cm^2 بود درصورتی‌که در تیمار شاهد (آب مقطر) ۳۲/۷۴ cm^2 بود. سطح لکه‌های ایجادشده در تیمار عصاره‌های الکلی اسطوخودوس و رازیانه با غلظت‌های شش در ۱۰۰۰ به میزان ۶/۵۰ و ۷/۶۸ cm^2 بود و به ترتیب این عصاره‌ها، بهترین عصاره‌ها بودند (شکل ۳ الف و ب).



شکل (۳) تأثیر عصاره‌های آبی (شکل الف) و متانولی (شکل ب)

گیاهان آویشن، اکالیپتوس، اسطوخودوس، پونه آبی و رازیانه بر کاهش میزان خسارت قارچ بیماریزا *B. cinerea* به‌صورت کاهش میزان مساحت ناحیهٔ آلودگی در انبار (سانتی‌متر مربع)؛ اعداد میانگین چهار تکرار است. عصاره‌های مختلف در غلظت‌های ۰، ۱۰۰۰،۲۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۶۰۰۰ در هزار آب مقطر استفاده شدند. 0E: شاهد بدون عصاره و با عصارهٔ الکلی است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول (۳) تجزیه واریانس مربوط به آزمون تأثیر عصاره‌های آبی و الکلی (اسطوخودوس، رازیانه) گیاهی بر میزان بیماریزا قارچ بیماریزا*cinerea* . در انبار با دمای ۴ °C

منبع تغییرات (S.O.V)	درجه آزادی (df)		میانگین مربعات (MS)		F	
	آبی	الکلی	آبی	الکلی	آبی	الکلی
عصاره‌ها (فاکتور A)	۱	۱	۸۰/۴۱	۱۲/۷۹	۳۵/۵۲**	۵/۹۰*
غلظت (فاکتورB)	۴	۵	۵۸۵/۳۰	۶۵۵/۱۲	۲۵۸/۵۰**	/۲۷** ۳۰۲
قارچ× غلظت(فاکتورA×فاکتورB)	۴	۵	۲۰/۹۱	۲/۷۵	۲/۳۱^{ns}	۱/۲۷^{ns}
خطای آزمایش	۳۰	۳۶	۲/۲۶	۲/۱۶		
کل	۳۹	۴۷				

** به‌احتمال ۹۹/۹۹ درصد ($p\leq$۰/۰۱) اختلاف معنی‌دار است.

C.V= ٪۵/۴۳ برای عصاره آبی و C.V= ٪۸/۶۹، برای عصارهٔ الکلی، داده‌ها نرمال بودند.

بحث

خاصیت تجزیه‌پذیری عصاره‌های گیاهی در طبیعت و سمیت پایین آن‌ها برای انسان و سایر پستانداران و همچنین نداشتن اثرات مخرب کمتر آن‌ها بر محیط‌زیست، این ترکیبات را به‌عنوان ترکیبات جایگزین سموم شیمیایی مطرح کرده است. عصاره‌های گیاهی با داشتن مواد و عناصر غذایی در افزایش رشد گیاه مفید بوده و برای انسان و محیط‌زیست بی‌خطر هستند. در تحقیقی خاصیت ضد قارچی بعضی از گیاهان مانند رزماری، مریم‌گلی، میخک، آویشن، مرزه، زیره و نعناع به اثبات رسید (۱۸). با توجه به نتایج به‌دست‌آمده از دو آزمون استفاده از دیسک کاغذی و همچنین استفاده از عصاره‌ها در محیط کشت نشان داده شد که به‌طورکلی با افزایش غلظت عصاره‌ها، میزان فعالیت ضد قارچی افزایش پیدا می‌کند. بیشترین میزان فعالیت قارچ‌کشی مربوط به عصارهٔ گیاه اسطوخودوس است. عصارهٔ این گیاه همراه با گیاه رازیانه و اکالیپتوس بیشترین اثر قارچ‌کشی را بر قارچ بیماریزا *بوتریتس سینرآ* از خود نشان دادند و هر چه بر میزان غلظت این ترکیب افزوده می‌شد، میزان فعالیت قارچ‌کشی در هر دو آزمون در آزمایشگاه، یعنی استفاده از دیسک‌های کاغذی و روش اختلاط عصاره با محیط کشت، افزوده می‌شد. در مورد عصاره‌های الکلی نیز بیشترین میزان فعالیت ضد قارچی مربوط به عصارهٔ اسطوخودوس بود ولی در هر دو آزمون بعد از اسطوخودوس، عصارهٔ برگ گیاه اکالیپتوس بیشترین فعالیت ضد قارچی را به خود اختصاص داده بود که این موضوع را می‌توان با تغییر در نوع حلال مرتبط دانست. زمانی که از عصارهٔ الکلی استفاده می‌شود احتمالاً مواد ضد قارچی بیشتری از گیاه اکالیپتوس قابل استحصال خواهد بود. کمترین میزان فعالیت ضد قارچی در مورد هر دو آزمون و همچنین هر دو نوع عصارهٔ آبی و الکلی مربوط به پونهٔ آبی بود و در مرتبهٔ بعد آویشن قرار گرفت.

