

بررسی اثر ضدقارچی اسانس چند گیاه دارویی در کنترل قارچ *Rhizopus stolonifer* عامل پوسیدگی نرم روی میوه توت‌فرنگی

مریم بهداد^{۱*}، نعمت‌الله اعتمادی^۲، ابراهیم بهداد^۳ و حسین زینلی^۴

*- نویسنده مسئول، دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، اصفهان

پست الکترونیک: Mary_behdad@yahoo.com

۲- دانشیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان

۳- استاد، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، اصفهان

۴- استادیار، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان اصفهان

تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۰

تاریخ اصلاح نهایی: مهر ۱۳۹۰

تاریخ دریافت: اسفند ۱۳۸۹

چکیده

برای کنترل آلودگی‌های قارچی محصولات باغبانی گاهی از محلول‌های قارچ‌کش استفاده می‌شود که برای سلامت انسان مضر هستند. هدف از این تحقیق بررسی اسانس‌های ضدقارچی چند گیاه دارویی در کنترل این قارچ‌ها و جایگزین کردن آنها به جای قارچ‌کش‌های شیمیایی بود. مهمترین قارچ بیماری‌زا در دوره پس از برداشت توت‌فرنگی، *Rhizopus stolonifer* است که برای کنترل آن، اثر ضدقارچی اسانس‌های مرزه (*Satureja hortensis*)، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و زنیان (*Carum copticum*) مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش به دو صورت *in vitro* و *in vivo* انجام شد. اسانس‌ها با غلظت‌های ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ پی‌پی‌ام در محیط کشت PDA و روی میوه‌های توت‌فرنگی برداشت شده علیه قارچ *Rhizopus* انجام شد. آزمایش *in vivo* شامل ۶ تیمار (۳ اسانس، ۱ قارچ‌کش و ۲ شاهد) و هر تیمار شامل سه تکرار و هر تکرار شامل ۵ عدد میوه (حدود ۷۰ گرم) بود. میوه‌ها را پس از ضدعفونی سطحی در سوسپانسیون 10^6 (اسپور در میلی‌لیتر) *Rhizopus* به‌طور جداگانه فرو برده و بعد در سوسپانسیون ۳ اسانس ذکر شده و قارچ‌کش ایپرودیون + کاربندازیم ۵۲/۵٪ (پودر و تابل) فرو برده شد و در شرایط حرارت اتاق حدود 1 ± 24 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. نتایج آزمایش روی آگار نشان داد که غلظت مهارکننده رشد میسلیم قارچ ریزوپوس برای مرزه و زنیان ۳۰۰ پی‌پی‌ام و برای آویشن شیرازی ۵۰۰ پی‌پی‌ام بود. همچنین نتایج آزمایش در شرایط *in vivo* نشان داد که بیشترین میزان آلودگی به ترتیب در اسانس شاهد، سپس زنیان، آویشن شیرازی و مرزه بود.

واژه‌های کلیدی: توت‌فرنگی، پوسیدگی نرم، اسانس، مرزه، آویشن شیرازی، زنیان، *Rhizopus stolonifer*

مقدمه

ارگانیک که در طول مراحل مختلف تولید آنها از هیچ‌گونه سموم و مواد شیمیایی استفاده نشده باشد رو به افزایش است. از آن گذشته بعضی از کشورهای واردکننده

امروزه نیاز و تقاضای مصرف‌کنندگان در داخل کشور و همچنین تقاضای کشورهای واردکننده به میوه‌های

محصولات کشاورزی به شرط اعمال تیمارهای غیرشیمیایی و مشروط به نداشتن باقی مانده سموم اجازه ورود محصولات را به کشور خود داده و قوانین قرنطینه‌ای سختی را برای ورود محصولات کشاورزی به اجرا گذاشته اند (شاه‌بیگ، ۱۳۸۱). امروزه تمایل جهانی برای یافتن روشهای جایگزین در کنترل ضایعات بعد از برداشت، با اولویت قرار دادن روشهای سالم و جلوگیری از تأثیرات منفی و اثرهای جانبی سموم در سلامتی انسان و نیز وجود مقاومت به قارچ کش ها امکان استفاده از مواد شیمیایی را کاهش داده است (هاشمی و همکاران، ۱۳۸۷).
توت‌فرنگی از جمله میوه‌های دانه‌ریز و از خانواده گل‌سرخیان (Rosaceae) می باشد که از تلاقی گونه *Fragaria virginiana* Duch. با گونه *F. chilonensis* L. Duch بدست آمده است (بهنامیان و مسیحا، ۱۳۸۱). سطح زیر کشت این محصول در ایران ۳۸۰۰ هکتار است که در بین کشورهای جهان مقام چهاردهم را دارد. همچنین میزان تولید توت‌فرنگی ایران حدود ۳۸۵۰۰ تن بوده که مقام هجدهم را در بین کشورهای جهان به خود اختصاص داده است.

توت‌فرنگی به دلیل تنفس بالا، مقدار آب زیاد، فعالیت متابولیکی بالا و حساسیت به پوسیدگی‌های میکروبی و قارچی یکی از میوه‌های بسیار فسادپذیر بوده و در مقابل صدمات مکانیکی و تغییرات فیزیولوژیکی در محل تولید و همچنین محصول آن پس از برداشت و در زمان حمل و نقل و حتی در مراکز توزیع و فروش همواره در معرض آلودگی به انواع قارچ‌ها می‌باشد (بهنامیان و مسیحا، ۱۳۸۱).
بیماری پوسیدگی نرم (Soft rot) توت‌فرنگی که در اثر قارچ *Rhizopus stolonifer* ایجاد می‌شود علاوه بر توت‌فرنگی در میوه‌جات و سبزیجات اتفاق می‌افتد و

