

بررسی اثر ضدقارچی اسانس چهار گیاه دارویی، آنالیز و شناسایی ملکولی باکتری *Penicillium digitatum* پرتقال بعد از برداشت

شروین هادیان^۱، نادر حسن زاده^{۲*}، محمدعلی آقاجانی^۳، حمیدرضا پردلی^۴، گابریلا سیرولری^۵

^۱ دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۲ دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^۳ دانشیار، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران
^۴ استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، ایران
^۵ استاد، گروه علوم و فنون گیاه شناسی، بخش بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه کاتانیا، ایتالیا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۱

چکیده

کپک سبز مرکبات *Penicillium digitatum* از مهم ترین بیماری های بعد از برداشت می باشد. به کارگیری مداوم سموم شیمیایی تاثیر ماندگار روی سلامتی انسان و آلودگی محیط زیست دارد و سبب بروز مقاومت در سویه های بیماری زا می گردد. در این تحقیق فعالیت ضدقارچی غلظت های مختلف (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ پی پی ام) اسانس چهار گیاه دارویی آویشن شیرازی (*Thymus vulgaris*)، آلوورا (*Aloe vera*)، سیر (*Allium sativum*) و زیره سبز (*Cuminum cyminum*) جمع آوری شده از منطقه قرق استان گلستان مورد بررسی قرار گرفت. اسانس ها با استفاده از روش تقطیر؛ بخار آب و با استفاده از دستگاه کلونجر تهیه و سپس مهمترین مواد موثره اسانسی که بیشترین عملکرد آنتاگونیستی را داشتند توسط دستگاه GC/MS آنالیز گردید. همچنین فعالیت آنتاگونیستی باکتری های جداسازی شده از اپی فیت پرتقال شامل *Pseudomonas sp.*، *Bacillus sp.*، *Streptomyces sp.* علیه قارچ پنی سیلیوم در قالب طرح فاکتوریل مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین درصد ممانعت کنندگی (۹۹/۹۵ درصد)، توسط اسانس آویشن علیه پنی سیلیوم در غلظت ۴۰۰ پی پی ام مشاهده گردید. آنالیز رگرسیونی تاثیر اسانس ها نشان داد با افزایش غلظت اسانس درصد بازدارندگی آن روی قارچ افزایش می یابد. بر اساس نتایج به دست آمده، اسانس آویشن با داشتن مهمترین ترکیبات موثره در اسانس ها (کارواکول - ۴۵/۵ درصد)، آلفا- ترپینئول (-۲۲/۹ درصد) و اندو- بورنئول (۱۴/۳ درصد) بیشترین فعالیت ممانعت کنندگی (۲۲/۳ میلی متر) را علیه پنی سیلیوم از خود نشان داد. در بین ۲۳ جدایه باکتریایی، یک جدایه به نام H7 بیشترین فعالیت ممانعت کنندگی را علیه قارچ داشت. با استفاده از PCR و تعیین توالی DNA ژنوم 16S rRNA، H7 به عنوان *Bacillus cereus* شناسایی گردید. بنابراین اسانس آویشن و جدایه *Bacillus cereus* (H7) جایگزین های مناسبی برای کنترل شیمیایی پوسیدگی بعد از برداشت پرتقال می باشند.

واژه های کلیدی: آویشن، اسانس، باکتری های آنتاگونیست، کارواکول، کپک سبز مرکبات، *Penicillium digitatum*

*نویسنده مسئول: hasanzadehr@yahoo.com

مقدمه

Pseudomonas cepacia و *Bacillus subtilis* بوده است همه این آنتاگونیست‌ها می‌توانند محل زخم‌ها را کلونیزه کنند و مواد آنتی بیوتیک ترشح می‌کند نموده که و از گسترش پوسیدگی جلوگیری نمایند (Sharma et al., 2009).

تعدادی از محققان تأثیر مثبت باکتری *Pseudomonas syringae* در کنترل بیماری پوسیدگی بعد از برداشت مرکبات با تولید دو نوع فیتوتوکسین و همچنین تأثیر این دو فیتوتوکسین بر روی غشای سلول میزبان را گزارش نمودند. همچنین و توسط PCR ژن موثر در کنترل را ردیابی نمودند (Cirvilleri et al., 2005).

در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای آغاز گردیده که نشان می‌دهد متابولیت‌های ثانویه برخی گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد قارچ‌ها مؤثر بوده و جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی هستند. تحقیقات نشان داده است که گیاهان معطر متعلق به تیره‌های نعناعیان، کاسنی و چتریان از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی برخوردار هستند. تعدادی از محققان تأثیر اسانس گیاهان دارویی آویشن (*Thymus vulgaris*)، آلوئه ورا (*Aloe vera*) و درخت چریش (*Azadirachta indica*) توانایی بازدارندگی از رشد میسلومی و تولید اسپور توسط قارچ‌های بیمارگر *Rhizopus* و *P. expansum*، *Aspergillus niger* و *stolonifer* اسانس گیاهان دارویی آویشن، مرزه، آلوئه ورا و درخت چریش را گزارش نمودند (Charles et al., 2012).

تأثیر ضد قارچی گیاه سیر بر روی گونه‌های مختلف قارچ پنی سیلیوم گزارش گردیده است و در تحقیقات آزمایشگاهی تأثیر ممانعت رشدی آن بر روی قارچ پنی سیلیوم گزارش گردیده است (Bandalan and Lauzon, 2018). پذیرا در سال ۱۳۹۶ فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن باغی

مرکبات گروهی از میوه‌های نیمه گرمسیری جهان بوده که دارای ارزش اقتصادی بسیار زیادی در کشورهایمانند برزیل، آمریکا و چین می‌باشند. امروزه در دنیا مجموع فعالیت‌های کشاورزی و اقتصادی و صنعتی این گروه تحت عنوان صنعت مرکبات شناخته می‌شود (Bousbia et al., 2009). از مهم‌ترین بیماری بعد برداشت مرکبات کپک‌های سبز و آبی مرکبات می‌باشد که به ترتیب توسط قارچ‌های *Penicillium digitatum* و *P. italicum* ایجاد می‌گردند (Valero and Serrano, 2010).

کپک سبز مرکبات که به وسیله *P. digitatum* ایجاد می‌گردد سبب بیش از ۹۰ درصد خسارت در طول مراحل انبارداری و حمل و نقل در مرکبات می‌شود. میزان خسارت بیماری کپک سبز در شمال کشور ۱۰ تا ۱۵ درصد و در جنوب ۲ تا ۵ درصد گزارش شده است (Zamani et al., 2009). معمولاً جهت کنترل کپک سبز مرکبات از سموم شیمیایی متداول ایمازالیل، تیابندازول و ترکیبات گوگردی آلی و معدنی و مواد اکسیدکننده استفاده می‌گردد (Swamy and Sinniah, 2015).

