

اثر پنج اسانس گیاهی بر تولید زرالنون و رشد *Fusarium graminearum*

سودابه حسینیه فراهانی^۱، منصوره میرابوالفتحی^۲✉، یونس رضایی دانش^۳ و روح الله کرمی اسبو^۲

۱- گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان

۲- آزمایشگاه تحقیقات میکوتوکسین‌ها، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور؛ ۳- عضو هیئت علمی دانشگاه ارومیه

(تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۰؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۱)

چکیده

زرالنون میکوتوکسین استروژنیک غیر استروئیدی است که سبب بروز اختلال در فعالیت دستگاه تناسلی و سرطان می‌شود و مهم‌ترین گونه تولید کننده آن *Fusarium graminearum* می‌باشد. در این تحقیق اثر ضد قارچی و توکسین‌زدایی اسانس‌های آویشن (*Thymus vulgaris*)، نعناع (*Mentha sativa*)، مرزه (*Satureja hortensis*)، شوید (*Anethum graveolens*) و فلفل قرمز (*Capsicum annuum*) با غلظت‌های ۲۵-۲۵۰ $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ به محیط کشت PDA و در غلظت‌های ۱۰-۲۰۰ $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ به محیط کشت PDB افزوده شد. درصد بازدارندگی از رشد هیف جدایه‌ها بعد از هفت روز در دمای 25°C با اندازه گیری قطر رویش در محیط جامد و توزین وزن خشک توده میسلیمی در محیط مایع در مقایسه با شاهد محاسبه گردید. اثر اسانس‌های فوق با غلظت‌های ۸۰-۵۰۰۰ $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ در محیط PDB بر تولید زرالنون بررسی و میزان زرالنون تولید شده با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. بازدارندگی کامل از رشد قارچ در محیط PDB برای آویشن، نعناع، مرزه و شوید به ترتیب در غلظت‌های ۸۰، ۲۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ محیط کشت رخ داد. غلظت‌های مختلف اسانس فلفل قرمز هیچ گونه اثر بازدارندگی از رشد نداشت. تولید زرالنون به میزان ۰/۸۸، ۰/۸۷، ۰/۹۱، ۰/۸۹ و ۰/۹۳ به ترتیب در محیط حاوی اسانس‌های آویشن، نعناع، مرزه، شوید و فلفل قرمز کاهش یافت. واژه‌های کلیدی: اسانس‌های گیاهی، *Fusarium graminearum*، زرالنون.

Effect of five essential oils on zearalenon production and growth of *Fusarium graminearum*

S.H. HOSEINIYEH FARAHAHANI¹, M. MIRABOLFATHY²✉, H. REZAIIE DANESH³ and R. KARAMI OSBOO²

1-Department of Plant Pathology Islamic Azad University, Damghan Branch, Iran; 2-Mycotoxins Research Lab., Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran; 3- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Uromie University, Iran

Abstract

Zearalenone is an estrogenic mycotoxin that causes vulvovaginitis and estrogenic responses and cancer which produces by *Fusarium* species specially *Fusarium graminearum* Schwabe. The antifungal effects of *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis*, *Anethum graveolens*, *Mentha sativa* and *Capsicum annuum* essential oils were studied on the growth of *Fusarium graminearum* and zearalenone production. The essential oils were added to PDA medium at the concentrations of 25 to 250 with interval 25 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ and at the concentrations of 10 to 80 with interval 10 and 100 to 200 with interval 25 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ to PDB medium and one treatment as the control including *Fusarium graminearum* isolate without essential oil. The radial growth rate of the *Fusarium graminearum* isolate of each PDA medium treatment and the dried weight of its mycelial mass in each PDB medium were measured after incubation for seven days at 25°C . Zearalenone production of *Fusarium graminearum* isolate treated with *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis*, *Anethum graveolens*, *Mentha sativa* and *Capsicum annuum* essential oils at the concentrations of 80, 150, 200, 200 and 5000 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ PDB medium including the control treatment growing *Fusarium graminearum* without any essential oil were evaluated using HPLC. The experiments were done two times in three replicates. The most inhibitory effects of essential oils on the mycelial mass weights in PDB media were obtained at the concentrations 80, 150, 200, 200 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ of *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis*, *Anethum graveolens* and *Mentha sativa* treatments respectively which caused absolute mycelial growth inhibition of *Fusarium graminearum* in compare with the dried weight of mycelia mass of the control treatment (0.4g). *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis*, *Anethum graveolens*, *Mentha sativa* and *Capsicum annuum* at the concentrations of 80, 150, 200 and 200 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$ reduced zearalenone production 88%, 87%, 91%, 89% and 93% respectively.

Key words: Essential oils, *Fusarium graminearum*, Zearalenone

مقدمه

شده به قارچ *Fusarium graminearum* به ترتیب ۱۱۶ و ۶۵ میلی گرم بوده است (He et al., 2007).

زرننون (ZON) مایکوتوکسین استروژنیکی برخی از گونه‌های فوزاریوم به ویژه *F. graminearum* است که در ساقه، پوست و دانه غلات تولید می‌شود (Ezekiel et al., 2008). گونه‌های دیگر فوزاریوم نیز به همراه سایر مایکوتوکسین‌ها زرننون تولید می‌کنند (Paster et al., 2004). زرننون در گندم، جو، یولاف، ذرت و سایر غلات نواحی مختلف جهان و اخیراً در سویا، سورگوم، علوفه یافت شده است. این مایکوتوکسین در سیلو نیز تولید می‌شود (Regina et al., 2006). زرننون در غلظت کمتر از $10 \mu\text{g/ml}$ به صورت بازدارنده انتقال در غشای سلول گیاهی عمل می‌کند، ولی در غلظت یک صدم مولار موجب غیر قطبی شدن غشای پلاسمایی سلول‌های گندم و ذرت گردیده و سبب نشت الکترولیت‌ها از بافت ریشه می‌شود (Zinedine et al., 2007). رطوبت بالا در انبار غلات آلوده به *F. graminearum* نیز به بالا رفتن میزان زرننون و دیگر مایکوتوکسین‌ها کمک می‌کند (Mirocha and Christensen, 1974). زرننون سبب هیپر استروژنیسم در گاوها و بخصوص در هر دو جنس خوک می‌شود، دیگر عواقب آن در حیوانات به صورت کاهش میل جنسی، عقیم شدن، سقط جنین، بزرگ شدن رحم، غدد پستان، تغییر شکل تخمدان‌ها و بیضه‌ها و تغییر شکل واژن بروز کرده است. (Mirocha and Christensen, 1974). به دلیل اثرات سوء هورمونی زرننون بر سلامت انسان و حیوانات، آلودگی تولیدات گیاهی به زرننون در مقادیر بیش از 0.2 میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، غیر مجاز می‌باشد. زرننون در دماهای بالا پایدار است، حدود 60% زرننون موجود در آرد بعد از پخت نان و 80% آن در طی تولید بیسکویت در آن حفظ شده است (Rabert and Chooi, 2008).