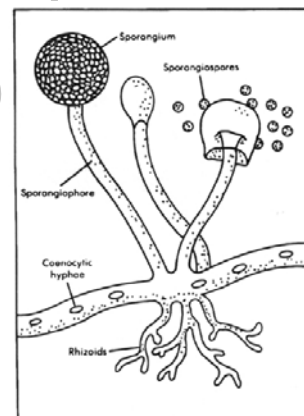
خسارت‌های آن بعد از برداشت و خصوصاً در دوران نگهداری در انبار، در حمل و نقل و بازرسانی اهمیت دارد. علائم این بیماری عبارت است از اینکه ابتدا محل عفونی میوه‌ها کم‌رنگ می‌شود، پس از آن میوه‌های مبتلا، به رنگ قهوه‌ای درمی‌آیند، سپس به سرعت میوه‌ها نرم و لهیده شده، شیرابه‌ای از آنها خارج می‌شود (شکل ۱). کلونی این قارچ روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار در آغاز سفیدرنگ و و پشمکی است و بعداً به رنگ قهوه‌ای متمایل به تیره درمی‌آید. از محل تشکیل ریزوئیدها، معمولاً ۳ تا ۵ اسپورانژیوفور افراشته به صورت دسته‌ای خارج می‌شوند که انتهای هر کدام به اسپورانژ نیم‌کروی ختم می‌شود (شکل ۲) (اشکان و قنواتی، ۱۳۸۵). اصغری مرجانلو و همکاران (۱۳۸۷) اثر ضدقارچی ریحان (*Ocimum basilicum*) را روی کپک خاکستری توت‌فرنگی که عامل آن قارچ *Botrytis cinerea* می‌باشد در آزمایشگاه بررسی کرده و نتیجه گرفتند که اسانس ریحان به دلیل داشتن خاصیت قارچ‌کشی بالا می‌تواند جایگزین قارچ‌کش‌های مصنوعی در کنترل بیماریهای قارچی روی محصولات کشاورزی شود.

مستوفی و همکاران (۱۳۸۶) اثر قارچ‌کشی اسانس‌های ریحان و مریم‌گلی را روی قارچ *Botrytis cinerea* در آزمایشگاه بررسی نمودند. عبدالهی و همکاران (۱۳۸۶) نتیجه گرفتند که آلودگی‌های قارچی بعد از برداشت میوه و سبزی به‌ویژه توسط قارچ *Penicillium digitatum* زیاد و خسارت آن بالا می‌باشد. برای مبارزه با این قارچ اثر بازدارندگی چند اسانس گیاهی شامل زیره سیاه (*Carum carvi*) زنیان (*Carum copticum*) و رازیانه (*Foeniculum vulgare*) در شرایط سردخانه روی محصول گوجه‌فرنگی مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج نشان داد که اسانس زیره سیاه در غلظت‌های بیشتر از

۱۰۰ پی پی ام اثر قابل توجهی در بازداری از رشد قارچ *Botrytis cinerea* دارد.



شکل ۱- علائم آلودگی پوسیدگی نرم روی میوه توت فرنگی



شکل ۲- اندام تولیدمثل قارچ *Rhizopus*

و سبزی‌های برداشت شده بدون کمترین بقایای شیمیایی، این تحقیق برای دستیابی به اهداف و موضوعات زیر انجام گردید:

ارائه یک راه کار مناسب برای نگه داری محصولات در سطح تجاری به منظور افزایش میزان صادرات محصولات عاری از مواد شیمیایی مضر، کاهش ضایعات میوه‌های توت فرنگی در سردخانه و عرضه میوه با کیفیت بیشتر و ارزان تر به بازار، تلاش در جهت نیل به اهداف کشاورزی پایدار از طریق جایگزین نمودن فرآورده‌های طبیعی به جای سموم شیمیایی، کاهش مصرف قارچ کش‌های شیمیایی و تأمین سلامت مصرف کنندگان و محیط زیست، صرفه جویی ارزی از بابت خرید و واردات سموم شیمیایی و قارچ کش‌ها و ایجاد اشتغال از طریق کشت و اسانس گیری از گیاهان دارویی انتخاب شده برای این منظور.

در این تحقیق سعی شده است که تأثیر اسانس‌های گیاهان دارویی مرزه، آویشن شیرازی و زنیان بر کنترل قارچ‌های انباری میوه توت فرنگی در شرایط نگه داری میوه پس از برداشت بررسی گردد تا در صورت حصول نتایج مطلوب، بتوان از آنها به عنوان یکی از جایگزین‌های قارچ کش‌های شیمیایی در کاهش ضایعات پس از برداشت میوه توت فرنگی استفاده نمود.

مواد و روشها

در این تحقیق اثر سه اسانس گیاهی، شامل اسانس‌های مرزه، آویشن شیرازی و زنیان در غلظت‌های مختلف و به صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه کامل تصادفی در دو شرایط آزمایشگاهی روی محیط کشت PDA و در آزمایش دوم روی میوه‌های توت فرنگی علیه قارچ

برای پیشگیری از خسارت این قارچ از محلول‌های قارچ کش استفاده می شود که برای سلامت انسان بسیار مضر بوده و باقی مانده این سموم در بدن انسان ایجاد بیماریهای خطرناکی می کند که در جامعه بشری امروزه به فراوانی دیده می شود. در کشور ایران منابع غنی از گونه‌های گیاهی یافت شده که هر کدام دارای هزاران خاصیت دارویی است (بهنامیان و مسیحا، ۱۳۸۱). با توجه به اهمیت جهانی موضوع نگهداری و حمل و نقل میوه‌ها

کروماتوگرافی (GC) و دستگاه گاز کروماتوگرافی همراه با طیفسنجی جرمی (GC/MC) آنالیز و ترکیب‌های اصلی موجود در آنها شناسایی گردید.

تهیه محیط کشت مصنوعی PDA

در هر ارلن کوچک استریل مقدار ۱۰۰ سی سی محیط کشت مایع (برای چهار تشتک پتری و هر تشتک نیز به عنوان یک تکرار) ریخته شد. بعد از اینکه محیط کشت مایع به دمای حدود ۴۵-۴۰ درجه سانتی گراد رسید، اسانس مربوطه با غلظت ۲۰۰، ۳۰۰، ۵۰۰ پی پی ام به آن اضافه گردید، سپس برای ایجاد محیط کشت یکنواخت، محیط PDA با اسانس به شدت به هم زده شد (اصغری مرجانلو و همکاران، ۱۳۸۷). مایه اولیه را به وسیله چوب‌پنبه سوراخ‌کن (cork borer) به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیه کلنی قارچ روی محیط کشت بریده و قطعه مربوطه از طرفی که آغشته به کلونی قارچ است برای تماس بهتر روی آگار قرار داده شد. چون اسانس‌ها روغنی و در آب حل نمی‌شود، در تمام آزمایشها از حلال استون استفاده شد.