به‌کارگیری روش‌های متفاوت برای مقاوم نگه داشتن میوه‌ها در مقابل پوسیدگی‌های بعد از برداشت مانند استفاده از هورمون‌ها، هوای سرد اگرچه تا حدی این پوسیدگی‌ها را کنترل می‌کنند ولی به‌صورت کامل مانع ایجاد پوسیدگی نمی‌شوند. بنابراین نیاز به کاربرد سموم شیمیایی جهت کنترل بهتر آلودگی قارچ همچنان وجود دارد و متأسفانه تکرار در استفاده از سموم شیمیایی سبب ایجاد مقاومت به گونه‌های *P. digitatum* و *P. italicum* می‌گردد (Kinay et al., 2007). تاکنون تلاش‌های ابتدایی مختلفی برای کنترل بیماری‌ها بعد از برداشت انجام شده است که عبارتند از: شامل استفاده از

لهیده شده میوه که حاوی میسلیم‌های سفیدرنگ و اسپوره‌های به رنگ سبز زیتونی قارچ عامل بیماری بود جداسازی و سپس خالص سازی شد و به روش نوک هیف و تک اسپور روی محیط کشت PDA کشت صورت گرفت (Timmer et al., 2000). با مقایسه استفاده از کلید شناسایی و مقایسه با استاندارد، قارچ *Penicillium digitatum* شناسایی و جداسازی گردید و ایزوله لازم از آن تهیه و بر روی محیط کشت (Potato Dextrose Agar) PDA کشت و نگهداری گردید.

تهیه سوسپانسیون قارچ: به پلیت ظرف حاوی محیط کشت ۷ الی ۹ روز قارچ، آب مقطر استریل به همراه یک قطره روغن توین ۲۰ اضافه شد و سپس با استفاده از لام گلوبول شمار سوسپانسیون اسپور قارچ *Penicillium digitatum* با تعداد 10^4 اسپورتهیه گردید. برای مایه‌زنی مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون در داخل هر زخم ایجاد شده بر روی پوست پرتقال‌ها تزریق گردید (Timmer et al., 2000).

تهیه اسانس گیاهان دارویی: چهار گیاه دارویی آویشن شیرازی (*Thymus vulgaris*)، آلوورا (*Aloe vera*)، زیره سبز (*Cuminum cyminum*) و سیر (*Allium sativum*) از منطقه قرق استان گلستان تهیه گردید و در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی مورد تایید قرار گرفتند. برگ گیاهان دارویی آویشن، و میوه زیره سبز و حبه سیر توسط دستگاه خردکن هرکدام را کامل خرد شدند نموده و از گیاه آلوورا ژل داخل برگ‌ها استخراج شد و سپس در داخل شیشه‌های تیره‌رنگ در داخل یخچال نگهداری شد.

اسانس آن‌ها با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب تهیه گردید، بدین‌منظور ۱۰۰ گرم از ماده بافت خشک خرد شده گیاهی را داخل ارلن ریخته و دوسوم آن را آب مقطر استریل ریخته و به

(Thymus vulgairis) بر روی قارچ‌های ساپروفیت *A. flavus* و *A. fumigatus Aspergillus niger* گزارش نمود (Pazira, 2017).

تاثیر ضدقارچی مریم گلی *Salvia officinalis* و آویشن شیرازی *Thymus vulgaris* بر علیه فوزاریوم گندم *Fusarium graminearum* توسط تعدادی از محققان گزارش گردید (Alexa et al., 2018).

به دلیل حساسیت‌هایی که در استفاده از ترکیبات شیمیایی مصنوعی وجود دارد (به خاطر تهدید سلامتی انسان و محیط‌زیست) و همچنین افزایش تقاضای محصولات ارگانیک (تولیدشده بدون استفاده از نهاده‌های شیمیایی) و نیز به دلیل ایجاد نژادهای جدید و مقاوم پاتوژن در برابر قارچ‌کش‌های مورد استفاده، امروزه تلاش می‌شود تا از برخی مواد و فرآورده‌های طبیعی و فاقد اثرات جانبی زیان‌آور نظیر مانند اسانس‌های گیاهی و آنتاگونیست‌های موجود در طبیعت به‌عنوان جایگزین قارچ‌کش‌های شیمیایی در کنترل و یا کاهش بیماری‌ها و ضایعات انباری محصولات باغی استفاده گردد. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر اسانس‌های چهار گیاه دارویی آویشن شیرازی (*Thymus vulgaris*)، آلوورا (*Aloe vera*)، سیر (*Allium sativum*) و زیره سبز (*Cuminum cyminum*) جمع‌آوری شده از منطقه قرق استان گلستان و باکتری‌های آنتاگونیست جداسازی شده از اپی فیت پرتقال بر روی ایجاد ممانعت رشدی در عامل بیماری کپک سبز پرتقال *P. digitatum* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، و جداسازی و خالص‌سازی قارچ عامل کپک سبز مرکبات: میوه‌های پرتقال رقم تامسون ناول که علائم کپک سبز مرکبات را به‌وضوح نشان می‌دادند از چند میوه فروشی محلی جمع‌آوری شد و قطعات حاوی بافت سالم و آلوده از محل لکه‌ها نرم و

و برحسب جرم آن‌ها را از یکدیگر جداسازی و ضمن شناسایی مقدار آن‌ها را در محلول اندازه‌گیری می‌کند. دستگاه گروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی از نوع VARIAN مدل GC:CP-3800 با طیف‌سنج جرمی Saturn 2200 است.

جداسازی باکتری‌ها از پوست پرتقال: از پرتقال‌های تامسون ناول تهیه شده سالم که فاقد هرگونه زخم و عارضه بیولوژیک بوده و قبل از هرگونه اعمال شیمیایی به تعداد ۴ عدد به صورت تصادفی انتخاب نموده و سپس پوست پرتقال را به قطعات کوچک، یک تا دو سانتی‌متری برش داده شد. مقدار ۲۵ گرم از آن‌ها را در یک فلاسک نیم لیتری حاوی ۲۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و ۵۰ میکرولیتر توئین ۲۰ به مدت یک ساعت در شیکر دورانی قرار داده شد. سوسپانسیون‌های حاصله بر روی محیط کشت NA (Nutrient Agar) به صورت سفره‌ای کشت گردید و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری گردید. پس از ۲۴ و ۴۸ ساعت کلنی‌های میکروارگانیسم‌های رشد کرده روی محیط کشت مذکور بر اساس مرفولوژی و رنگ جداسازی شده و در محیط کشت جدید تجدید کشت شدند. خالص سازی ایزوله‌های باکتریایی رشد نموده در محیط کشت از روش مخطط صورت گرفت (Brenner-Don et al., 2005). سپس ایزوله‌های جداسازی شده را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده و ایزوله‌های دارای پتانسیل آنتاگونیستی، را پس از مشاهده‌هاله ممانعت رشدی قارچ پاتوژن شناسایی و جداسازی و شناسایی گردید.