اثر اسانس گیاهان *Ajwain* و *Myristica fragrans* به روش اختلاط با محیط کشت بر قارچ *F. graminearum* بررسی و نشان داده شده که در غلظت 6 میکرولیتر در میلی‌لیتر باعث

استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌ها و ناراحتی‌های جسمی از قدیم الایام رواج داشته است (Bazgir et al., 2008) و در دهه‌های اخیر با توجه به عوارض جانبی استفاده از داروهای شیمیایی گرایش برای مصرف گیاهان دارویی افزایش یافته است (Karaman et al., 2001). در سال 2000 حدود 60 میلیارد دلار درآمد کشورها از فروش گیاهان دارویی بوده است و 25 درصد داروهای مدرن از گیاهان دارویی ساخته شده‌اند (Tzortzakakis et al., 2007). کشور ایران با شرایط آب و هوایی متنوع جایگاه تنوع گیاهان مختلف از جمله گیاهان دارویی است. اسانس‌ها ترکیبات معطری هستند که در اندام‌های مختلف گیاهان یافت می‌شوند. آن‌ها مخلوطی از مواد مختلف با ترکیب شیمیایی متفاوت هستند که بوی بسیار قوی دارند و در دمای محیط و مجاورت هوا تبخیر می‌شوند و به همین دلیل به آن‌ها روغن‌های معطر فرار و یا اسانس‌های روغنی می‌گویند (Marin et al., 2004). این ترکیبات به طور کامل در الکل حل می‌شوند و در آب غیر قابل اختلاط هستند، وزن مخصوص اسانس‌ها از آب کمتر است و هنگام استخراج بی رنگ می‌باشند (Singha et al., 2006). اسانس‌ها علاوه بر خاصیت ضد میکروبی دارای خواص ضد انگلی، ضد تولید سم، ضد اکسایش نیز هستند که این ویژگی‌ها در ارتباط با نوع ماده موثره موجود در اسانس است (Zaringhalam et al., 2007). در بین گیاهان دارویی شناخته شده گیاهانی که ترکیبات فنلی بیشتری در اسانس آن‌ها وجود داشته باشد خاصیت ضد میکروبی قابل توجهی دارند (Antonov et al., 1998). اسانس‌ها در تهیه حشره کش‌ها و لوازم آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ultee et al., 1999).

طبق تخمینی که در دنیا زده شده است، 25% آلودگی‌های مایکوتوکسینی فراورده‌های غلات توسط گونه‌های مختلف فوزاریوم به جود می‌آیند (Atanda et al., 2007). میزان داکسی نیوالنول تولید شده در 200 گرم دانه‌های برنج و ذرت آلوده

غلظت کمتر از ۵۰۰ ppm باعث جلوگیری کامل از رشد قارچ‌ها شده است (Soliman and Badea, 2002).

اضافه نمودن اسانس آویشن در مقادیر ۶۰۰ و ۹۰۰ میکرولیتر بر لیتر در ظروف پتری حاوی محیط کشت و تماس مستقیم اسانس با کلنی قارچ *A. flavus* سبب حداکثر فعالیت ضد قارچی شده است (Thanaboripat et al., 2007). حداقل غلظت بازدارندگی آویشن بر قارچ *Aspergillus parasiticus* ۲۰۰ میکروگرم در لیتر و زیان ۳۰۰ میکروگرم در لیتر بوده است (Maskouki et al., 2005).

در تحقیق حاضر اثر پنج اسانس گیاهی که با ذائقه مردم ایران سازگار است و در سال‌های اخیر بیشترین سطح زیر کشت مزارع گیاهان دارویی را به خود اختصاص داده است بر قارچ مولد زراانون و زراانون به عنوان مایکوتوکسین مضر برای سلامت انسان بررسی شده است زیرا امکان افزودن این مواد به گندم و فرآورده‌های آن که غذای اصلی مورد مصرف مردم است فراهم می‌باشد. رشد قارچ مولد این مایکوتوکسین و تولید آن در شرایط نامناسب انبار و مراحل فرآوری پس از برداشت مانند تهیه آرد و یا فرآورده‌های دیگر گندم تا نان نیز ادامه می‌یابد و در این راستا امکان کاربرد اسانس‌ها در مراحل اخیرالذکر با افزودن به گندم و فرآورده‌های مورد مصرف انسان گام بعدی خواهد بود.

روش بررسی

۱- اسانس‌های مورد استفاده: اسانس‌های آویشن، نعناع، شوید، مرزه و فلفل قرمز از شرکت پارچ اسانس کاشان که با روش تقطیر با آب و در مقیاس صنعتی بدست آمده بودند، تهیه گردید. اسانس‌های بدست آمده در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد.

۲- جدایه‌های قارچی: جدایه‌های قارچی این تحقیق شامل جدایه‌های استاندارد *F. graminearum* بودند که از آزمایشگاه تحقیقات مایکوتوکسین‌های، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی تهیه گردید (Rezaeian et al., 2011).

جلوگیری کامل از رشد قارچ شده است (Singh et al., 2004). همچنین اثر اسانس گیاه *Foeniculum vulgare* در غلظت‌های ۶ میکرولیتر در میلی‌لیتر باعث جلوگیری کامل از رشد قارچ *F. graminearum* شده است (Singh et al., 2006)، در حالیکه اثر اسانس گیاه *Rosmarinus officinalis* L. در غلظت‌های ۴۵۰ و ۹۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر بر قارچ *F. graminearum* سبب تحریک رشد قارچ شده است (Angioni et al., 2004). اثر اسانس گیاه *Melaleuca alternifolia* روی قارچ‌های *Pyrenophora graminea*، *F. culmorum*، *F. graminearum* در غلظت‌های ۰٪، ۰.۲۵٪، ۰.۵٪، ۱٪، ۲٪ و ۵٪ بررسی و نشان داده شده است که بیشترین بازدارندگی مربوط به غلظت‌های ۰.۵٪ بوده و در این غلظت بر هر چهار قارچ به میزان یکسانی اثر بازدارندگی داشته است (Terzi et al., 2007). لاهوجی و همکاران نشان دادند که اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه سبب بازدارندگی از رشد قارچ فوزاریوم شده و دارای فعالیت قارچ ایستایی هستند، همچنین اثر اسانس آویشن بر رشد جدایه *F. graminearum*، از تأثیر جداگانه هر یک از مواد موثره آن بیشتر بوده است (Lahoji et al., 2010).

آثار بازدارندگی اسانس‌های آویشن، میخک و نعناع استرالیایی بر رشد میسلیم قارچ *Botrytis cinerea* مورد بررسی قرار گرفته و نشان داده شده است که اسانس آویشن توانسته است از رشد میسلیم قارچ جلوگیری نماید (Lee et al., 2009). بررسی آثار بازدارندگی برخی از ترکیبات گیاهی نیز بر رشد میسلومی قارچ *Penicillium expansum* نشان داده که ترکیبات مورد بررسی سبب بازدارندگی کامل از رشد قارچ نام برده گردیده اند (Neri et al., 2006). اثر بازدارندگی اسانس گیاه آویشن در غلظت ۵۰ ppm به روش اختلاط با محیط کشت روی قارچ‌های *Aspergillus fumigatus*، *Fusarium moniliform* و *A. flavus* به ترتیب ۱۰۰٪، ۹۷/۳٪ و ۹۲/۵٪ بوده است (Nguefack et al., 2004). همچنین اثر اسانس آویشن روی قارچ‌های *Aspergillus flavus*، *A. parasiticus*، *A. ochraceus* در

روز وزن خشک میسلیموم هر تیمار اندازه گیری شد. در انجام این آزمایش برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش دو بار تکرار گردید.