روش آزمایش

برای اطمینان از اثربخشی اسانس‌ها ابتدا غلظت‌های ۱۰۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰ پی پی ام مورد آزمایش قرار گرفت. با توجه به نتایج آزمایش مقدماتی، آزمایش بعدی در غلظت‌های ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام برای تعیین حد آستانه حداقل مهار رشد قارچ انجام شد. هر اسانس با غلظت مشخص خود به عنوان یک تیمار در چهار تکرار (هر تکرار شامل یک تشتک پتری) و تیمار شاهد برای مقایسه وضع رشد قارچ در نظر گرفته شد. در تیمارهای شاهد نیز فقط استون به محیط کشت

Rhizopus stolonifer مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات جمع‌آوری شده نیز بوسیله نرم‌افزار Excel منتقل شد و بعد با استفاده از نرم‌افزار SAS و Mstatc اطلاعات جمع‌آوری شده تجزیه و تحلیل گردید و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد.

کشت قارچ

ابتدا قارچ ریزوپوس از روی میوه‌های توت‌فرنگی مبتلا به پوسیدگی نرم در آزمایشگاه جداسازی و روی محیط کشت PDA کشت داده شد؛ سپس روش خالص‌سازی به این صورت بود که ابتدا میوه توت‌فرنگی در شرایط مساعد آلودگی قرار گرفت و پس از آن قارچ ریزوپوس همراه با گوشت میوه آلوده شده توسط اسکالیل جدا و روی محیط کشت PDA کشت داده شد، پس از آن برای بدست آوردن کلونی قارچ جوان‌تر چند بار از پتری‌دیش اولیه توسط چوب‌پنبه سوراخ‌کن (cork borer) نمونه‌برداری و درون محیط کشت جدید کشت داده شد.

اسانس‌ها

اسانس‌های مورد آزمایش شامل اسانس گیاه مرزه (*Satureja hortensis*)، اسانس گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و زنیان (*Carum copticom*) بوده که از کارخانه باریج اسانس کاشان واقع در مشهد اردهاال تهیه شد. گیاهان مذکور در اراضی تحقیقاتی همان محل کشت و تولید شده و در ماه‌های خرداد و تیر برداشت انجام شده بود. همچنین در آویشن شیرازی و مرزه از برگ‌ها و سرشاخه‌ها و زنیان از میوه اسانس‌گیری انجام شد. ضمناً در همین کارخانه ترکیب‌های اسانس‌های مزبور توسط دستگاه گاز

انکوباتور در دمای 1 ± 25 سانتی گراد گذاشته شد. پس از اینکه رشد قارچ در تیمار شاهد به ۹۰ میلی متر رسید (پر کردن سطح پتری دیش) آزمایش متوقف گردید.

تهیه میوه توت فرنگی

توت فرنگی رقم سلوا از گلخانه غیور واقع در فولادشهر اصفهان به مقدار ۵ کیلوگرم دست چین و تهیه گردید. میوه‌های توت فرنگی انتخابی حدود ۸۰-۷۵ درصد رسیده، قرمز رنگ، به طول حدود ۴-۵ سانتی متر و قطر میوه در قسمت بالا قطورتر و حدود ۳/۵ سانتی متر بود. میوه‌ها از نظر شکل، اندازه و رنگ تقریباً یکسان و عاری از آفات، بیماریها و صدمات ظاهری بودند. هر پنج عدد میوه (Lee et al., 2007) که حدود ۷۰ گرم بود به عنوان یک تکرار در یک ظرف پلاستیکی شفاف به ابعاد $14 \times 11 \times 4$ سانتی متر قرار داده شد (اصغری مرجانلو و همکاران، ۱۳۸۷؛ Reddy et al., 2000).

اسانس‌ها

اسانس‌های مرزه، آویشن شیرازی و زنیان و در این مرحله همراه با قارچ کش سیستمیک Iprodione + Carbendazime 52.5% که اغلب برای ضد عفونی بذرها علیه بیماریهای قارچی به نسبت یک در هزار بکار می‌رود و روی ریزوپوس نیز کاملاً مؤثر است استفاده شد.

قارچ

قارچ *Rhizopus* نیز مانند آزمایش اول تهیه و در تشتک‌های پتری از هر کدام حدود ۲۰ عدد تشتک پتری آماده شد تا در موقع لازم برای تهیه سوسپانسیون اسپور و برای آلوده سازی میوه‌های توت فرنگی مورد استفاده قرار گیرد.

اضافه گردید. دلیل استفاده از حلال به این خاطر بود که اسانس‌ها به دلیل چرب بودن تنها در استون حل می شدند، به این علت ما به نمونه شاهد هم به دلیل اینکه با بقیه نمونه‌ها یکسان شود استون اضافه کردیم تا در آزمایشها خطا ایجاد نشود. البته از بین حلال‌ها با توجه به آزمایشهایی که انجام شد استون انتخاب شد، چون هیچ تأثیری بر رشد قارچ نداشت. پس از کشت قارچ روی PDA کلیه تشتک‌ها در داخل انکوباتور و در حرارت $1 \pm 25^{\circ}\text{C}$ قرار داده شد. قطر کلونی قارچ روی آگار بر حسب میلی متر بدون برداشتن درپوش تشتک آن به صورت روزانه و در ساعات معین توسط خط کش نازک از طرف کف تشتک اندازه گیری شد (قطر کلونی قارچ برابر ۵ میلی متر قطر مایه اولیه که توسط چوب پنبه سوراخ کن روی محیط کشت قرار داده شده، به اضافه دو شعاع که هر شعاع نیز رشد روزانه میسلیم قارچ می‌باشد، بود). محیط کشت مزبور را در داخل چهار تشتک پتری و هر کدام حدود ۲۵ میلی لیتر ریخته و پس از سرد شدن کامل آماده مایه زنی قارچ گردید. همان طوری که قبلاً هم اشاره شد به تیمار شاهد نیز فقط حلال استون با غلظت مربوطه اضافه شد. تشتک‌های پتری پس از دو ساعت و سرد شدن کامل محیط کشت مورد مایه زنی قارچ قرار گرفتند. مایه قارچ را توسط چوب پنبه سوراخ کن (به قطر ۵ میلی متر) از حاشیه کلونی قارچ (که جوان تر و حدود ۲۴ ساعت عمر داشت) بریده و با اسکالپل استریل برداشت و از پشت در وسط تشتک قرار داده، به طوری که میسلیم‌ها کاملاً با محیط کشت تماس حاصل نماید. تشتکها رونویسی و هر چهار عدد که به منزله یک تیمار بود، داخل یک پاکت فریزری قرار گرفت و در داخل