شناسایی جدایه‌های باکتری: در مواردی که جدایه‌ها دارای حالت آنتاگونیستی نسبت به عامل کپک سبز مرکبات *Penicillium digitatum* بودند پس از ۴۸ تا ۷۲ ساعت اطراف آن‌ها یک‌هاله شفاف که نشانه عدم رشد پاتوژن است دیده شد. به این ترتیب جدایه‌های

مدت سه ساعت عصاره گیری انجام شد و سپس دستگاه خاموش و اسانس در محل مدرج دستگاه جمع‌آوری شد از آنجایی که اسانس سبک تر از آب است بنابراین روی آب قرار می‌گیرد سپس شیر خروج آب را باز نموده ابتدا آب و در ادامه مقداری اسانس با آب خارج شد راندمان اسانس گیری ۰/۶ درصد وزن گیاه بود (Bakkali et al., 2008).

تأثیر اسانس‌ها بر روی رشد عامل بیماری کپک سبز مرکبات: برای این منظور از روش اختلاط اسانس با محیط کشت PDA استفاده گردید و غلظت‌های 100, 200, 300, 400 ppm اسانس در لیتر محیط کشت تهیه اضافه گردید و دیسک‌هایی از قارچ به قطر ۵ میلی متر در وسط محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های متفاوت قرا داده شد و پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری گردید شدند و پس از ۲۴ ساعت، رشد رویشی‌هاله قارچ به طور روزانه اندازه‌گیری شد تا هنگامی که پتری شاهد توسط قارچ پنی سیلیوم به صورت کامل اشغال شود. این آزمایش با چهار بار تکرار انجام شد. محیط کشت حاوی محلول توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و درصد بازدارندگی رشد از فرمول زیر محاسبه شد (Udo et al., 2001).

۱۰۰ × ۱۰۰ قطر کلنی شاهد / (قطر کلنی تیمارها - قطر کلنی شاهد): درصد بازدارندگی رشد

تجزیه اسانس با دستگاه (GC/MS) برای شناسایی ترکیبات مؤثرترین ترکیبات اسانس در بازدارندگی از رشد قارچ: از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) برای بررسی اجزای تشکیل دهنده اسانس گیاهی دارای بیشترین ممانعت رشدی استفاده شد. اسانس مورد نظر به دستگاه تزریق و اجزای تشکیل دهنده اسانس تعیین گردید. طیف‌سنجی جرمی دستگاهی است که مولکول‌های گازی باردار را بر اساس جرم آن‌ها دسته‌بندی می‌کند

شامل واسرشت در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، اتصال در دمای ۵۶ درجه سلیسیوس به مدت ۳۰ ثانیه، طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۹۰ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ۰/۸ درصد بررسی گردید. به منظور تایید شناسایی باکتری‌ها، توالی‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار بلاست با سایر توالی‌های نوکلئوتیدی نظیر از قبل موجود در بانک اطلاعات ژنی تطبیق داده شدند (Joo et al., 2007).

بررسی تأثیر باکتری بر روی عامل بیماری کپک سبز مرکبات در شرایط آزمایشگاه: از روش کشت متقابل استفاده گردید. سوسپانسیون (10^9 CFU/ml) ایزوله باکتریایی به صورت یک خط مستقیم در یک سمت پلیت ظرف حاوی PDA کشت داده شد و ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس یک دیسک دایره‌ای به قطر ۵ میلی‌متر از کلنی قارچ انتخاب و در فاصله ۵ میلی‌متری از خط کشت باکتری قرار داده شد. پلیت ظرف‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه و کاهش رشد میسیلیومی قارچ پنی سیلیوم در مقایسه با نمونه کنترل محاسبه گردید.

آنالیز داده‌ها

در این بررسی نتایج به دست آمده در قالب طرح فاکتوریل و با استفاده از نرم‌افزار SAS و Status Graphics از روش آماری General linear models استفاده شد صورت پذیرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در رگرسیون ساده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

آنتاگونیست از بقیه مجزا شدند. با استفاده از آزمون‌های میکروسکوپی، میکروسکوپی، واکنش گرم، و بررسی تحرک و آزمون‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، ایندول، H₂S، مصرف سترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز، کازئین و ذوب ژلاتین و نیز اکسیداسیون و تخمیر قند (O/F) جهت تشخیص گونه باکتری آنتاگونیست انجام گرفت. در نهایت، مؤثرترین باکتری در ایجاد ممانعت رشدی با روش مولکولی و از طریق تکثیر قطعه ژنی SrRNA ۱۶ و تعیین توالی آن‌ها شناسایی دقیق شدند (John et al., 1997).

استخراج DNA و تکثیر قطعه ژنی SrRNA ۱۶ با استفاده از PCR: استخراج DNA ژنومی ایزوله‌های موثر با استفاده از کیت، Extraction kit Cat.No.DN8115C شرکت سیناژن ایران انجام شد. در پایان ۶۰ میکرولیتر از محلول رویی حاوی DNA بدست آمده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا برای انجام PCR مورد استفاده قرار گیرد. پرایمرهای مورد استفاده در انجام آزمایش برای شناسایی مولکولی مؤثرترین باکتری با خاصیت آنتاگونیستی از پرایمرهای یونیورسال:

Forward (27F) با توالی:

5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Reverse (1390R) با توالی:

5'-GACGGGCGGTGTGTACAA-3' استفاده

گردید.

واکنش PCR با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل: (۲/۵) میکرولیتر بافر 10X و ۵۰ میلی‌مول MgCl₂، ۰/۵ میکرولیتر dNTPs، ۰/۳ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase، یک میکرولیتر از هر آغازگر، دو میکرولیتر از نمونه DNA و ۱۶/۷ میکرولیتر آب مقطر دی‌یونیزه) انجام گرفت. واکنش PCR با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۵ درجه سلیسیوس به مدت ۵ دقیقه و در ادامه ۳۰ چرخه

نتایج

کلنی‌های ایزوله قارچ *Penicillium digitatum* سفید مایل به سبز تیره رنگ بوده کنیدیفورها به صورت پایه‌هایی کشیده، ساده تا منشعب و شفاف می‌باشند و روی انشعابات کنیدیفور لایه‌ای از فیالید قرار دارد. کنیدیوم‌ها کم‌وبیش بیضوی تا استوانه‌ای شکل، تک‌سلولی و شفاف بودند.