۳-۲- درصد بازدارندگی از رشد: درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس با بهره گیری از فرمول ارائه شده توسط پندی و همکاران (Pandey et al., 1982) محاسبه شد.

$$100 \times \% \text{GI} = (\text{dc} - \text{dt} / \text{dc})$$

Growth Inhibition=GI

باز داری از رشد (میلی‌متر)

dc = diameter control

میانگین قطر رشد قارچ در تیمار شاهد (میلی‌متر)

dt = diameter treatment

میانگین قطر رشد قارچ در تیمار مورد بررسی (میلی‌متر)

۳-۳- تعیین خاصیت قارچ ایستایی یا قارچ کشی

اسانس: برای تفکیک اثر قارچ ایستایی از قارچ کشی اسانس‌ها، از روش ارائه شده توسط تامسون (Thomson, 1989) استفاده شد. بدین منظور قطعه محیط کشت حاوی قارچ که در تیمار اسانس و یا ماده موثره هیچ گونه رشدی نداشت به محیط کشت PDA فاقد اسانس منتقل شد، در صورتیکه قطعه مذکور پس از هفت تا ده روز در محیط فاقد اسانس رشد می‌کرد این امر به عنوان ویژه گی قارچ ایستایی اسانس ارزیابی می‌گردید، همچنین حداقل غلظت بازدارندگی نیز تعیین گردید.

۴- تأثیر اسانس‌های مختلف بر تولید زرنون یا غیر

فعال سازی آن:

۴-۱- اندازه‌گیری زرنون (ZON): بدین منظور محیط

کشت مایع حاوی رشد ده روزه جدایه‌های توکسین زای *F. graminearum* تیمار شده با اسانس‌های آویشن، نعناع، شوید، مرزه و فلفل قرمز و تیمار بدون اسانس (شاهد)، به مدت سه دقیقه در مخلوط کن همراه ۷۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰٪ مخلوط شده و با عبور از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ به کمک پمپ خلأ صاف و عصاره صاف شده استخراج گردید. سپس دو میلی‌لیتر از آن با هشت میلی‌لیتر بافر فسفات (PBS) مخلوط و در نهایت ۵ میلی‌لیتر از این عصاره از ستون‌های ایمو افینیتی

۳- بررسی بازدارندگی از رشد: اثر بازدارندگی

اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید و فلفل قرمز بر رشد دو جدایه منتخب مولد زرنون *F. graminearum* ضمن اختلاط اسانس‌ها با محیط‌های کشت PDA (potato dextrose agar) و PDB (potato dextrose broth) ارزیابی شد.

۳-۱- اختلاط با محیط کشت PDA و PDB: به این

منظور ابتدا اسانس‌های فوق‌الذکر با توئین-۸۰ به نسبت حجمی ۷/۷٪ در صد مخلوط شد و بعد از اتوکلاو نمودن محیط کشت PDA، غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۱۰، ۲۳۰ و ۲۵۰ میکرولیتر از آن‌ها با ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مخلوط شد (Grover and Moore, 1962). در این بررسی از توئین-۸۰ ۷/۷٪ در صد فاقد اسانس برای تیمار شاهد استفاده گردید، اسانس‌ها با هم‌زدن در محیط کشت پخش شدند، محیط کشت حاصل در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و در حالت مایع، درون ظروف پتری (به قطر ۹ سانتی‌متر) توزیع گردید و پس از منعقد شدن دیسک‌های قارچی هفت روزه جدایه‌های ذکر شده با قطر ۵ میلی‌متر در مرکز هر یک از تشتک‌های پتری به صورت معکوس گذاشته شد. تشتک‌های پتری مایه زنی شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت هفت روز قطر رشد هر جدایه اندازه گیری شد. در انجام این آزمایش برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش دو بار تکرار گردید. برای بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌های مذکور در محیط کشت PDB در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ۳۰ میلی‌لیتر، محیط کشت PDB ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه و فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شد پس از سرد شدن محیط مقادیر ۷۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵ و ۲۰۰ میکرولیتر اسانس به آن‌ها اضافه شد و به آرامی تکان داده شد. سپس تعداد ۳ دیسک قارچی به قطر ۵ میلی‌متر از کشت هفت روزه دو جدایه فوق *F. graminearum* در هریک از فلاسک‌ها انداخته شد. فلاسک‌های مایه زنی شده در انکوباتور و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و بعد از گذشت ۱۰

تصادفی و آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی برای بررسی اثرات ساده استفاده شد و برای تجزیه واریانس و گروه بندی میانگین تیمارها از نرم افزار F-LSD، آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید (Alizadeh and Tarinejad, 2002) و نرمال بودن اعداد در برنامه مینی‌تب (Minitab 15) و آزمون Kolmogorov-Smirnov به اثبات رسید.

نتیجه و بحث

۱- تأثیر اسانس‌های مختلف بر بازدارندگی از رشد در

محیط PDA: نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمون اثر غلظت‌های متفاوت اسانس گیاهان مختلف بر بازدارندگی از رشد جدایه *F. graminearum* در محیط PDA نشان داد که اثرات نوع اسانس، غلظت اسانس و نیز اثر متقابل نوع اسانس در غلظت آن در سطح آماری ۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکرولیتر اسانس آویشن در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بر رشد جدایه *F. graminearum* در محیط جامد نشان داد، بین غلظت‌های متفاوت اسانس آویشن در سطح ۰/۹۹ تفاوت معنی‌داری وجود داشته و مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی آن نشان داد که می‌توان غلظت‌ها را در چهار گروه مختلف قرار داد. غلظت‌های ۱۰۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر، دارای ۱۰۰٪ بازدارندگی بوده و از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند و در گروه a قرار گرفتند. پس از آن غلظت‌های ۷۵، ۵۰ و ۲۵ میکرولیتر از این اسانس به ترتیب در گروه‌های مجزا (b, c, d) و با درصدهای بازدارندگی به ترتیب ۷۷/۴۱٪، ۶۷/۴۱٪ و ۵۵/۹۳٪ بودند (جدول ۱). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ در محیط جامد و برآزش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین ($R^2=96\%$) و معادله: $Y= 0.576x+38.66$ ، وجود دارد که نشان دهنده رابطه

اختصاصی زرالنون ساخت شرکت R. BiopharmRhone (Easy-extract®zearalenone) عبور داده شد، سپس ستون با شش میلی‌لیتر بافر PBS، شستشو داده شد و زرالنون چسبیده به ستون با ۱/۶ میلی‌لیتر متانول از ستون خارج، جمع آوری و ۱/۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه به لوله آزمایش اضافه شد و پس از ۳ دقیقه ورتکس به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق شد.