در داخل هود قرار داده شد تا اسپورها روی میوه مستقر گردند. سپس میوه های مزبور در سوسپانسیون اسانس ها مطابق تیمارهای مربوطه فرو برده شد و بلافاصله در هر ظرف تعداد ۵ عدد میوه قرار داده شد و در حرارت اتاق که حدود 21 ± 24 درجه سانتی گراد بود نگهداری گردید. پس از سه روز آماربرداری و وضعیت آلودگی میوه ها را تعیین و در جدولهای مربوطه ثبت گردید. آلودگی هر میوه بر اساس میزان لهدگی و پوسیدگی سطح میوه و تشکیل قارچ روی آن بوده است، بدین ترتیب که میوه های کاملاً آلوده نمره ۱۰۰ و میوه های سالم نمره صفر داده شدند (Reddy et al., 2000).

نتایج

در این آزمایش نتیجه تیمارهای اثر اسانس ها روی قارچ ریزوپوس خوب نبود و قارچ به شدت رشد کرد و تمام میوه ها و ظرف را مملو از میسلیم و اسپورانژها نمود. بدین جهت با افزایش غلظت هر سه اسانس و قارچ کش به حد ۱۰۰۰ پی پی ام آزمایش تکرار گردید و در این مرحله نتیجه بخش بود.

چون احتمال می رفت که علت بی اثر بودن اسانس های مرزه و زنیان (در غلظت ۳۰۰ پی پی ام) و آویشن شیرازی در غلظت ۵۰۰ پی پی ام مربوط به طولانی بودن زمان بین اسپورزنی و اسانس زنی باشد. بدین جهت زمان ۶۰ دقیقه آزمایش قبلی کاهش داده شد و دو تیمار ۱۵ دقیقه و ۳۰ دقیقه انتخاب و آزمایش با غلظت های بالا انجام شد و در اینجا باز هم میوه ها بشدت آلوده گردید و در واقع این تغییر زمان تأثیری در میزان آلودگی نداشت.

نتایج (شکل ۳، جدول ۱) نشان داد که بیشترین رشد قارچ کلونی قارچ روی PDA مربوط به شاهد و کمترین آن

برای تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ به نسبت 10^6 اسپور در میلی لیتر (اصغری مرجانلو و همکاران، ۱۳۸۷)، ابتدا در سطح تشتک های محتوی قارچ با عمر ۲۰ روز، ده میلی لیتر آب مقطر سترون سازی شده ریخته و پس از خیس خوردن آن توسط پیپت پاستوری که سر آن روی شعله خم شده و به حالت پارو در آمده بود، سطح محیط تراش داده شد تا اسپورها آزاد و جمع آوری گردند. با استفاده از لام گلبول شمار (Hemocytometer) یک محلول سوسپانسیون 10^6 اسپور در میلی لیتر در یک بشر به مقدار ۲۰۰ میلی لیتر، جهت فرو بردن میوه های توت فرنگی و آلوده کردن آنها تهیه گردید.

روش آزمایش

در این آزمایش با احتساب شاهد (آغشته به قارچ و بدون اسانس) پنج تیمار به شرح زیر منظور شد که هر تیمار نیز دارای سه تکرار (سه ظرف) که در داخل هر ظرف نیز ۵ عدد میوه قرار داده شده بود.

تیمارها شامل چهار تیمار اسانس مرزه، آویشن شیرازی، زنیان و قارچ کش کاربندارزیم بودند. آویشن شیرازی با غلظت ۵۰۰ پی پی ام و بقیه اسانس ها هر کدام به غلظت ۳۰۰ پی پی ام و شاهد (آغشته به قارچ و بدون اسانس) بکار برده شد.

روش تیمار میوه ها با اسانس ها و قارچ کش

ابتدا میوه های تمام تیمارها به طور انفرادی با محلول ۲/۵٪ هیپوکلریت سدیم ضد عفونی سطحی گردید و پس از آن در آب مقطر استریل شستشو داده شد، سپس برای آلوده کردن در سوسپانسیون اسپور قارچ فرو برده شد، با خارج نمودن آنها به مدت یک ساعت روی فویل استریل

PDA علیه قارچ ریزوپوس مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج این آزمایش چنین نشان داد.

اسانس‌های زنیان و مرزه با غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام کاملاً از رشد قارچ جلوگیری نمود ولی در مورد آویشن شیرازی با غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام قارچ تا حدودی رشد کرد ولی در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام رشد مزبور کاملاً مهار گردید. ضمناً در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس زنیان کمی بهتر از اسانس مرزه روی رشد قارچ تأثیر داشت. بنابراین در این آزمایش اصلی برای زنیان و مرزه غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام و برای آویشن شیرازی غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام آستانه مهار (Critical growth inhibitory) و کنترل مطلق رشد قارچ تعیین گردید.

نتایج آزمایشها روی میوه توت‌فرنگی

آمارگیری و تعیین درصد آلودگی میوه‌ها سه روز بعد از شروع آزمایش انجام شد. روش کار مشاهده‌ای و براساس درصد آلودگی سطح میوه و بروز قارچ روی میوه‌ها بوده است. بدین ترتیب که میوه‌های غیرآلوده و بدون قارچ نمره صفر و چنانچه تمام میوه را آلوده و توسط قارچ فرا گرفته بود نمره صد داده شد.