نتایج در محیط کشت PDA بعد از هفت روز در شرایط آزمایشگاه بیانگر آن بود که بین تاثیر کلیه اسانس‌های گیاهان مورد استفاده در ایجاد درصد بازدارندگی در قارچ عامل کپک سبز *P. digitatum* در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی‌داری وجود داشته است. جدول آنالیز واریانس تأثیر اسانس‌ها در ایجاد درصد ممانعت رشدی بیانگر آن است که تیمارها در سطح (P=0.01) دارای اختلاف معنی‌داری می‌باشند (جدول ۱). اسانس گیاه دارویی آویشن شیراز *Thymus vulgaris* بیشترین تأثیر ممانعت رشدی را بر روی قارچ پنی سیلیوم ایجاد نمود و با افزایش غلظت اسانس‌ها در محیط کشت درصد ایجاد ممانعت رشدی آن‌ها افزایش یافت. بین غلظت‌های متفاوت آویشن شیراز در ایجاد ممانعت رشدی از قارچ پنی سیلیوم در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری وجود داشت و اسانس آویشن در دو غلظت ۳۰۰ و ۴۰۰ پی‌پی‌ام قادر بود به ترتیب ۹۸/۵ و ۹۹/۹ درصد ممانعت رشدی ایجاد نماید. در غلظت ۴۰۰ پی‌پی‌ام بین اسانس آویشن و آلوورا اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و زیره سبز کمترین درصد بازدارندگی رشد را نشان داد در حالی که در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ پی‌پی‌ام بین آویشن و آلوورا در درصد بازدارندگی از رشد قارچ *P. digitatum* اختلاف معنی‌داری وجود داشت و تأثیر اسانس آویشن از آلوورا بیشتر بود. به عبارتی بین نوع اسانس و دوز مصرفی آن اثر متقابل معنی‌دار وجود داشت و با توجه به اینکه از نظر

درصد بازدارندگی غلظت‌های متفاوت روند افزایشی داشتند برای بررسی دقیق این روند، رگرسیون انجام داده شد.

بررسی رگرسیونی رابطه بین غلظت و درصد بازدارندگی اسانس گیاهان، روند افزایش درصد بازدارندگی قارچ *P. digitatum* نشان داد با افزایش غلظت اسانس‌های گیاهان آویشن، آلوورا، سیر و زیره سبز در نمودارهای ۱ و ۲ قابل مشاهده می‌باشد و اسانس حاصل از سه گیاه آلوورا، سیر و زیره سبز روند افزایش خطی داشتند در حالی که روند افزایشی گیاه دارویی آویشن به صورت منحنی بود به عبارتی در بررسی تاثیر گیاه دارویی آویشن تا غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام افزایش درصد بازدارندگی با شیب تندی با افزایش غلظت اسانس افزایش یافت و بعد از غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام شیب افزایش با سرعت کمتری صورت پذیرفت. در نمودار رگرسیون مشخص گردید که اسانس‌های آلوورا و سیر شیب افزایشی یکسانی داشته و با سرعت یکسانی با افزایش غلظت اسانس درصد بازدارندگی افزایش یافتند در حالی که اسانس زیره سبز تغییرات بیشتری داشته است و به ازای افزایش هر واحد غلظت اسانس تغییرات زیادی در درصد بازدارندگی رشد قارچ پنی سیلیوم ایجاد گردید.

طی آزمایشات صورت گرفته مشخص گردید اسانس آویشن شیرازی، موثرترین اسانس در ایجاد ممانعت رشدی قارچ پنی سیلیوم می‌باشد و پس از آب‌گیری توسط دستگاه GC/MS آنالیز گردید (جدول ۲). حدود ۱۷ ترکیب متفاوت شناسایی و جداسازی شد که بیشترین درصد مربوط به کارواکرول ۴۵/۵ درصد بود. پس از آن به ترتیب و آلفا ترپینثول ۲۲/۹ درصد و اندو بورنثول ۱۴/۳ درصد بیشترین درصد ترکیبات را داشتند. ترکیبات فوق از ترکیبات شناخته شده در اسانس گیاه دارویی آویشن با خاصیت ضد قارچی می‌باشند. در نمودار کروماتوگرام اسانس

معنی داری را نشان داد (جدول ۳) و بیشترین ممانعت رشدی توسط *Bacillus sp. H7* صورت گرفت و جهت شناسایی تحت آنالیز مولکولی قرار گرفت.

شناسایی دقیق ایزوله *Bacillus sp. H7* در سطح جنس و گونه با ردیف سازی توالی های به دست آمده با توالی های موجود در بانک ژنی NCBI انجام شد. بلاست توالی 16SRNA ایزوله *Bacillus sp. H7* با توالی های ثبت شده در بانک ژنی NCBI بیانگر میزان ۹۶ درصد شباهت ایزوله منتخب با باکتری *Bacillus cereus* بود. توسط PCR قطعه DNA مورد انتظار به طول ۱۵۰۰ جفت باز برای توالی ژنتیکی جدابه مورد نظر تکثیر گردید (شکل ۴).

بحث

در این تحقیق مشخص گردید گیاه دارویی آویشن در غلظت ۴۰۰ppm قادر است ۹۵/۹۹ درصد در شرایط آزمایشگاه و ۱۰۰ درصد روی میوه بازدارندگی در رشد قارچ *P. digitatum* ایجاد نماید (جدول ۱). گزارشات متعددی مبنی بر خاصیت ضدقارچی اسانس گیاهان دارویی متفاوت و همچنین گزارش نمودند افزایش درصد بازدارندگی گیاهان دارویی با افزایش غلظت اسانس افزایش می یابد (Ibetesam Badawy et al., 2011). نتایج پژوهش های پیشین نشان داده بود که عصاره و اسانس گیاه آویشن با حضور ترکیبات ثانویه تیمول و کارواکرول می تواند در غلظت یک در هزار در کپک سبز مرکبات میزان ۱۰۰ درصد ممانعت رشدی ایجاد نماید (Gholchinno et al., 2018). پس می توان گفت غلظت نقش مهمی در خاصیت بازدارندگی اسانس ها دارد.

اسانس گیاه آلوئه ورا بعد از آویشن بیشترین تأثیر را در کاهش بیماری کپک سبز مرکبات ناشی از *Penicillium digitatum* داشته است ولی به صورت کامل قادر به کنترل بیماری نمی باشد. تأثیر مثبت آلوئه

آویشن مشخص گردید پیک اول ترکیب اندوبورنئول (۲۲/۹ درصد)، پیک دوم ترکیب آلفا ترپنئول (۴۵/۵ درصد) نشان داده شد (شکل ۳) در این تحقیق نشان داده شد که این ترکیبات مؤثرترین ترکیبات برای کنترل بیماری کپک سبز مرکبات نیز می باشند.