۲-۴- اندازه‌گیری زرالنون با دستگاه کروماتوگرافی مایع

با کارایی بالا: به این منظور از استانداردهای ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانو گرم در میلی‌لیتر زرالنون برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. استاندارد زرالنون به صورت خالص از شرکت سیگما خریداری و پنج میلی گرم استاندارد زرالنون در پنج میلی‌لیتر استونیتریل حل شد تا استاندارد ۱mg/ml بدست آمد از محلول استاندارد اخیر استاندارد با غلظت ۱۰۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر در حلال استونیتریل ساخته شد. تعیین غلظت این استاندارد توسط اسپکترومتر شرکت Perkin Elmer (UV/Vis Spectrometer Lamda 25) در طول موج ۲۷۲ nm صورت گرفت و با استفاده از این استاندارد، استانداردهایی با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر در حلال متانول ۴۰٪ ساخته شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه استاندارد به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Waters 1525)، دارای پمپ Breeze، دکتور فلورسانس، تزریق کننده خودکار ۷۱۷، ستون فاز معکوس C18 با ابعاد ۱۵۰×۴/۶ میلی متر و اندازه ذرات ۵μm ساخت کارخانه (Waters Milford, MA, USA) تزریق شد. فاز متحرک متانول ۶۰٪ و سرعت عبور آن از سیستم ۱ml/min بود. میزان زرالنون در طول موج ۲۷۲ nm، با استفاده از نرم افزار Breeze و محاسبه سطح زیر منحنی کروماتوگرام نمونه تزریق شده در مقایسه با منحنی کالیبراسیون مختص همان آزمایش محاسبه گردید و برای هر نمونه مدت زمان ۱۵ دقیقه در نظر گرفته شد (شکل ۱).

۵- تجزیه و تحلیل داده‌ها: در این تحقیق از طرح کاملاً

۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰ و ۲۲۵ میکرولیتر از اسانس نعنای که به ترتیب در گروه‌های مجزا (i,h,g,f,e,e,d,c,b) با درصد بازدارندگی به ترتیب ۲۶/۹٪، ۵۸/۲۱٪، ۱۵/۲۸٪، ۷۸/۳۷٪، ۰۷/۴۴٪، ۰۷/۴۴٪، ۹۳/۶۵٪، ۲۶/۷۹٪ و ۶۳/۸۹٪ نسبت به شاهد قرار گرفتند (جدول ۱). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس نعنای بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ در محیط جامد و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین ($R^2=0.96\%$) و معادله $Y=0.3905X-0.3727$ وجود دارد که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و میزان رشد میسلیم می باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۳۵ میلی‌متر از رشد کلنی در محیط کاسته می‌شود.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکرولیتر اسانس شوید در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بر رشد جدایه *F. graminearum* در محیط جامد نشان داده شد بین اثر غلظت‌های متفاوت اسانس شوید در سطح ۹۹٪ تفاوت معنی‌داری وجود دارد و بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در هشت گروه مختلف قرار داد. غلظت ۲۵۰ میکرولیتر بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (۱۰۰٪) و در گروه جداگانه a قرار گرفت و پس از آن غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰ و ۲۲۵ میکرولیتر از اسانس به ترتیب در گروه‌های مجزا (b, c,c,d,e, f,g,h,h) با درصد بازدارندگی به ترتیب ۸۵/۹۱٪، ۴۱/۸۷٪، ۶۳/۷۹٪، ۱۵/۸۷٪، ۴۰/۶۷٪، ۷۰/۶۳٪، ۷۰/۵۳٪، ۷۳/۵۰٪ و ۷۴/۵۰٪ نسبت به شاهد قرار گرفتند (جدول ۱). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس شوید بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ در محیط جامد و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین ($R^2=0.96\%$) و معادله: $Y= 0.3955X- 0.086$ برقرار است که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و رشد میسلیم می‌باشد. در

عکس بین افزایش غلظت و میزان رشد میسلیم می‌باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۷۹۷ میلی‌متر از رشد کلنی در محیط کاسته می‌شود.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکرولیتر اسانس مرزه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بر رشد جدایه *F. graminearum* در محیط PDA نشان داد بین غلظت‌های متفاوت آن در سطح ۹۹٪ تفاوت معنی‌داری وجود دارد و بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در هشت گروه مختلف قرار داد. غلظت‌های ۲۰۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (۱۰۰٪) و از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند. پس از آن غلظت‌های ۱۷۵، ۱۵۰، ۱۲۵، ۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ میکرولیتر از اسانس به ترتیب در گروه‌های مجزا (b,c,d,e,f,g,h) با درصد بازدارندگی به ترتیب ۹۳/۹۵، ۲۶/۸۹، ۴۱/۷۷، ۴۴/۳۰، ۴۴/۸۴، ۶۶/۶۵ و ۹۳/۴۵ قرار گرفتند (جدول ۱). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس مرزه بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ در محیط جامد و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین ($R^2=0.99\%$) و معادله: $Y= 0.3138X-0.40985$ وجود دارد که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و میزان رشد میسلیمی می‌باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۳۸ میلی‌متر از رشد کلنی در محیط کاسته می‌شود.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۲۵ تا ۲۵۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسانس نعنای بر رشد جدایه *F. graminearum* در محیط جامد نشان داد بین غلظت‌های متفاوت آن در سطح ۹۹٪ تفاوت معنی‌داری وجود دارد و بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در نه گروه مختلف قرار داد. غلظت ۲۵۰ میکرولیتر بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (۱۰۰٪) و در گروه جداگانه a قرار گرفته است، پس از آن غلظت‌های ۲۵،

بر رشد جدایه *F. graminearum* در محیط مایع نشان داد بین غلظت‌های متفاوت اسانس آویشن در سطح ۹۵٪ تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین‌های درصد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در هشت گروه مختلف قرار داد.

این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۲۷ میلی‌متر از رشد کلنی در محیط کاسته می‌شود.

۲- تأثیر اسانس‌های مختلف بر بازدارندگی از رشد در

محیط PDB: تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۱۰ تا ۸۰ میکرولیتر اسانس آویشن در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف (μl/100ml) اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع و شوید بر بازدارندگی از

رشد *F. graminearum* (%) در محیط کشت PDA و گروه‌بندی آماری آن‌ها

Table 1. The effect of different concentrations of five essential oils on inhibition growth (%) of *F. graminearum* in PDA and their statistical groups

										غلظت Concentration	اسانس essential oil																
250	225	200	175	150	125	100	75	50	25																		
										میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth	آویشن <i>Thymus vulgaris</i>																
										100	77.41	67.41	55.93	a*	b	c	d										
										میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth	مرزه <i>Satureja hortensi</i>																
										100	95.93	89.26	84.44	77.41	66.30	55.65	45.93	a	b	c	d	e	f	g	h		
										میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth	نعناع <i>Mentha sativa</i>																
100	89.63	79.26	65.93	44.07	44.07	37.78	28.15	21.58	9.26	a	b	c	d	e	e	f	g	h	i								
										میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth	شوید <i>Anethum grareolen</i>																
100	91.85	87.41	87.15	79.63	67.40	63.70	53.70	50.74	50.73	a	b	c	c	d	e	f	g	h	h								

* میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ردیف سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

The same letters in each row are not significantly different at the 0.01 probability level.

رشد میسلیم قارچ در محیط جامد و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین ($R^2=0.79\%$) و معادله $Y=0.168X-0.0025$ ، که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و میزان وزن میسلیم می‌باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۰۰۲۵ میلی گرم از وزن توده میسلیم در محیط کاسته می‌شود.