در تیمارهای مربوط به مایه‌زنی *Rhizopus* تأثیر اسانس‌ها و قارچ‌کش، بیشتر میوه‌ها مبتلا و آلوده به قارچ ریزوپوس شده و اسپورانژیوم‌های آن تا پشت در ظرف رشد کرده بود. بدین ترتیب اسانس‌ها با غلظت بکار برده شده مؤثر واقع نشده بود و فقط در مورد قارچ‌کش کاربندازیم با غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام حدود نصف میوه‌ها سالم باقی ماندند. با توجه به این که نتایج یک آزمایش تکمیلی در مورد مدت زمان بین اسپورزنی تا اسانس‌زنی که ابتدا ۶۰ دقیقه بود با ۱۵ و ۳۰ دقیقه انجام شد که نتایج

مربوط به اسانس زنیان بوده است و نتایج از نظر آماری دارای تفاوت معنی‌دار می‌باشند.

نتایج (جدول ۲) نشان داد که بیشترین میانگین رشد قارچ مربوط به شاهد و کمترین آن در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام اسانس‌های مختلف بوده است، همچنین در غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌ام اسانس اختلاف معنی‌دار مشاهده شد. نتایج مقایسه میانگین اثرهای اسانس‌های مختلف و غلظت آنها روی قارچ *Rhizopus* (جدول ۳) نشان داد که اسانس زنیان در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب با میانگین رشد قطر کلنی ۲۵/۷۵ میلی‌متر و اسانس مرزه با میانگین ۸۵/۲۵ میلی‌متر و آویشن شیرازی با میانگین رشد ۰۰/۸۵ میلی‌متر جلو رشد قارچ را گرفت و هر سه اسانس با غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام به طور کامل جلو رشد قارچ را گرفتند ولی با غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام اسانس مرزه و زنیان به طور کامل جلو رشد قارچ گرفته شد.

نتایج آزمایشها روی محیط PDA

نتایج آزمایش مقدماتی شامل غلظت‌های ۱۰۰۰۰، ۲۰۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام از هر سه اسانس روی PDA علیه قارچ ریزوپوس نشان داد که در غلظت‌های ۱۰۰۰۰، ۲۰۰۰ و ۱۰۰ پی‌پی‌ام، رشد قارچ کاملاً متوقف شده ولی در غلظت ۱۰۰ پی‌پی‌ام اسانس‌های مرزه و آویشن شیرازی قارچ به تدریج رشد و پیشرفت نمود و ظرف ۶ روز تمام قطر ۹۰ میلی‌متری سطح تشتک را فرا گرفت، اما در مورد اسانس زنیان ۱۰۰ پی‌پی‌ام تا حدودی رشد قارچ مهار و اثر آن بهتر از دو اسانس دیگر بود. اکنون که در آزمایش مقدماتی حدود تأثیر اسانس‌ها مشخص گردید، در آزمایش اصلی چهار غلظت شامل غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام از هر اسانس انتخاب و روی

اثر اسانس‌ها بر درصد آلودگی میوه توت‌فرنگی به قارچ ریزوپوس

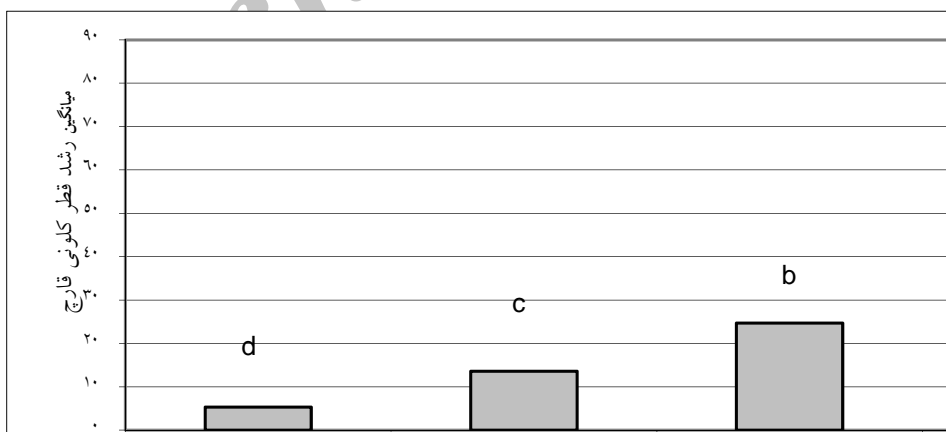
مقایسه میانگین اثر اسانس‌های مختلف بر میزان آلودگی میوه‌ها (جدول ۴ و شکل ۴) بیشترین آلودگی را در شاهد، سپس زنیان، آویشن شیرازی و مرزه نشان داد. کمترین میزان آلودگی نیز مربوط به قارچ‌کش کاربندازیم + اپرودیون ۵/۵۲٪ بود. با توجه به استفاده از قارچ‌کش در بعضی مواقع و سمی بودن آن، بر اساس نتایج به دست آمده قارچ‌کش کمترین اثر را در کنترل قارچ در مقایسه با اسانس‌ها دارد.

نشان داد که مدت زمان مزبور نقشی در میزان آلودگی ندارد. ضمناً چون مواد چهارگانه مذکور با غلظت‌های انجام شده نتوانستند رشد قارچ ریزوپوس را روی میوه‌ها مهار نمایند، بدین جهت یک آزمایش تکمیلی با غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام برای هر یک از چهار ماده انجام گردید. البته انتخاب غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام به واسطه این بود که شرکت سازنده، قارچ‌کش را با همین غلظت علیه مبارزه با بیماریهای قارچی توصیه نموده بود، به این دلیل اسانس‌ها هم با همین غلظت انتخاب شد. قارچ‌کش کاربندازیم در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام کاملاً جلو رشد قارچ ریزوپوس را گرفته ولی در مورد سه اسانس هنوز آلودگی‌های جزئی با درصد خیلی کم مشاهده می‌گردد که می‌توان این آلودگی کم را نیز به علت سریع‌الرشد بودن ریزوپوس دانست.

جدول ۱- مقایسه میانگین اثر اسانس‌های مختلف روی رشد قارچ *Rhizopus stolonifer* روی PDA

اسانس	مرزه	آویشن شیرازی	زنیان	شاهد
میانگین رشد قطر کلونی قارچ	۶۰/۱۳ c	۶۴/۲۴ b	۳۳/۵ d	۰۰/۸۵ a

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($p \leq 0.1$).