حدود ۲۳ ایزوله باکتریایی از پوست پرتقال جدا گردید که از بین آنها مهم ترین ایزوله هایی که دارای خاصیت آنتاگونیستی بودند مورد بررسی قرار گرفتند. ایزوله های مربوطه پس از انجام آزمون های بیوشیمیایی شناسایی شدند و مشخص شد که مربوط به سه جنس *Bacillus Pseudomonas* و *Streptomyces* می باشند. از ۵ ایزوله استریتومایسس ۳ ایزوله (H6, H10, H11, H1) و از ۶ ایزوله باسیلوس ۴ ایزوله (H2, H7, H3, H8) و از ۶ ایزوله سودوموناس ۳ ایزوله (H7, H8) واجد خاصیت آنتاگونیستی بودند.

بررسی ایزوله های دارای خاصیت آنتاگونیستی در شرایط آزمایشگاه بر روی قارچ پنی سیلیوم نشان دارد از بین سه ایزوله *Streptomyces* ایزوله *Streptomyces sp. H16* بیشترین خاصیت آنتاگونیستی را داشته و نسبت به دو ایزوله دیگر منطقه ممانعت رشدی باندازه ۲۲/۳ میلی متر ایجاد نموده است و این ایزوله جهت مقایسه با سایر باکتری ها مدنظر قرار گرفت و از بین ۴ ایزوله دارای خاصیت آنتاگونیستی *Bacillus* ایزوله H7 با بیشترین توان ممانعت رشدی، منطقه ممانعت رشدی به اندازه ۲۴ میلی متر ایجاد نمود. از بین ۴ ایزوله *Pseudomonas* مؤثرترین ایزوله H3 باندازه ۱۹/۳ میلی متر منطقه ممانعت رشدی بود. مقایسه بین مؤثرترین ایزوله های سه باکتری *Streptomyces sp. H16* و *Bacillus sp. H7* و *Pseudomonas sp. H3* در ایجاد ممانعت رشدی روی قارچ *P. digitatum* عامل کپک سبز مرکبات از لحاظ آماری اختلاف

وجود درصد زیاد کارواکول و تیمول در اسانس آویشن سبب خاصیت ضد قارچی این اسانس بر علیه *Botrytis cinerea* می‌شود (Bourchra et al, 2003). با توجه به تاثیر مثبت این گیاه روی *P. digitatum* و وجود ترکیبات موثره مشابه پس می‌توان گفت خاصیت ضد قارچی اسانس آویشن مربوط به ترکیبات مذکور می‌باشد. اسانس آویشن به اسانس تم مشهور است و حاوی بیش از ۴۰ درصد ترکیبات فنلی (تیمول و کارواکول) است که اثر ضد عفونی کننده قوی دارند. علاوه بر این کافنیک اسید و تانن موجود در این اسانس نقش مؤثری در کاهش رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها دارد. مطابق آنالیزهای GC کارواکول موجود در آویشن نقش مؤثری در خاصیت ضد قارچی این گیاه دارد (Karimi et al., 2008). تعدادی از دانشمندان در کشور رومانی با مطالعه روی گونه‌های متفاوت آویشن *Thymus*, *Thymus vulgaris*, *Thymus glabrescens*, *Thymus pulegioides*, *serpyllum*, و *Thymus glabrescens* سه ترکیب تیمول و کرواکرول و ترپینول را به عنوان ترکیبات اصلی تشکیل دهنده گونه‌های آویشن معرفی نمودند (Varga et al., 2015). مقایسه نتایج بیانگر آن است که ترکیب کرواکرول به عنوان مهم‌ترین ترکیب با بیشترین خاصیت ضد قارچی در اکثر گونه‌های آویشن وجود دارد و با توجه به منطقه کشت شده میزان آن متفاوت می‌باشد.

نتایج این تحقیق تایید نمود که می‌توان از خود میزبان (میوه پوست پرتقال) باکتری‌های آنتاگونیست مؤثر جداسازی کرد. سه باکتری *Bacillus*, *Pseudomonas* و *Streptomyces* آنتاگونیست منتخب این تحقیق بودند (جدول ۳). بیشترین ایزوله‌های آنتاگونیست جداسازی شده از جنس باسیلوس بودند. برای کنترل کپک سبز مرکبات ۹۲ ایزوله باسیلوس از پوست میوه‌های مرکبات از باغ‌های مختلف جنوب

ورا در زمان استفاده به صورت واکس در کاهش بیماری کپک سبز مرکبات گزارش گردید و دلیل آن را نقش آلوئه ورا در ممانعت از دست دادن رطوبت میوه بیان نمودند (Marpudi et al., 2011) با توجه به مقایسه نتایج می‌توان گفت کاربرد آلوئه ورا به صورت واکس تاثیر بیشتری دارد.

بررسی تاثیر اسانس سیر بر روی پوسیدگی بعد برداشت مرکبات ناشی از قارچ *Penicillium digitatum* نشان داد سیر دارای خاصیت ضد قارچی بوده و در کاهش این بیماری نقش دارد و سبب ایجاد ممانعت رشدی این قارچ در شرایط آزمایشگاه و محیط زنده می‌گردد. مقایسه اثر عصاره سیر بر روی کپک‌های آبی و سبز مرکبات نشان داده است که درصد ممانعت رشدی ایجاد شده روی کپک آبی بسیار بیشتر است (Obagwu and Korsten, 2003) پس می‌توان گفت گونه قارچ در درصد بازدارندگی عصاره نقش دارد. خاصیت ضد قارچی اسانس گیاه دارویی سیر بر روی قارچ‌های متفاوتی گزارش گردیده است (Kutawa et al., 2018).

نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس زیره کمترین تاثیر را در ایجاد ممانعت رشدی دارد همچنین نمودار رگرسیون نشان داد تغییر غلظت نقش بسیار مهمی در افزایش تاثیر این عصاره دارد (شکل ۱ و ۲). در تحقیقات گذشته مشخص شد غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر زیره ۱۰۰٪ ممانعت رشدی بر روی قارچ *Botrytis cinerea* توت فرنگی دارد اگر از روش paper disk استفاده شود. از مقایسه نتایج می‌توان گفت نوع میزبان قارچی و روش آزمایشگاهی مورد استفاده در تاثیر ضد قارچی عصاره نقش دارد.