غلظت ۸۰ بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (۱۰۰٪) و پس از آن غلظت‌های ۷۰، ۶۰، ۵۰، ۴۰، ۳۰، ۲۰ و ۱۰ میکرولیتر از اسانس به ترتیب در گروه‌های مجزا b، c، d، e، f، g، h، به ترتیب با درصد بازدارندگی ۸۹/۵۲٪، ۸۴/۲۳٪، ۸۰/۹۰٪، ۷۸/۱۱٪، ۵۳/۵۹٪، ۴۵/۵۱٪ و ۹/۲۶٪ نسبت به شاهد قرار گرفتند (جدول ۲). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن بر درصد بازدارندگی از

بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین ($R^2=0.69\%$) و معادله $Y=0.162X-0.0011$ وجود دارد که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و وزن توده میسلیم می‌باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار 0.162 میلی گرم از وزن توده میسلیم در محیط کاسته می‌شود. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکرولیتر اسانس شویید بر رشد *F. graminearum* در محیط مایع نشان داد بین غلظت‌های متفاوت اسانس شویید در سطح 95% تفاوت معنی داری وجود دارد.

بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی اسانس شویید در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر بیشترین بازدارندگی را ایجاد نموده است و با سایر غلظت‌ها دارای تفاوت معنی داری بوده و با 100% بازدارندگی در گروهی مجزا قرار گرفت. کمترین میزان بازدارندگی نیز در غلظت ۵۰ بود که سبب $55/49\%$ بازدارندگی نسبت به شاهد شد. مدل رگرسیونی بدست آمده برای اسانس شویید از نوع درجه اول و خطی $Y=0.188X-0.0011$ بوده که نشان دهنده رابطه عکس افزایش غلظت و وزن توده میسلیم می‌باشد. در این مدل شیب منفی بوده و به ازای افزایش هر یک ppm بر غلظت اسانس به مقدار 0.188 میلی گرم از وزن توده میسلیم در محیط کاسته می‌شود.

نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های $500\mu\text{l}/100\text{ml}$ ، 1000 ، 2000 ، 3000 ، 4000 و 5000 اسانس فلفل قرمز بر رشد *F. graminearum* در محیط مایع نشان داد تیمارهای اسانس فلفل قرمز در غلظت‌های متفاوت هیچ گونه اثر بازدارندگی بر رشد جدایه مذکور نداشته و همه غلظت‌ها در یک گروه قرار گرفتند.

بر اساس آزمایش‌های انجام شده کمترین غلظت لازم برای بازدارندگی از رشد جدایه *F. graminearum* در محیط کشت جامد برای اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع و شویید برابر $25\mu\text{l}/100\text{ml}$ بود، در حالی که این غلظت در محیط کشت

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۵۰ تا ۱۵۰ میکرو لیتر اسانس مرزه در ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع بر رشد جدایه *F. graminearum* نشان داد بین غلظت‌های متفاوت اسانس مرزه در سطح 95% تفاوت معنی داری وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در پنج گروه مختلف قرار داد. غلظت ۱۵۰ بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (100%) و پس از آن غلظت‌های ۱۲۵، ۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ به ترتیب در گروه‌های مجزا e,d,c,b با درصد بازدارندگی $97/20\%$ ، $94/72\%$ ، $55/99\%$ و $21/86\%$ ، نسبت به شاهد قرار گرفتند (جدول ۳). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس مرزه بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ در محیط مایع و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین ($R^2=0.92\%$) و با معادله: $Y=0.239X-0.0018$ ، که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و وزن میسلیم می‌باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار 0.239 میلی گرم از وزن توده میسلیم در محیط کاسته می‌شود.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۵۰ تا ۲۰۰ میکرو لیتر اسانس نعناع در ۱۰۰ میلی لیتر محیط مایع بر رشد *F. graminearum* نشان داد بین غلظت‌های متفاوت اسانس نعناع در سطح 95% تفاوت معنی داری وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در شش گروه مختلف قرار داد. غلظت ۲۰۰ بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (100%) و پس از آن غلظت‌های ۱۷۵، ۱۵۰، ۱۲۵، ۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ به ترتیب در گروه‌های مجزا c,d b,e,e,f به ترتیب با درصد بازدارندگی $97/20\%$ ، $84/90\%$ ، $55/99\%$ ، $54/28\%$ ، $47/89\%$ و $40/95\%$ نسبت به شاهد قرار گرفتند (جدول ۳). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس نعناع بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ در محیط جامد و برازش معادله نشان داد که

ترتیب ۰/۰۰۲۵، ۰/۰۰۱۸، ۰/۰۰۱۱ و ۰/۰۰۱۱ میلی‌گرم از وزن میسلیم توده میسلیمی *F. graminearum* کاسته می‌شود. در این محیط نیز آویشن در همه غلظت‌ها بیشترین تأثیر را داشته است و پس از آن اسانس‌های مرزه، نعناع و شوید هستند.

نتایج نشان می‌دهند که اسانس‌های، آویشن با غلظت ۱۰۰ μl/100ml، مرزه با غلظت ۲۰۰ μl/100ml، نعناع و شوید با غلظت ۲۵۰ μl/100ml سبب بازدارندگی کامل از رشد *F. graminearum* در محیط PDA شدند و در محیط PDB به ترتیب با غلظت‌های ۱۵۰، ۸۰، ۲۰۰، ۲۰۰ و ۲۰۰ سبب بازدارندگی کامل از رشد *F. graminearum* شده‌اند (جدول ۵).

از مقایسه غلظت لازم برای بازدارندگی کامل از رشد هیف در دو محیط جامد و مایع به خوبی دریافت می‌شود که غلظت بازدارندگی کامل از رشد هیف در محیط مایع به مراتب کمتر از محیط جامد است که به نظر می‌رسد تماس مستقیم اسانس با هیف علت آن باشد. لاهوجی و همکاران نیز اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی را در مهار رشد جدایه‌های *Fusarium graminearum* و کاهش تولید داکسی نیوالنول بررسی نموده و نشان دادند که آویشن شیرازی در غلظت ۱۶ μl/100ml در محیط کشت جامد سبب بازدارندگی کامل از رشد جدایه مورد بررسی گردیده است (Lahoji et al., 2010). نتایج حاصل از اثر غلظت‌های ۵۰۰ تا ۵۰۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسانس فلفل قرمز (*Capsicum annuum*) محیط کشت بر بازدارندگی از رشد جدایه *F. graminearum* در هر دو محیط PDA و PDB نشان داد اسانس فلفل قرمز هیچگونه اثر بازدارندگی بر رشد جدایه *F. graminearum* نداشت.

نتایج نشان داد کلیه اسانس‌ها فعالیت قارچ ایستایی داشتند. نری و همکاران در ایتالیا در بررسی اثر کارواکرول بر *Penicillium expansum* به این نتیجه رسیدند که کارواکرول در پایین‌ترین غلظت بازدارنده خود خاصیت قارچ ایستایی داشته است (Neri et al., 2006).