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر اسانس‌های مختلف روی رشد قارچ *Rhizopus stolonifer* روی PDA

جدول ۲- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف اسانس روی رشد قارچ *Rhizopus stolonifer* روی PDA

غلظت	۰	۱۰۰	۲۰۰	۳۰۰	۵۰۰
	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
میانگین رشد قطر کلونی قارچ	۰۰/۸۵ a	۲۵/۶۵ b	۶۶/۲۸ c	۰۰/۶ d	۰۰/۰ d

میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($p \leq 0.1$).

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرهای مختلف اسانس و غلظت آنها روی رشد قارچ *Rhizopus stolonifer*

اسانس	غلظت	میانگین رشد قطر کلونی قارچ
مرزه	۱۰۰	۲۵/۸۵ a
	۲۰۰	۲۵/۱۰ de
	۳۰۰	۰۰/۰ e
	۵۰۰	۰۰/۰ e
آویشن شیرازی	۱۰۰	۰۰/۸۵ a
	۲۰۰	۵۰/۶۹ b
	۳۰۰	۰۰/۱۸ cd
	۵۰۰	۰۰/۰ e
زنیان	۱۰۰	۷۵/۲۵ c
	۲۰۰	۲۵/۶ e
	۳۰۰	۰۰/۰ e
	۵۰۰	۰۰/۰ e
شاهد	۰	۰۰/۸۵ a

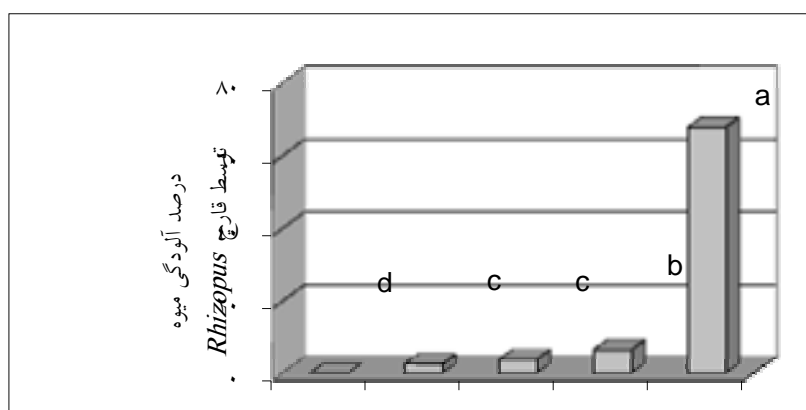
حروف یکسان در هر ستون نشان‌دهنده عدم تفاوت معنی‌دار تیمارها می‌باشد.

جدول ۴- مقایسه میانگین اثرهای اسانس‌های مختلف با غلظت ۱۰۰۰ ppm بر درصد آلودگی

قارچ *Rhizopus stolonifer* روی میوه توت‌فرنگی به روش دانکن †

اسانس	مرزه	آویشن شیرازی	زنیان	قارچ کش کاربن‌دایم + ایپرودیون	شاهد
درصد آلودگی میوه	۶۶۷/۲ b	۰۰۰/۴ b	۶۶۷/۶ b	۰۰۰/۰ d	۰۰۰/۶۸ a

†: میانگین‌هایی که حداقل دارای یک حرف مشترک هستند فاقد تفاوت معنی‌دار می‌باشند ($p \leq 0.1$).



شکل ۴- مقایسه میانگین اثرهای اسانس‌های مختلف با غلظت ۱۰۰۰ppm بر درصد آلودگی قارچ *Rhizopus stolonifer* روی میوه توت‌فرنگی

بحث

پیامدهای سوء زیست محیطی که ناشی از مصرف آفت‌کش‌ها از جمله قارچ‌کش‌ها می‌باشد باعث توجه بیشتر افکار عمومی به کاربرد بی‌رویه این ترکیب‌ها در کشاورزی شده‌است. نتایج بررسی‌های مختلف نشان داده که به جای استفاده از قارچ‌کش‌هایی که دارای ماندگاری بالا در محصولات هستند می‌توان از متابولیت‌های گیاهی به‌عنوان یک ذخیره ارزشمند استفاده کرد.

نتایج آزمایش‌های انجام شده که قبلاً ذکر شد نشان داد که اسانس‌های مرزه، آویشن شیرازی و زنیان دارای خاصیت ضدقارچی بوده و به‌طور مؤثری قادر به مهار بیماری‌های پس از برداشت توت‌فرنگی بوده‌است. Saksena و Saksena (۱۹۸۴) نیز فعالیت ضدقارچی زنیان علیه درماتوفیت‌ها را مورد تأیید قرار دادند. نتایج آزمایش روی *Rhizopus* نیز نشان داد که اسانس مرزه و زنیان روی محیط کشت PDA با غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام و آویشن شیرازی با غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام رشد قارچ را مهار کرد و هر سه اسانس با غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام هم توانست آلودگی قارچی را روی میوه توت‌فرنگی تا ۳ روز در

محیط اتاق (۱ ± ۲۴ درجه سانتی‌گراد) مهار کند و اسانس زنیان در محیط PDA بهتر از مرزه ولی اثر مرزه روی میوه بهتر از زنیان و آویشن شیرازی بود که با نتایج آزمایش‌های هاشمی و همکاران (۱۳۸۷) نیز مطابقت دارد. تحقیقات هاشمی و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان داد که عصاره‌های روغنی آویشن، میخک و مرزه توانایی مهار رشد قارچ آسپرژیلوس فلاووس *A. flavus* را در محیط کشت مایع و خمیر گوجه‌فرنگی داشته و عصاره روغنی آویشن و مرزه قویترین اثر مهاری را به‌ترتیب با ۳۵۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام غلظت نشان دادند.

علت بالا بودن غلظت‌ها علیه قارچ ریزوپوس روی میوه‌های توت‌فرنگی در درجه اول به‌دلیل سریع‌الرشد بودن قارچ نسبت به قارچ‌های دیگر می‌باشد. در این رابطه مشخص شده که نتایج یک درمان ضدقارچی به عوامل مختلفی نظیر ویژگی‌های قارچ مورد نظر، ویژگی‌های داروی ضدقارچی و فاکتورهای میزبان وابسته است (Canuto & Rodero, 2002).