در این تحقیق مشخص گردید بیشترین درصد مربوط به کارواکول ۴۵/۵ درصد و پس از آن به ترتیب و آلفا ترپینول ۲۲/۹ درصد و اندوبورنئول ۱۴/۳ درصد بیشترین درصد ترکیبات را داشتند (جدول ۲)،

زیست محیطی بر روی سلامتی انسان و محیط زیست می باشد و تهیه آن نسبت به سموم شیمیایی از نظر اقتصادی بسیار مقرون به صرفه بوده و قادر است به صورت معنی داری کپک سبز مرکبات ناشی از قارچ *Penicillium digitatum* را کاهش داده و ماندگاری میوه را در شرایط انبارداری افزایش دهد. بنابراین می توان با مطالعات بیشتر از آنها به عنوان جایگزین مناسب سموم شیمیایی در کنترل بیماری بعد برداشت پرتقال استفاده نمود.

جدول ۱: تاثیر چهار گیاه دارویی آویشن شیرازی، زیره سبز، سیر، آلوورا در چهار غلظت (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ ppm) بر روی درصد ممانعت رشدی قارچ پنی سیلیوم.

اسانس	غلظت (ppm)	میانگین درصد بازدارندگی	گروه ها
آویشن	۱۰۰	۶۷/۳۵۲۵	G
آویشن	۲۰۰	۸۷/۵۵	D
آویشن	۳۰۰	۹۸/۵۵	B
آویشن	۴۰۰	۹۹/۹۵	A
آلوورا	۱۰۰	۵۸/۴	I
آلوورا	۲۰۰	۷۱/۱	F
آلوورا	۳۰۰	۸۶/۴۲۵	E
آلوورا	۴۰۰	۹۹/۸۲۵	A
سیر	۱۰۰	۴۰/۱۷۵	K
سیر	۲۰۰	۵۹/۵۷۵	H
سیر	۳۰۰	۷۰/۶۷۵	F
سیر	۴۰۰	۸۹/۱۵	C
زیره سبز	۱۰۰	۰/۲۵	M
زیره سبز	۲۰۰	۲۳/۵۵	L
زیره سبز	۳۰۰	۴۲/۳۷۵	J
زیره سبز	۴۰۰	۵۹/۷۵	H
LSD		۰/۶۳۳۴۳۶	

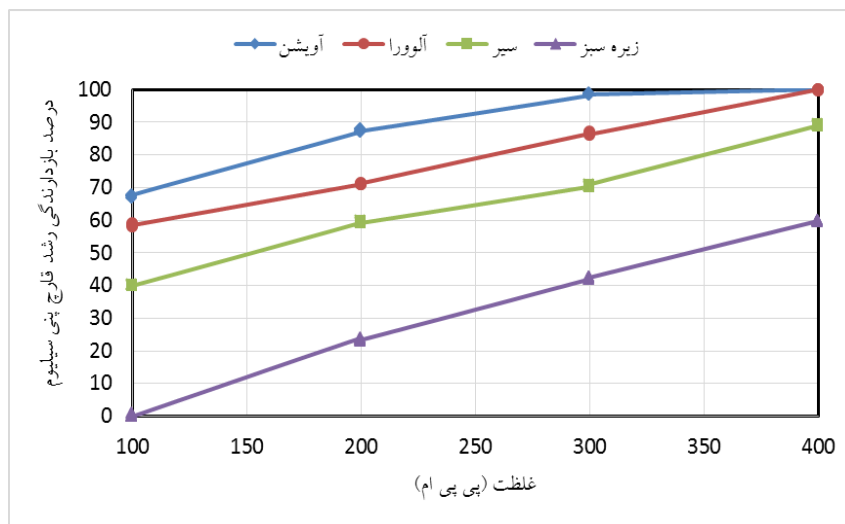
* داده های جدول بر اساس چهار تکرار بوده و وجود حروف نامشابه بیانگر اختلاف معناداری بین تیمارها است.

آفریقا جداسازی گردید که از این تعداد ۱۰ ایزوله دارای خاصیت آنتاگونیستی بودند و سبب کاهش رشد چشمگیری در کپک سبز مرکبات *P. digitatum* شدند. در گذشته تاثیر مثبت *B. subtilis* را بر روی کپک سبز مرکبات *P. digitatum* موثر گزارش نمودند شده است (Abraham et al., 2010). از مقایسه نتایج می توان به تاثیر مثبت باکتری دو گونه باکتری باسیلوس به نام های *B. subtilis* و *B. cereuse* روی کپک سبز مرکبات اشاره نمود.

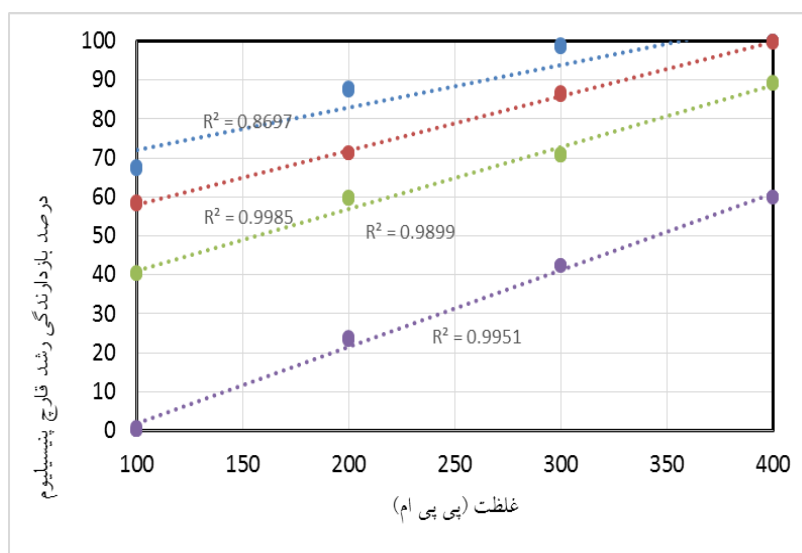
گزارشات متعددی از نقش موثر باکتری های گونه باسیلوس خصوصا گونه های *B. subtilis*، *B. cereus* و *B. amyloliquefaciens* وجود دارد که به صورت موفقیت آمیزی در کنترل آفات و بیماری به کارگیری شده است. باکتری گونه های جنس های باکتریایی باسیلوس قدرت بسیار زیادی در کنترل بیولوژیک دارند زیرا آنها قادر هستند حیات خود را تا مدت طولانی حفظ نمایند (Nagorska et al., 2007). با مقایسه با نتایج این تحقیق می توان از باکتری باسیلوس به عنوان جایگزین مناسب کنترل شیمیایی نام برد.

نتیجه گیری کلی

از میان چهار اسانس گیاهان دارویی، اسانس گیاه دارویی آویشن و در بین ۲۳ ایزوله باکتری جداسازی شده از پرتقال (*Bacillus cereuse* (H7) بیشترین ممانعت رشدی روی قارچ پنی سیلیوم ایجاد نمودند در مقایسه تاثیر بین عصاره آویشن شیراز و باکتری باسیلوس، اسانس آویشن از تاثیر بیشتری برخوردار بود. اسانس گیاه آویشن علاوه بر اینکه از ماهیت طبیعی برخوردار بوده و فاقد هرگونه تأثیرات سوء



شکل ۱: نمودار بررسی روند افزایش درصد بازدارندگی قارچ کپک سبز با افزایش غلظت اسانس گیاهان دارویی با افزایش غلظت درصد بازدارندگی افزایش می‌یابد.