در مورد آزمون انباری که از دو عصارهٔ رازیانه و اسطوخودوس استفاده شد، هر دو عصاره تأثیر معنی‌داری در کاهش این بیماریزا در مقایسه با شاهد داشتند و همان‌طور که انتظار می‌رفت عصارهٔ الکلی تأثیر بیشتری از عصارهٔ آبی در کنترل این بیماریزا داشت؛ که این موضوع را می‌توان با اثر قارچ‌کشی خود الکل که در اینجا به‌عنوان حلال به‌کاررفته مرتبط دانست. البته این کنترل بیشتر عصاره‌های الکلی علاوه بر اثر نوع حلال ممکن است به توانایی بیشر الکل در استخراج ترکیبات ضدقارچی مرتبط دانست.

www.SID.ir

Archive of SID

با توجه به جمیع مطالعاتی انجام‌شده (۱۹، ۲۰، ۲۱) و بررسی اجزا و ترکیبات شرکت‌کنندهٔ در عصاره‌های گیاهی، نشان داده شد که فعالیت ضدقارچی عصاره‌های گیاهی به اجزای تشکیل‌دهندهٔ آن‌ها بستگی دارد، به‌طوری‌که یک ترکیب ممکن است به‌تنهایی یا به‌صورت هم‌افزایی با سایر ترکیبات فعالیت ضدقارچی عصاره را باعث شود تا در غلظت معینی تأثیر قابل قبولی داشته باشد و از طرفی دیگر نوع عصاره و غلظت‌های مختلف آن در میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ و خاصیت قارچ‌کشی آن نقشی کلیدی دارد (۲۲).

آراس و وسایی اثر فعالیت سمی ۱۲ عصارهٔ گیاهی را در برابر قارچ‌های *پنی سیلیوم دیجیتاتوم*[1]، *پنی سیلیوم ایتالیکوم*[2] و *بوتریتس سینرآ* بررسی کردند. میوه‌های پرتقال با اسپور *پنی سیلیوم دیجیتاتوم* مایه‌زنی و با محلول ۰، ۷۵، ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر روغن آوبشن اسپری شدند. نتایج نشان داد هیچ تفاوت معنی‌داری بین این تیمار و میوه‌ها با قارچ‌کش تیابندازول با غلظت mg/l ۲۰۰۰ نداشت (۲۱).

علاوه بر اسطوخودوس، اکالیپتوس و رازیانه در این پژوهش اثر ممانعت کنندگی از رشد قارچ را نشان دادند. برگ گیاه اکالیپوس به دلیل وجود تانن که از ترکیبات پلی‌فنلی است، دارای خواص ضدمیکروبی و ضدقارچی است (۲۳). وجود اثرات ضدقارچی در عصارهٔ اکالیپتوس نیز به اثبات رسیده است (۲۴). در این مطالعه نیز عصارهٔ استخراجی از برگ اکالیپتوس دارای اثرات بازدارندگی بود، اما احتمالاً در میان این دو حلال موردمطالعه، حلال متانول توانست ترکیبات ضدقارچی بیشتری را از گیاهان موردمطالعه، استخراج کند. این نتایج با نتایج مطالعات عبدالملکی و همکاران که در سال ۱۳۹۰ انجام شد مطابقت داشت (۲۵).