با توجه به اینکه غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام اسانس‌ها توانست روی میوه توت‌فرنگی باعث کنترل نسبی قارچ

آن دانستند. طالعی و همکاران (۱۳۸۶) نیز نتایج مشابه این آزمایش را بدست آوردند و همچنین دلیل ضدباکتریایی بودن آویشن را درصد بالای تیمول و پایین بودن غلظت کارواکرول بیان کردند.

نبی گل و فرزانه (۱۳۸۶) در آزمایشی که تأثیر اسانس‌های گیاهان دارویی درمنه، مرزه و سالویا را روی توت‌فرنگی مورد آزمایش قرار داده بودند، تأثیر اسانس مرزه با غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام را در مهار قارچ بوتریس، اسپرژیلوس، ریزوپوس و پنسیلیوم مؤثرتر از بقیه اسانس‌ها گزارش کردند.

نتایج تحقیقات Rezaee و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که مقدار ترکیب‌های شیمیایی در اندام‌های مختلف گیاه متفاوت است. ترکیب‌های موجود در اسانس گیاه آویشن شیرازی، کارواکرول و تیمول و پس از این دو، لینالول و پارا-سیمن می‌باشد که به ترتیب ۶۱/۲۹، ۲۵/۱۸، ۱/۹۶ و ۱/۹۰ درصد از اسانس حاصل از نمونه خشک گیاه را تشکیل می‌دهد (جاویدنیا، ۱۳۷۶).

Karami-Osboo و همکاران (۲۰۱۰) نیز دلیل مهار باکتری توسط آویشن و مرزه را وجود تیمول در آویشن و کارواکرول در مرزه دانستند. براساس این مطالعات، می‌توان نتیجه گرفت که اسانس‌های گیاهان دارای ترکیب‌هایی با پتانسیل فعالیت ضدقارچی بوده و می‌توانند در صورت فرمولاسیون مطلوب به‌عنوان جایگزین قارچ‌کش‌های صنعتی در کنترل آلودگی‌های قارچی روی محصولات کشاورزی پس از برداشت مورد استفاده قرار گیرند.

ریزوپوس شود، ولی مشاهدات نشان داد که پس از بکار بردن غلظت‌های بالای اسانس، سوختگی کاسبرگ و کاهش کیفیت سطح میوه به دلیل وجود بخار شدید تیمول بوده که مقدار این ماده در اسانس زنیان بیشتر می‌باشد. اصغری مرجانلو و همکاران (۱۳۸۷) نیز به این نتیجه رسیدند که استفاده از اسانس ریحان با غلظت‌های بالای ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام روی میوه توت‌فرنگی نیز همین حالت را ایجاد کرده‌است.

اثر اسانس‌ها روی جلوگیری از رشد قارچ مربوط به وجود مواد مؤثره آنهاست که نتایج آنالیز اسانس‌ها وجود این ترکیب‌ها را مشخص می‌کند. نتایج آنالیز کارخانه باریج اسانس کاشان نشان داد که اسانس مرزه دارای ۲۸/۱۸٪ تیمول، ۱۹/۵۶٪ پارا-سیمن، ۱۵/۹۷٪ گاما-تریپنین و ۱۱/۰۲٪ کارواکرول است. همچنین در اسانس آویشن شیرازی تیمول (۳۸/۶۷٪)، پارا-سیمن (۱۰/۲۲٪)، گاما-تریپنین (۹/۷۵٪) و کارواکرول (۱۵/۲۹٪) و در اسانس زنیان تیمول (۴۵/۹۴٪)، گاما-تریپنین (۲۰/۶۴) و پارا-سیمن (۱۹/۰٪) ترکیب‌های عمده می‌باشند.

Vagelas و همکاران (۲۰۰۹) ترکیب‌های فنلی را عامل مهار رشد قارچ‌ها دانستند و بیان کردند که با توجه به نتایج بدست آورده، ماده مؤثره اسانس‌ها در مهار قارچ‌ها را می‌توان مربوط به تیمول، کارواکرول، پارا-سیمن و گاما-تریپنین دانست. براساس مقایسه نتیجه آنالیز هر سه اسانس میزان گاما-تریپنین مهمترین ماده در مهار قارچ بوده که بیشترین آن به ترتیب در اسانس زنیان با ۲۰/۶۴٪، مرزه ۱۵/۹۷٪ و آویشن شیرازی ۹/۷۵٪ درصد بوده‌است.

نطنزیان قهفرخی و همکاران (۳۸۷) نیز اثر ضدقارچی اسانس زنیان را تأیید و دلیل آن را وجود ماده تیمول در