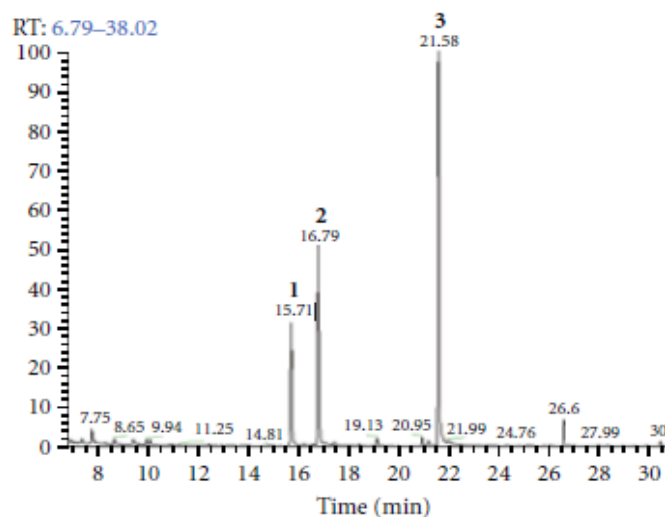


شکل ۲: نمودار رگرسیون رابطه بین غلظت و درصد بازدارندگی اسانس گیاهان دارویی به ازای افزایش هر واحد غلظت اسانس تغییرات زیادی در درصد بازدارندگی رشد قارچ پنی سیلیوم ایجاد می‌نماید.*

جدول ۲: معرفی مهم‌ترین مواد موثره اسانس گیاه دارویی آویشن

ردیف	ترکیبات	زمان بازداری (RT)	درصد
۱	Solvent	۶/۸	-
۲	α -Pinene	۷/۸	۱/۹
۳	ρ -Cymen	۸/۷	۰/۶
۴	Limonene	۹/۹	۰/۶
۵	γ -Terpinene	۱۰/۱	۱/۱
۶	Linalool	۱۱/۳	۰/۲
۷	Camphor	۱۴/۸	۰/۱

۸	<i>endo</i> -Borneol	۱۵/۷	۱۴/۳
۹	4-Terpineol	۱۶/۲	۰/۷
۱۰	α -Terpineol	۱۶/۸	۲۲/۹
۱۱	Carvacrol methyl ether	۱۹/۱	۳/۱
۱۲	Thymol	۲۱/۰	۰/۹
۱۳	Carvacrol	۲۱/۶	۴۵/۵
۱۴	Geranyl acetate	۲۴/۸	۰/۳
۱۵	Caryophyllene	۲۶/۶	۳/۲
۱۶	Unknown	۳۰/۸	۰/۸
۱۷	Caryophyllene oxide	۳۳/۲	۲/۹
۱۸	Germacrene-D	۳۵/۳	۱/۸
۱۹	Unknown	۳۸/۰	۰/۱
مجموع			۹۹/۲

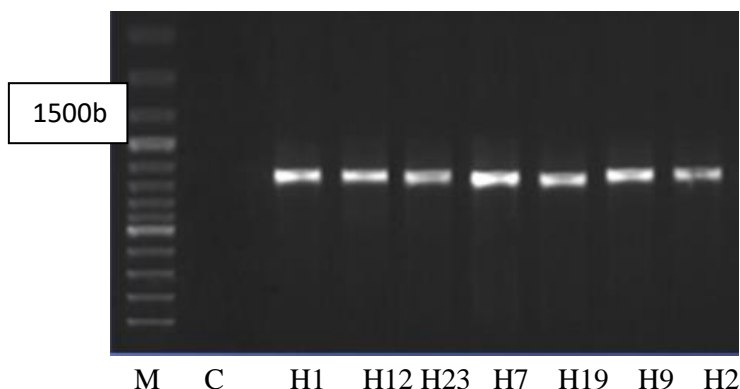


شکل ۳: نمودار کروماتوگرام اسانس آویشن، پیک (۱): *endo*-Borneol (۱۴/۳٪)، پیک (۲): α -Terpineol (۲۲/۹٪)، پیک (۳): Carvacrol (۴۵/۵٪)

جدول ۳: بررسی تاثیر سه باکتری آنتاگونیست جداسازی شده از پرتقال بر روی ممانعت رشدی قارچ پنی سیلیوم

گروه	میانگین هاله ممانعت رشدی (میلی متر)	باکتری
c	۱۹/۶۷	<i>Pseudomonas</i>
b	۲۲/۳۳	<i>Streptomyces</i>
a	۲۴/۰۰	<i>Bacillus</i>

* داده‌های جدول بر اساس چهار تکرار بوده و وجود حروف نامشابه بیانگر اختلاف معناداری بین تیمارها است.



شکل ۴: الگوی قطعه DNA ۱۵۰۰ حاصل از تکثیر PCR به اندازه ۱۵۰۰ جفت باز روی ژل آگارز ۰/۸٪، ایزوله ۱۵۰۰ جفت باز تشکیل داد.

References

1. Abraham, A., Laing, M. and Bower, J. 2010. Isolation and in vivo screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit. *Biological Control*, 53: 32–38.
2. Alexa, E., Sumalan, R.M., Danciu, C., Obistoiu, D., Negrea, M., Poiana, M.A., Rus, C., Radulov, I., Pop G. and Dehelean C. 2018. Synergistic antifungal, allelopathic and antiproliferative potential of *Salvia officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. Essential oils. *Molecules*, 23(185):1-15.
3. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: 446-475.
4. Bandalan, M.B. and Lauzon, R.D. 2018. Inhibitory effect of *Garlic* L. against bread mold and its influence on the quality of Yeast-Leavened Bread. *Food Engineering*, 4(4): 256-262.
5. Boubaker, H., Saadi, B., Boudyach, E.H. and Benaoumar, A.A. 2009. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Imazalil and Thiabendazole in Morocco. *Plant Pathology*, 8(4): 152-158.
6. Bouchra C., Achouri M., Idrissi Hassani L.M. and Hmamouchi M. 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan *Labiatae* against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. *Ethnopharmacology*, 89: 165–169.
7. Brenner-Don, J., Krieg Noel, R. and Staley James, T. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Springer US., pp. 1136.
8. Charles, A., Onyeani, S.O., Osunlaja, O.O. and Oworu, A.O. 2012. Evaluation of effect of aqueous plant extract in the control of storage fungi, *Sciences & Technology*, 1(6): 72-82.
9. Cirvilleri, G., Bonaccorsi, A., Scuderi, G. and Scortichini, M. 2005. Potential biological control activity and genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strains. *Phytopathology*, 153: 654-666.
10. Gholchinno, S., Pouzeshimiyab, B. and Nematollahi, S. 2018. Antifungal effects of some herbal extracts on *Penicillium* mould of citrus in laboratory conditions. *Agroecology*, 14(2):1-7.
11. Ibtisam Badawy, F.M., Nashwa Sallam, M.A., Ibrahim, A.R. and Asran, M.R. 2011. Efficacy of some essential oils on controlling green mold of orange and their effects on postharvest quality parameters. *Plant Pathology*, 10: 168-174.
12. John, G.H., Noel, R.K., Peter, H., James, T.S. and Stanley, T.W. 1997. *Bergey's manual of determinative bacteriology*, Moscow: Mir Publishers 2, 9th Ed., (In Russian).
13. Joo, M., Hur, S., Han, Y. and Kim, J. 2007. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis*