در این تحقیق عصارهٔ آویشن شیرازی توانست تا حد قابل قبولی از رشد قارچ در محیط کشت جلوگیری کند. نتایج مطالعهٔ سجادی‌پورو همکاران در سال ۱۳۹۳ نشان داد که از بین نه عصارهٔ مطالعه شده بر قارچ عامل زخم توتون با عامل *ریزوکتونیا سولانی*[3] عصارهٔ نعناع گربه‌ای دارای بیشترین تأثیر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ و مریم‌گلی کمترین تأثیر را داشت. بر اساس نتایج مطالعهٔ سجادی و همکاران (۲۰۱۲) در عصارهٔ کرفس کوهی[4] ترکیباتی مانند تیمول، آنتولترانس، آنیسول نونال و کارواکرول وجود دارد. کارواکرول موجب از بین رفتن غشا سلول می‌شود؛ بنابراین احتمالاً اثر ضدمیکروبی این عصاره را می‌توان به این خصوصیت نسبت داد (۲۶).

بر اساس نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی به روش دیسک و اختلاط با محیط کشت، اثرات قابل‌قبول ممانعت کنندگی از رشد قارچ به‌وسیلهٔ عصارهٔ نعنا در سطوح بالا غلظت یعنی ۱۵۰ و µg/ml ۵۰۰ بود.

در تحقیقات متعددی فعالیت ضدقارچی عصاره‌های گیاهی که از گیاهان متعلق به جنس نعنا استخراج‌شده را نشان داده است. در تحقیقات (۲۷، ۲۸، ۲۹) مشابه با این نتایج گزارش کردند و نشان دادند که اسانس جنس بسته به نوع قارچ و غلظت عصاره می‌تواند اثرات ضدقارچی داشته باشد. در تحقیقات آن‌ها مشخص شد که اسانس نعناع اثر بازدارنده بر رشد قارچ‌های *بوتریتس سینرآ*، *آسپرژیلوس*[5] *وکاندیدا*[6] داشته است. نخعی اثر بازدارندگی اسانس و عصارهٔ اتانولی پونهٔ آبی را بر قارچ‌های *بوتریتس سینرآ*، *فوزاریوم آکسیس پوروم*[7] *ریزوکتونیا سولانی* و فیتوفتورا کپسیسی[8] بررسی کرد. غلظت‌های مختلف عصاره و اسانس پونهٔ آبی بر روی قارچ *فوزاریوم آکسیس پوروم* اثر بازدارندگی معنی‌داری نداشتند، اما همهٔ غلظت‌های اسانس و عصارهٔ این گیاه به‌طور معنی‌داری باعث بازدارندگی رشد قارچ‌های بیماریزا *ریزوکتونیا سولانی*، *بوتریتس سینرآ* و *فیتوفتورا کپسیسی* شدند و با افزایش غلظت درصد بازدارندگی نیز افزایش یافت (۳۰).

[1] *Penecillium digitatum*
[2] *P. italicum*

[3] *Rhizoctonia solani*
[4] *Kelussia odoratissima*
[5] *Aspergillus*
[6] *Candida*
[7] *Fusarium oxysporum*
[8] *Phytophthora capssici*

www.SID.ir

Archive of SID

بر اساس نتایج، تأثیر ممانعت کنندهٔ عصاره‌های آبی گیاهی در هر دو آزمون بررسی به‌روز دیسک کاغذی و همچنین روش اختلاط با محیط کشت، اسطوخودوس بیشترین اثر بازدارندگی را داشت و در مرتبهٔ دوم رازیانه قرار داشت. با توجه به اینکه در مورد عصاره‌های الکلی مرتبهٔ دوم ازنظر قدرت ممانعت کنندگی از رشد در هر دو آزمون مربوط به عصارهٔ برگی اکالیپتوس بود، می‌تواند این‌طور برداشت کرد که عصارهٔ الکلی در مورد گیاه اکالیپتوس در مقایسه با گیاه رازیانه بهتر عمل می‌کنند و قادر است که ترکیبات ضدمیکروبی بیشتری را استحصال کند.