منابع مورد استفاده

- اشکان، م. و قنواتی، م.، ۱۳۸۵. درس‌نامه بیماری‌های مهم درختان میوه در ایران. ناشر آیش، تهران، ۴۷۲ صفحه.
- اصغری مرجانلو، ا.، مستوفی، ی.، شعیعی، ش. و مقومی، م.، ۱۳۸۷. تأثیر اسانس ریحان بر کنترل پوسیدگی خاکستری و کیفیت پس از برداشت توت‌فرنگی. گیاهان دارویی، ۸(۲۹): ۱۳۱-۱۳۹.
- بهنامیان، م. و مسیحا، س.، ۱۳۸۱. توت‌فرنگی. انتشارات ستوده، تبریز، ۱۲۰ صفحه.
- جاویدنیا، ک.، ۱۳۷۶. شناسایی ترکیبات موجود در اسانس گیاهان آویشن شیرازی، کاکوتی و گونه‌ای بابونه و بررسی اثرات ضد میکروبی آنها استفاده از روش الکترواسپری- طیف سنجی جرمی در بررسی ترکیبات حاوی گروه نیترو. پایان‌نامه دکترای شیمی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران.
- شاه‌بیگ، م.، ۱۳۸۱. اثرات انبار سرد و معمولی، تیمارهای قارچ‌کش، پوشش پلی اتیلن و کیورینگ بر عمر انبارداری نارنگی پیچ. تحقیقات مهندسی کشاورزی، ۳(۱۱): ۱۶-۱.
- طالعی، غ.، مشکوه السادات، م. ه. و موسوی، ز.، ۱۳۸۶. بررسی اثر آنتی باکتریایی اسانس دو گونه آویشن، برگ زعفران و کنگر. سومین همایش گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، ۳-۲ آبان: ۴۸۰.
- عبدالهی، ع.، حسنی، ع. و قوستا، ی.، ۱۳۸۶. بررسی اثر بازدارندگی برخی از اسانسهای گیاهی در کنترل قارچ *Penicillium digitatum* در شرایط سردخانه. سومین همایش ملی گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ۳-۲ آبان: ۱۲.
- مستوفی، ع.، اصغری، ا.، ن. یکخواه، م. ج. و سفیدکن، ف.، ۱۳۸۶. بررسی اثرات قارچ‌کشی اسانسهای ریحان و مریم‌گلی روی قارچ *Botrytis cinerea* با دو روش مختلف. خلاصه مقالات سومین همایش ملی گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، ۳-۲ آبان: ۳۸۹.
- نبی‌گل، ا. و فرزانه، م.، ۱۳۸۶. ارزیابی پتانسیل ضد قارچی اسانس گیاهان اسطوخودوس و انیسون علیه قارچ *Rhizopus stolonifer*. سومین همایش ملی گیاهان دارویی، دانشگاه شاهد، تهران، ۳-۲ آبان: ۳۰۲.
- نظریان قهفرخی، م.، ستاری، م.، یادگاری، م. ح.، گودرزی، غ. ر. و سحرخیز، م. ج.، ۱۳۸۷. اثرات ضد قارچی اسانس و عصاره الکلی زنیان علیه ایزوله‌های بالینی مقاوم و حساس به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی. علوم پزشکی مدرس، ۱۱(۲-۱): ۹۷-۹۱.
- هاشمی، ن.، حسنی، ع.، اصغری، م. ر. و جوادی، ت.، ۱۳۸۷. تأثیر برخی اسانسهای گیاهی و اسید سالیسیلیک در کنترل بیماری‌های قارچی پس از برداشت توت‌فرنگی. سومین همایش منطقه‌ای یافته‌های پژوهشی کشاورزی و منابع طبیعی (غرب کشور)، دانشگاه کردستان، ۱۵-۱۴ اسفند: ۵.
- Canuto, M.M. and Rodero, F.G., 2002. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. The Lancet Infectious Diseases, 2(9): 550-563.
- Karami-Osboo, R., Khodaverdi, M. and Ali-Akbari F., 2010. Antibacterial effect of effective compounds of *Satureja hortensis* and *Thymus vulgaris* essential oils against *Erwinia amylovora*. Journal of Agricultural Science and Technology, 12: 35-45.
- Lee, S.O., Choi, G.J., Jang, K.S., Lim, H.K., Cho, K.Y. and Kim, J.C., 2007. Antifungal activity of five plants essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. Plant Pathology Journal, 23(2): 97-102.
- Omidbeygi, M., Barzegar, M., Hamidi, Z. and Naghdibadi, H., 2007. Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquide medium and tomato paste. Food Control, 18(12): 1518-1523.
- Reddy, M.V.B., Belkacemi, K.H., Corcuff, R., Castaigne, F. and Arul, J., 2000. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology, 20: 39-51.
- Rezaee, M.B., Jaimand, K. and Mozaffrian, V., 2008. Essential oil composition of *Anthemis coelopoda* Boiss. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24(3): 271-277.
- Saksena, N.K. and Saksena, S., 1984. Enhancement in the antifungal activity of some essential oils in combination against some dermatophytes. Indian Perfumer, 28(1):42-5.
- Vagelas, I., Papachatzis, A., Kalorizou, H. and Wogiatzi, E., 2009. Biological control of *Botrytis cinerea* fruit rot (Gray mold) on strawberry and red pepper by olive oil mill wastewater. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 23(4): 1489-1491.

Antifungal effects of three plant essential oils against *Rhizopus stolonifer*, the cause of soft rot on strawberry fruit

M. Behdad^{1*}, N.A. Etemadi², E. Behdad³ and H. Zeinali⁴

1*- Corresponding author, M.Sc. Student, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan, Iran
E-mail: Mary_behdad@yahoo.com

2- Faculty of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran

3- Faculty of Agriculture, Islamic Azad University, Khorasgan Branch, Isfahan, Iran

4- Research Center for Agriculture and Natural Resources, Isfahan, Iran

Received: March 2011

Revised: October 2011

Accepted: October 2011

Abstract

Usually, many chemical fungicides are used to control fungal infections. However, some of these fungicides are harmful for human health. The goal of this study was to examine the essential oils of certain medicinal plants to control the fungi and replace the chemical fungicides. One of the most important and widespread fungi that infects strawberries during the post-harvest period is *Rhizopus stolonifer*. The effects of essential oils of three plant species: *Satureja hortensis*, *Zataria multiflora* and *Carum copticum* on the mycelial growth of *Rhizopus stolonifer* were tested both *in vitro* and *in vivo* on a medium of potato dextrose agar in seven concentrations (100, 200, 300, 500, 1000, 2000 and 10000 ppm). The *in vivo* experiment contained six groups: three essential oils, one fungicide and two controls. Each treatment consisted of three replicates and each replicate included five strawberries each weighing about 70 grams. Each fruit was disinfected, placed in a suspension of 10^6 spores per milliliter of *Rhizopus stolonifer*; and then placed in a suspension of either the essential oil or fungicide (Iprodione + Carbendazim 52.5% WP). The fruits were kept at room temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$). Results showed that the critical inhibitory concentration of *Rhizopus stolonifer* was 300 ppm for *Satureja hortensis* and *Carum copticum* and 500 ppm for *Zataria multiflora*. On the other hand, *in vivo* experiments showed that the greatest amount of remaining fungus was in the following order: control groups, *Carum copticum*, *Zataria multiflora* and *Satureja hortensis*.

Key words: Strawberry, soft rot, essential oil, *Satureja hortensis*, *Zataria multiflora*, *Carum copticum*, *Rhizopus stolonifer*.