- strains from the traditional Korean soybean-fermented food, Chungkookjang. *Applied Biology & Biotechnology*, 50 (4): 202-210
14. Karimi, Z., Rahemi, M., Karimi Z. and Rahemi M. 2008. Comparison of essential oils of clove, thyme and imazalil fungicide on blue mold (*Penicillium italicum* Wehmer) of citrus fruits in storage. *Journal of Water and Soil Science*, 12(45): 231-237
 15. Kinay, P., Mansour, M.F., Mlikota, F., Margosan, D.A. and Smilanick, J.L. 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. *Crop Protection*, 26: 647-656.
 16. Kutawa, A.B., Danladi, M.D. and Haruna, A. 2018. Antifungal activity of garlic (*Allium sativum*) extract on some selected fungi. *Medicinal Herbs and Ethnomedicine*, 4:12-14.
 17. Marpudi, S.L., Abirami, L.S.S., Pushkala, R. and Srividya, N. 2011. Enhancement of storage life and quality maintenance of papaya fruits using aloe vera based antimicrobial coating. *Indian Journal of Biotechnology*, 10: 83-89.
 18. Nagorska, K., Bikowski, M. and Obuchowski, M. 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. *Acta Biochimica Polonica*, 54: 495-508.
 19. Obagwu, J. and Korsten, L. 2003. Integrated control of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. *Postharvest Biology and Technology*, 28: 187-194.
 20. Pazira A. 2017. Antifungal Effect of *Thymus Vulgaris* Essence on the separated fungal from Koi Fish's Skin (*Cyprinus Carpio* Var. Koi), in vitro. *Aquaculture development journal*, 11 (2):13-22.
 21. Sharma, R.R., Singh, D. and Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological Control*, 50: 205-221.
 22. Swamy, M.K. and Sinniah, U.R. 2015. A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth. An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. *Molecules*, 20(5): 8521-8547.
 23. Timmer, L.W., Garnsey, S.M. and Graham, J.H. 2000. Compendium of postharvest diseases, *American Phytopathological Society*, St. Paul Minnesota, pp.92.
 24. Udo, S.E., Madunagu, B.E. and Isemin, C.D. 2001. Inhibition of growth and sporulation of fungal pathogens on sweet potato and yam by garlic extract, *Nigeria Journal of Botany*, 14: 35-39.
 25. Valero, D. and Serrano, M. 2010. Postharvest biology and technology for preserving fruit quality, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, pp. 288.
 26. Varga, E., Bardocz, A., Belák, A., Maráz, A., Boros, B., Felinger, A., Böszörményi, A. and Horváth, G. 2015. Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different thymus extracts. *Farmacia*, 63(3): 357-361.
 27. Zamani, M., Tehrani, A.S., Ahmadzadeh, M., Hosseiniaveh, V. and Mostofy, Y. 2009. Control of *Penicillium digitatum* on orange fruit combing *Pantoea agglomerans* with hot sodium bicarbonate dipping. *Plant Pathology*, 91: 437-442.

Evaluation and comparison of the antifungal effect of essential oil of four medicinal plants and molecular identification antagonistic bacteria against fungi decay cause of orange post-harvest by *Penicillium digitatum*

Hadian, Sh.¹, Hasanzadeh, N.^{2*}, Aghajani, M.A.³, Pordeli, H.R.⁴, Cirvilleri, G.⁵

¹Ph.D. Student., Dept. of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industrial, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

²Associate professor, Dept. of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industrial, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

³Associate Professor, Dept. of Plant Protection, Agricultural and Natural Resources Research Center of Golestan Province, Gorgan, Iran

⁴Assistant Professor, Dept. of Microbiology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

⁵Professor, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie, Sez. Patologia Vegetale Università degli Studi di Catania, Catania, Italy

Received: 2019-12-15 ; Accepted: 2019-12-2

Abstract

Citrus green mold, *Penicillium digitatum* is one of the most important postharvest diseases. Continuous application of chemical pesticides has serious long term effects on human health and environmental pollution that may result in emergence of resistance in pathogenic strains. In this study, antifungal activity of different concentrations (100, 200, 300, 400ppm) of four medicine plants essences including *Thymus vulgaris*, *Cuminum cyminum*, *Allium sativum* and *Aloe vera* collected from Ghorogh area of Golestan province was evaluated. Essences were prepared by the steam distillation water using Clevenger apparatus. The main constituents' essences having the most antagonistic activity were analyzed by GC / MS. Antagonistic activity of bacteria isolated from orange epithelium including *Bacillus*, *Pseudomonas* sp., and *Streptomyces* sp. against *Penicillium digitatum* was also investigated in a completely randomized factorial model. The maximum percent inhibition (99.95%) was observed by the thyme plant essence at 400 ppm concentration. Regression analysis of the effects of essences showed that by increasing the essences concentration, its inhibitory effect on fungi increased. Based on the results, thyme essence with having the important constituents of essences (carvacrol - 45.5%), (alpha-terpineol - 22.9%) and (endo - borneol 14.3%) had the highest inhibitory effect (22.3 mmol) against penicillium. Among 23 bacterial isolates, one of them, H7, had the highest inhibitory effect on penicillium. Using PCR amplification and DNA sequencing of 16S rRNA gene, it was identified as *Bacillus cereus*. Thus, thyme essence and *Bacillus cereus* (H7) are an appropriate substitutions to chemical control of orange postharvest diseases caused by *Penicillium digitatum*.

Keywords: Citrus green mold, *Penicillium digitatum*, Bacterial antagonists, *Thymus vulgaris*, *Bacillus cereuse*

*Corresponding author; hasanzadehr@yahoo.com