Lahoji et al. (2010) نیز نشان داد که اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه با بازدارندگی از رشد قارچ فوزاریوم دارای فعالیت قارچ ایستایی می‌باشند.

مایع برای آویشن ۱۰ و برای مرزه، نعناع و شوید ۵۰ μl/100ml بود.

۲- تأثیر اسانس‌های مختلف بر کاهش تولید زرننون: در

این آزمایش غلظت بازدارندگی کامل از رشد *F. graminearum* اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید و غلظت‌های مختلف فلفل قرمز در محیط مایع استفاده شد و میزان زرننون تولید شده توسط قارچ در هر یک از تیمارها اندازه‌گیری شد. بر اساس نتایج حاصل همه اسانس‌های فوق‌الذکر سبب کاهش تولید زرننون توسط جدایه ذکر شده گردیدند. بیشترین بازدارندگی مربوط به فلفل قرمز با ۹۳٪ بازدارندگی و کمترین بازدارندگی مربوط به اسانس مرزه با ۸۷٪ کاهش تولید زرننون بود. میزان بازدارندگی از تولید زرننون توسط غلظت‌های ۸۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ μl/100ml برای اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید و فلفل قرمز به ترتیب برابر ۸۸٪، ۸۷٪، ۹۱٪، ۸۹٪ و ۹۳٪ بود (جدول ۴ و شکل ۱).

بر اساس نتایج این تحقیق بین غلظت‌های مورد استفاده هر یک از اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید و بازدارندگی از رشد میسلیم *F. graminearum* رابطه‌ای خطی وجود دارد به طوری که به ازای افزایش هر یک ppm از غلظت اسانس‌های فوق در محیط جامد به ترتیب ۰/۷۹۷، ۰/۳۸، ۰/۳۵ و ۰/۲۷ میلی‌متر از رشد هیف کاسته شده است. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود آویشن در همه غلظت‌های استفاده شده بیشترین تأثیر را داشته است، در مورد غلظت‌های ۲۵ و ۵۰ که مرزه موثرتر بوده به نظر می‌رسد با مقایسه اثر ۸ غلظت دیگر آن، علت آن عدم توزیع مناسب اسانس آویشن در غلظت پایین در محیط جامد باشد. غلظت ۲۵۰ μl/100ml همه اسانس‌ها در محیط کشت جامد باعث بازدارندگی کامل از رشد شده است (شکل ۲).

منحنی رگرسیونی اثر اسانس‌ها در محیط مایع نیز نشان داد، بین غلظت هر یک از اسانس‌های مورد استفاده و درصد بازدارندگی از رشد میسلیم *F. graminearum* در این محیط رابطه‌ای خطی وجود داشته و به ازای افزایش هر یک ppm غلظت اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید در محیط مایع به

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن بر رشد *F. graminearum* در محیط PDB

Table 2. The effect of different concentrations ($\mu\text{l}/100\text{ml}$) of *Thymus vulgaris* essential oils on inhibition growth (%) of *F. graminearum* in PDB and their statistical groups

								غلظت Concentration	اسانس essential oil
80	70	60	50	40	30	20	10		
100	89.52	84.23	80.90	78.11	53.599	45.516	9.26	میانگین بازدارندگی	آویشن
a	b	c	d	e	f	g	h	Mean of inhibition growth	<i>Thymus vulgaris</i>
								گروه‌ها	Groups

میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند

The same letters are not significantly different at the 0.01 probability level

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف اسانس‌های مرزه، نعناع و شویید بر بازدارندگی رشد

F. graminearum در محیط کشت PDB و گروه بندی آماری آن‌ها

Table 3. The effect of different concentrations of *Satureja hortensis*, *Anethum graveolens* and *Mentha sativa* essential oils on inhibition growth (%) of *F. graminearum* in PDB and their statistical groups

							غلظت Concentration	اسانس essential oil
200	175	150	125	100	75	50		
		100	97.20	94.72	55.99	21.86	میانگین بازدارندگی	مرزه
		a	b	c	d	e	Mean of inhibition growth	<i>Satureja hortensis</i>
							گروه‌ها	Groups
100	97.20	84.90	55.99	54.28	47.89	43.99	میانگین بازدارندگی	نعناع
a*	b	c	d	e	f	g	Mean of inhibition growth	<i>Mentha sativa</i>
							گروه‌ها	Groups
100	95.10	90.40	79.20	74.30	58.47	55.49	میانگین بازدارندگی	شویید
a	b	c	d	e	f	g	Mean of inhibition growth	<i>Anethum graveolens</i>
							گروه‌ها	Groups

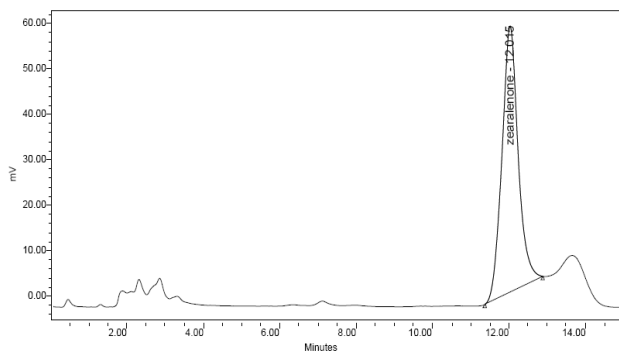
* میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند

The same letters are not significantly different at the 0.01 probability level

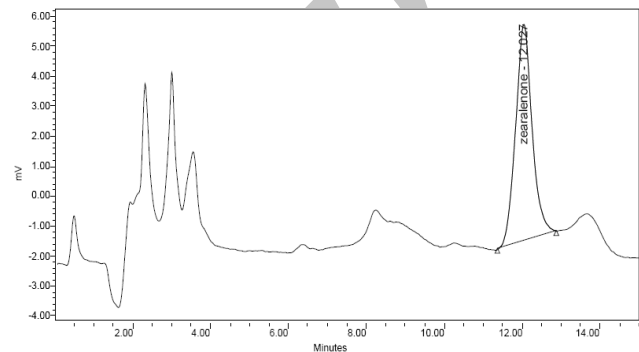
جدول ۴- میزان کاهش تولید زراننون (%) توسط اسانس‌ها