در پایان، پیشنهاد می‌شود جهت شناخت مواد و ترکیبات مؤثر در عصاره‌های گیاهی از روش‌هایی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[1] یا گازی[2] استفاده شود، با استفاده از این روش‌ها می‌تواند به مواد مؤثر در این ترکیبات پی برد و جهت تحقیقات بعدی استفاده نمود.

منابع

1. El-Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski, M. Ultrastructural and cy tochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. Phytopathology, 1998; 88: 282-291.
2. Tripathi P, Dubay NK. Exploitation of natural products as an alternative sterategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables review. Postharvest Biology and Technology, 2004; 32: 235–245.
3. Viret O, Keller M, Jaudzems VG, Cole M. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. Phytopathology, 2004; 94(8): 850-857.
4. Gholamnejad J, Etebarian HR, Roustaee, A. Sahebani N. Biological control of apple blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection research, 2009; 49: 270-275.
5. Agrios GN. Plant disease caused by fungi: disease caused by Ascomycetes and imperfect fungi. 2005; Science, 922.
6. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D. Idaomar M. Biological effects of essential oils. A review. Food Chemistry Toxicology, 2008; 46: 446–475.
7. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. International Journal of Food Microbiology, 2004; 94: 223– 253.
8. Ellis MB, Walker JM. *Sclerotinia fuckelina* (conidial state: Botrytis cinerea). CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. 1974; No. 431, CMI, Kew, Surrey, England.
9. Alam P, Mohammad A, Ahmad MM, Khan MA, Nadeem M et al. Efficient method for Agrobacterium mediated transformation of *Artemisia annua* L. Recent Patents Biotechnology, 2014; 8: 102-107.
10. Abdul Aziz H, Omran A, Zakaria WR. H_2O_2 Oxidation of Pre-Coagulated Semi Aerobic Leachate. International Journal of Environmental Research, 2010; 4 (2), 209-216.
11. Bahraminejad S, Asenstorfer RE, Riley IT, Schultz CJ. Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots oats (*Avena sativa* L). Journal of Phytopathology, 2008; 156: 1 - 7.
12. Azimim AA, Delnavaz HB, Mansour GA. Antifungal effect of aqueous alcoholic and phenolic extracts of seed and leaves of Sorghum bicoloragainst *Fusarium solani*, *Fusarium poa* in Persian. 2006; Journal of Medicinal Plants, 6 (1): 26 - 32.
13. Meliss TGS, Sponia MS. Terezinha GFMB, Cardarelli P, Therezinha CBT. Studies on antimicrobial activity in vitro of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. Mem inst Oswaldo Cruz Rio de Janerio. 2005; 100 (7): 779 - 82.

[1] HPLC (High Efficiency Liquid Cgromotography)
[2] Gas Chromatography

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Food Protection, 2001; 64:1025-1029.
22. Chaieb K, Hajlaoui H, Zmantar T, Kahla-Nakbi AB, Rouabhia M, Mahdouani K, Bakhrouf A. The chemical composition and biological activity of clove essential oil *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. Phytotherapy Research, 21: 501-506.
23. Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbioligy Reviews, 2007; 12: 564 - 82.
24. Fiori ACG, Schwan-Estrada KRF, Stangarlin JR, Vida JB, Scapim CA, Cruz MES, Pascholati S.F. Antifungal Activity of Leaf Extracts and Essential Oils of some Medicinal Plants against Didymella bryoniae. Journal of Phytopathology, 2000; 148: 483 – 7.
25. Abdolmaleki M, Bahraminejad S, Abassi S, Mahmodi SB. Inhibitory effect of some plant extracts on mycelia growth of Rhizoctonia solani and Phytophthora drechsleri, sugar beet root rot agent. Journal of Sugar Beet. 2010; 5:193- 205...
26. Sajjadi SE, Shokoohinia Y, Moayedi N. Isolation and identification of ferulic acid from aerial parts of *kelussia odoratissima* Mozaff. Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products, 2012; 7(4): 159-62.
27. Saharkhiz MJ, Motamedi,M, Zomorodian K, Pakshir K, Miri R, and Hemyari K. Chemical composition, antifungal and antibiofilm activities of the essential oil of *Mentha piperitaL*. 2012; Int. Scho. Res. Notic. Pharm. Article ID 718645, 6 pages.
28. Samber N, Varma A, Mansoor N. Evalution of Mentha piperita essential oil and its major constituents for antifungal activity in Candidaspp. International Journal of Innovation and Research Engineering and Technology, 2014; 3: 9404 – 9411.