Table 4. The rate of zearalenone reduction (%) by several essential oils in PDB

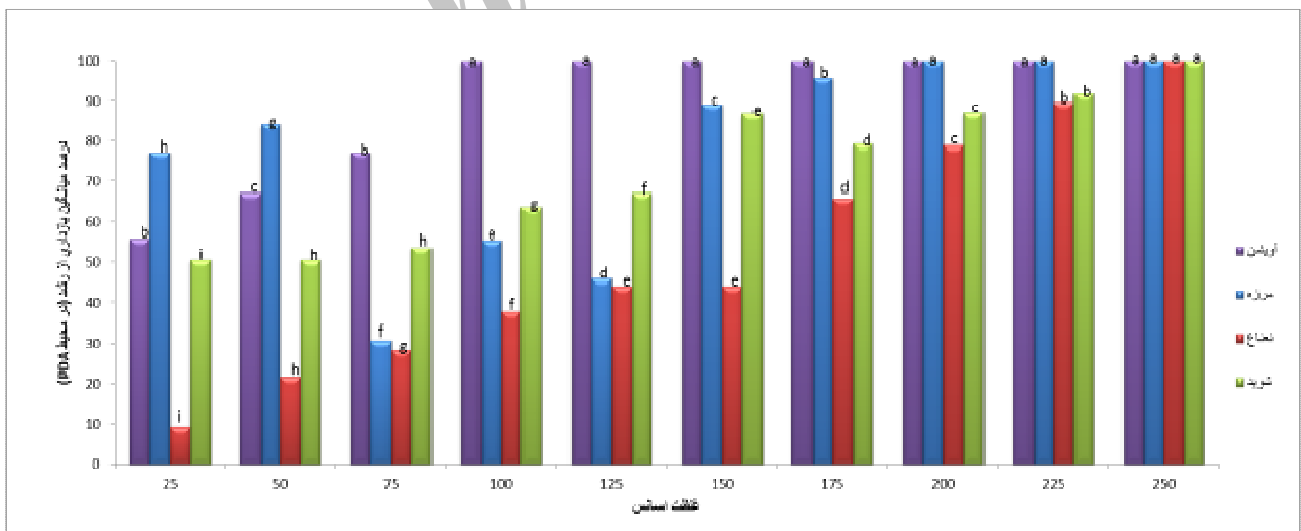
نام اسانس Essential oil	آویشن <i>Thymus vulgaris</i>	مرزه <i>Satureja hortensis</i>	نعناع <i>Mentha sativa</i>	شوید <i>Anethum grareolens</i>	فلفل قرمز <i>Capsicum annuum</i>
غلظت concentration $\mu\text{l}/100\text{ml}$	80	150	200	200	5000
درصد کاهش Reduction	88	87	91	89	93



Control

*Capsicum annuum*

شکل ۱- کروماتوگرام زراننون در تیمار آویشن و شاهد فاقد اسانس

Fig. 1. HPLC chromatograms of zearalenone in *Capsicum annuum* and control treatmentsشکل ۲- نمودار اثر غلظت‌های مختلف اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع و شوید بر بازدارندگی از رشد جدایه *F. graminearum* در محیط PDAFig. 2. The effect of *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis*, *Anethum grareolens* and *Mentha sativa*essential oils on inhibition growth of *F. graminearum* in PDA

جدول ۵- غلظت‌های (μl/100ml) بازدارندگی از رشد کامل *F. graminearum* اسانس‌های مختلف در محیط کشت PDA

Table 5. The absolute mycelial growth inhibition of *F. graminearum* by *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis*, *Anethum grareolens* and *Mentha sativa* essential oils concentrations in PDA and PDB media

شوید	نعناع	مرزه	آویشن	اسانس Essential oil	محیط کشت Culture medium
<i>Mentha sativa</i>	<i>Anethum grareolens</i>	<i>Satureja hortensis</i>	<i>Thymus vulgaris</i>		
250	250	200	100		PDA
200	200	150	80		PDB

در تحقیق حاضر ضمن مقایسه اثر اسانس‌ها با یکدیگر مشخص گردید، اسانس آویشن از اسانس‌های دیگر بهتر عمل کرده است. این مورد می‌تواند به مواد موثره آویشن مربوط باشد، همان‌طور که (Lahoji et al., 2010) نشان دادند که اثر اسانس آویشن بر رشد جدایه فوزاریوم از تأثیر جداگانه مواد موثره آن بیشتر است. غلظت‌های مختلف اسانس فلفل قرمز هیچ‌گونه اثر بازدارندگی بر رشد جدایه مذکور نداشت، اما به میزان قابل توجهی (۹۳٪) سبب کاهش تولید زرنون شد، که می‌توان علت را به نوع مواد موثره موجود در فلفل مانند کاپسایسین نسبت داد و یا به دلیل باند شدن اسانس فلفل و زرنون در فاز جداسازی و رسوب نمودن آن اشاره نمود که در این حالت اسانس سبب تخریب ساختار سم شده است. همچنین در مورد اسانس‌های آویشن و فلفل قرمز می‌توان این احتمال را داد که اسانس این گیاهان از طریق اثر بر غشای سلولی و اختلال در سنتز آنزیمی سبب اختلال در بیوسنتز سم می‌شوند. علاوه بر این اسانس‌های نام برده به علت خاصیت قارچ‌ایستایی با بازدارندگی از رشد قارچ به صورت غیر مستقیم سبب کاهش تولید زرنون شده‌اند. ترکیبات فنلی دارای خاصیت بالای ضد میکروبی هستند و در واقع ترکیبات فنلی موجود در اسانس‌های گیاهی بیشترین تأثیر را در ایجاد خاصیت ضد میکروبی دارند. این ترکیبات هم در غشاء سلول نفوذ می‌کنند و هم می‌توانند در لخته شدن محتویات سلول نقش داشته باشند در این صورت می‌توان امیدوار بود به جای استفاده از ترکیبات سنتتیک که همگی دارای اثرات سوء برای

(Ozcan and Boyraz, 2006) نیز در ترکیه نشان دادند که غلظت ۵ میکرولیتر در ۶۰ میلی‌لیتر از اسانس مرزه به میزان ۸۷٪ باعث کنترل *Botrytis cinerea* و *Alternaria mali* شده است. بررسی اثر اسانس گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis*) روی میکروارگانیزم‌های مختلف شامل باکتری‌ها، *Candida albicans* و *F. graminearum* نشان داده است که بهترین تأثیر در مورد *F. graminearum* حاصل شده است. بر اساس نتایج آزمایش‌های انجام شده میزان بازدارندگی از تولید زرنون توسط اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید و فلفل قرمز به ترتیب برای غلظت‌های ۸۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر برابر ۸۸٪، ۸۷٪، ۹۱٪، ۸۹٪ و ۹۳٪ بود (جدول ۵). (Marin et al., 2004) در بررسی اسانس گیاهان نشان دادند غلظت‌های ۵۰۰ μl/ml و ۱۰۰۰ به میزان ۲۰ تا ۸۰٪ سبب کاهش تولید داکسی نیوالنون می‌شود. ماه موند نیز در بررسی اثر بعضی از اسانس‌های حاوی ترکیبات فنلی به این نتیجه رسیدند که کاهش تولید افلاتوکسین به علت کاهش توده میسلیمی قارچ می‌باشد (Mahmound, 1994). در سال‌های اخیر گیاهان دارویی و معطر به لحاظ وجود مواد آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی مورد توجه خاص قرار گرفته‌اند، این دسته مواد بیشتر شامل ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، تریپنوئیدها، کارتنوئیدها هستند (Singha et al., 2006). معمولاً ابتدا آزمایش‌های اولیه برای سنجش وجود اثرات فوق انجام می‌شود، سپس با استفاده از دستگاه‌های GC و GC-MS اجزا موثر شناسایی می‌شوند.

مورد استفاده بسیار ناچیز بوده و مصرف آن‌ها را توجیه می‌سازد. از طرف دیگر چون زرالنون در گندم که غذای اصلی مردم است تولید می‌شود و این اسانس‌ها هم معطر هستند و ذائقه مردم ایران با آن‌ها خوب گرفته است، و به طور معمول از آن‌ها استفاده می‌شود می‌توان آن‌ها را در طبخ انواع نان و خمیرها استفاده نمود.

References

- ALIZADEH, B. and TARINEJAD, A. 2002. Usage of MSTATC in statistic analysis, Setude publication, 26p
- ANGIONI, A., A. BARRA, E. CERETI, D. BARILE, J. D. CAISSON, M. ARLORIO, S. DESSI, V. CORONEO, and P. CABRAS, 2004. Chemical composition plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Journal of the Agriculture and Food Chemistry 52:3530-3535.
- ANTONOV, A., A. STEWART and M. WALTER. 1998. Inhibition of conidium germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by natural products. Journal of Food Microbiology. 23: 13-33.
- ATANDA, O. O., A. AKPAN, F. OLUWAFEMI, 2007. The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. Journal of Food Control. 18 (2007) 601-607.
- BARRERA-NECHA, L. L, C. GARDUNO-PIZANA and L. J. GARCIA-BARREERA, 2009. In vitro antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp *gladioli* (maassey) synder ander and Hansen. Journal of Plant Pathology. 8(1): 17-21.
- BAZGIR, A., J. SHAHKARAMI and A. NAGHAVI, 2008. Investigation on growth inhibition effect of post-harvest pathogenic fungi with four plant essential oils. 18th Iranian Plant Protection congress. 322.
- BURT, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. Journal of Food Microbiology. 94:223-253.
- EZEKIEL, C. N., A. C. ODEBODE and S. O. FAPOHUNDA, 2008. Zearalenone production by naturally occurring *Fusarium* species on maize, wheat and soybeans from Nigeria. Journal of Biology and Environmental Science, 2(6), 77-82.
- GROVER, R. K. and J. D. MOORE, 1962. Toximetric studies of fungicides against brown rot organism- *Sclerotinia fructicola* and *S. laxa* . Phytopathology 52: 876-880.
- HE, J., R. YANG, T. ZHOU, R. TSAO, J. C. YONG, H. ZHU, X. Z. LI, G. J. BOLAND, 2007. Purification of deoxynivalenol from *Fusarium graminearum* rice culture and mouldy corn by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography 1151: 187-192.
- KARAMAN, S., M. DIGRAK, U. RAVID and A. ILCIM. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymus revolutus* from Turkey. Journal of Ethnopharmacology. 76: 183-186.
- LAHOJI, A., M. MIRABOLFATHI and R. KARAMI-OSBOO. 2010. Effect of *Zataria multiflora* and *Satureja hortensis* essential oils, Thymol and carvacrol on growth of *Fusarium graminearum* isolates and deoxynivalenol production. Iran J. Plant Path. Vol. 45: 60-65
- LEE, Y. S., J. KIM, S. G. LEE, E. OH, S. C. SHIN and K. PARK, 2009. Effects of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi. Journal of Pesticide Biochemistry and Physiology 93:138-143.
- MARIN, S., A. VELLUTI, A. J. RAMOS and V. SANCHIS, 2004. Effect of essential oils on zearalenone and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain. Journal of Food Microbiology. 21: 313-318
- MASKOUKI, M., S. A. MORTAZAVI and S. RAD, 2005. Control of *Aspergillus parasiticus* growth by essential oils in synthetic media. Journal Agric Science

- Natural Resource, vol. (11) 3: 61-69.
- MIROCHA, C. J. and C. M. CHRISTENSEN, 1974. Oestrogenic mycotoxins synthesized by *Fusarium*. Mycotoxins, edited by I. F. H. Purchase (Amsterdam: Elsevier), pp. 129-148.
- NERI, F., M. MARI and S. BRIGATI, 2006. Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. Plant Pathology, 55: 100-105.
- NGUEFACK, J., V. LETH, P. H. AMVAMZOLLO and S. B. MATHUR, 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. Journal of Food Microbiology. 94:329-334.
- OZCAN, M. and BOYRAZ, N. 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. Intl. J. Food Microbiol. 107: 238-242
- PANDEY, D. K., N. N. TRIPATHI, R. D. TRIPATHI and S. N. DIXIT, 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *H. suaveolens*. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten and Pflanzenschutz 89: 344-349.
- PASTER, N., J. YONASSI, R. B. GOLAN and M. MENASHEROV, 2004. Production of zearalenone in vitro and in corn grains stored under modified atmospheres. Journal of Food Microbiology. 12: 157-165.
- RABERT, M. and F. CHOOI, 2008. Analysis of the *Fusarium* toxins Deoxynivalenol and Zearalenone in Austrian feeds of the crop years 2002 and 2003. Journal of Food Mycotoxins. 21: 29-31.
- REGINA, M., F. GERALDO, D. J. TESSMANN, C. KEMMELMEIER, 2006. Production of mycotoxins by *Fusarium graminearum* isolated from small cereals (wheat, Triticale and barley) affected with scab disease in Southern BRAZIL. Journal of Microbiology. 37:58-63.
- REZAEIAN DOLOEI, R., S. REZAEI, M. MIR-ABOLFATHY, H. ZAMANIZADEH and M. RAZAVI, 2011. Molecular identification and detection of gene encoding deoxynivalenol in *Fusarium graminearum* isolates, the causal agent of *Fusarium* head blight of wheat in Iran. Modern Science of Sustainable Agricultural Journal. Vol. 7: 19- 26.
- SINGHA, G., S. MAURYA, C. CATALAN and M. P. DELAMPASONA, 2004. chemical constituents, antifungal and antioxidative effects of Ajwain essential oil and its acetone extract. Journal of Agriculture and Food Chemistry 52(11):3292-3296.
- SINGHA, G., S. MAURYA, M. P. DE LAMPASONA and C. CATALAN, 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and it is acetone extract. Food Control. 17:745-752.
- SOLIMAN, K. M. and R. I. BADEA, 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food Chemistry and Toxicology, 40: 1669-1675.
- TERZI, V., C. MORCIA, P. FACCIOLI, G. VALE, G. TACCONI, and M. MALNATI, 2007. In vitro antifungal activity of the tea tree essential oil and its major components against plant pathogens. Letters in Applied Microbiology, 44:613-618.
- THAMSON, D. P. 1989. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. Mycologia. 81(1):151-153.
- THANABORIPAT, D., Y. SUVATHI, P. SRILOHASIN, S. SRIPAKDEE, O. PATTHANAWANITCHAI and S. CHAROENSETTASILP, 2007. Inhibitory effect of essential oils on growth of *Aspergillus flavus*. KMITL Science Technology Journal 7: 1-5.
- TZPRTZAKIS, N. G. and C. D. ECONOMAKISC, 2007. Antifungal activity of lemongrass essential oils against key postharvest pathogens. Food Science. (8): 253-258.
- ULTEE, A., T. P. W. KETS and E. J. SMID, 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology. 65: 4606-4610.
- ZARINGHALAM, M. and M. SATARI, 2007. Effect of pepper and *Zataria multiflora* essential oils on frenum of DNase enzyme *stafilococos oreuos*. Journal of Iranian Pharmaceutical Plants. 6(24): 33.
- ZINEDINE, A., J. MIGUEL SORIANO, J. C. MOLTO and J. MANES, 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. Journal of Food and Chemical Toxicology. 45: 1-18.