29. Al Yousef, SA. Antifungal activity of volatiles from lemongrass (*Cymbopogon*

14. Hadian S, Rahnama K, et al. Comparing Neem extract with chemical control *on Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* complex of tomato. Advances in Environmental Biology. 2011; 5(8):2052-2057.
15. Gholamnejad J, Etebarian HR, Roustaee A, Sahebani NA. Characterization of Biocontrol Activity of Two Yeast Strains from Iran against Blue Mould of Apple in Order to Reduce the Environmental Pollution. Journal of International Environmental Applied Science, 2009; 4(1): 28-36.
16. Batta YA. Effect of treatment with Trichoderma harzianum Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. International Journal of Food Microbiology, 2004; 96 (3): 281−288.
17. Etebarian HR, Sholberg PL, Eastwell KC, Sayler RJ. Biological control of apple blue mold with Pseudomonas fluorescens. Canadian Journal of Microbiology, 2005; 51: 591-598.
18. Wilkins KA, Bancroft J, Bosch M, Ings J, Smirnoff N, Franklin-Tong VE. Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self incompatibility response of Papaver. 2011; Plant Physiology, 156: 404–416.
19. Carson CF, Hammer KA, Riley TV. Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties, Clinical Microbiology Reviews, 2006; 19: 150-62.
20. Farzaneh M, Ahmadzadeh M, Hadian J, Tehrani AS. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soilborne phytopathogens. Communication of Agriculture Appllied Biology Science, 2010; *71*: 1327-1333.
21. Arras G, Vsai M. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *thymus capitates* oil and its effectin subatomospheric pressure condition.

www.SID.ir

Archive of SID

citrates) and Peppermint (*Mentha piperita*) oils against some respiratory pathogenic species of *Aspergillus*. International Journal of Current Microbiology, Applied Scie. 2013; 2: 261–272.

30. Nakhaei M, Moin-Vaziri V, Fata A, Haghighi A, Iranshahi M, Abadi AR, Sartavi K Jaffari MR. Effect of topical exudate and gel of *Aloe vera* in the course of leishmania major infection in susceptible Balb/C mice. The national and the second regional congress of Parasitology and parasitic diseases in Iran. Physical properties, Journal of Physics: condensed matter, 2010; 18: 35-66.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of plant extracts against apple gray mold caused by *Botrytis cinerea*

Jalal Gholamnezhad*

Assistant Professor, Faculty of agriculture and natural resources, Ardakan University

Abstract

In recent decades the use of chemical pesticides caused harm to human health and the environment. On the other hand, the wasteful use of pesticides and fungicides can cause pathogen resistance. Accordingly, the plant extracts can be used as an environmentally compatible way. In this study, it was used of water and methanol extracts of lavender, anise, eucalyptus, thyme and watermint to control gray mold disease caused by *Botrytis cinerea* of apples in the lab with mixing into medium method and disk medium, and also plant extracts was used in the store was with 4° C. Results showed water lavender extract with 500 micrograms per milliliter concentration had the best inhibition of pathogen with 22 mm diameter of pathogen colony. Also, the methanol extract of lavender with a concentration of 500 micrograms per milliliter and 31.62 mm diameter inhibition of pathogen, was the best extract. Watery and alcoholic extracts of lavender was the best extracts with 63.05 and 77.61% inhibition of the pathogen, respectively, compared to the control at a concentration of 500 micrograms per ml. Based on the results, after the lavender plant extract the fennel extract in watery extracts, and the eucalyptus extract in methanol had the best effect controllers in both tests. In store tests, watery extracts of lavender and fennel with a concentration of 6 in 1000 had the lowest diameter of spots with 8.57 and 11.72 cm compared to other treatments and control treatment. Based on the results of the laboratory and storage test, the lavender and fennel extract are introduced as natural compounds with high potential controller of *B. cinerea*.

Key words: Apple, *Botrytis cinerea*, Gray blue mold, Plant extracts.

* jgholamnezhad@ardakan.ac.ir

www.SID.ir