Archive of SID

بررسی اثر چند اسانس گیاهی در کنترل بیماری کپک خاکستری سیب در اثر *Botrytis cinerea*

سمیرا پیغامی آشنایی[۱]، محسن فرزانه[۲]، جواد هادیان[۳]، عباس شریفی تهرانی[۴]، منصور قربانپور[۵]

چکیده

در این بررسی فعالیت ضد قارچی اسانس‌های چند گونه گیاهی شامل میخک هندی، رازیانه، زیره سبز و نعناع فلفلی علیه کپک خاکستری سیب مورد مطالعه قرار گرفت. اسانس‌های میخک هندی و رازیانه فعالیت قارچ‌کشی قابل ملاحظه‌ای را علیه *Botrytis cinerea* روی محیط کشت PDA نشان دادند. نتایج به‌دست آمده از بررسی‌های آزمایشگاهی نشان داد که بالا رفتن غلظت اسانس‌های گیاهی، فعالیت ضد قارچی آن‌ها را بر علیه *B. cinerea* افزایش می‌دهد. همچنین قابلیت بیوکنترل دو اسانس میخک هندی و رازیانه با غلظت‌های صفر، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر بر روی میوه‌های آلوده در شرایط تاریکی و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد مورد مطالعه قرار گرفت. پس از ۱۰ روز نتایج نشان داد که اسانس رازیانه در هر دو غلظت به‌کار رفته در کنترل بیماری کپک خاکستری سیب، در مقایسه با اسانس میخک هندی موثرتر بوده و میزان بیماری تا ۱۵/۵ درصد در مقایسه با شاهد آلوده (۱۰۰ درصد) کاهش یافته است. پس از گذشت ۲۰ روز، قابلیت بیوکنترل هر دو اسانس میخک هندی و رازیانه در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر در مقایسه با سایر تیمارها موثرتر بوده و میزان بیماری به‌ترتیب تا ۴۱/۶ و ۵۰/۸ درصد در مقایسه با شاهد آلوده (۱۰۰ درصد) کاهش یافت. سم تیابندازول در مهار کپک خاکستری سیب در مقایسه با اسانس‌های میخک هندی و رازیانه موثرتر واقع شد.

واژه‌های کلیدی: اسانس‌های گیاهی، میخک هندی، رازیانه، قابلیت بیوکنترل و *Botrytis cinerea*

۱. دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۲. دانشجوی دکتری در رشته بیماری شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۳. دانشجوی دکتری در رشته باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۴. استاد، گروه گیاه پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران
۵. دانشجوی دکتری در رشته زراعت و اصلاح نباتات، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری‌های پس از برداشت سالانه خسارات فراوانی به تولیدکنندگان میوه وارد می‌کند و مقادیر قابل توجهی از این محصولات در اثر فساد ناشی از این آلودگی‌ها غیر قابل مصرف می‌شوند. طی سال‌های گذشته سموم شیمیایی متعددی مانند بنزیمیدازول، ایمازلیل، ترکیبات گوگردی آلی و معدنی و مواد اکسید کننده جهت کنترل این بیماری‌ها معرفی شده‌اند. اما در اکثر موارد به علت مشکلات زیست‌محیطی، ایجاد سمیت برای انسان، ایجاد نژادهای مقاوم و در برخی موارد هزینه‌های بالا مصرف این‌گونه ترکیبات توصیه نمی‌شود (راحمی، ۱۳۸۲).

بیماری کپک خاکستری سیب ناشی از قارچ *Botrytis cinerea* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های پس از برداشت می‌باشد، که سالیانه خسارت‌های اقتصادی فراوانی وارد می‌کند. استفاده از اسانس‌های گیاهی در کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه به‌عنوان روشی جدید در چند سال اخیر مطرح شده است. این ترکیبات نه تنها اثرات جانبی نداشته، بلکه به علت خواص آنتی-اکسیدانتی، کیفیت و طول دوره انبارداری میوه‌ها را افزایش می‌دهند (آنتونی و همکاران، ۲۰۰۳ و پلازا و همکاران، ۲۰۰۴). در واقع شناسایی ترکیبات فعال بیولوژیک که بتوانند در مقیاس تجاری به‌عنوان سموم بیولوژیک برای کنترل بیماری‌های گیاهی خصوصاً بیماری‌های پس از برداشت مورد استفاده قرار گیرند بسیار ارزشمند خواهد بود و ما را قادر می‌سازد که محصولی ارگانیک و سازگار با محیط زیست تولید نموده و بدین وسیله گامی بزرگ در سلامت و ایمنی محصولات غذایی، افزایش صرفه‌ی اقتصادی و خود کفایی برداشته و در صادرات محصولات باغی به موفقیتی بزرگ دست یابیم. گیاهان معطر متعلق به خانواده‌های نعناعیان و چتریان غنی از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانتی هستند (آراس و یوسای، ۲۰۰۱ و کلادیس و همکاران ۲۰۰۴).

پژوهش‌ها نشان داده است که ترکیبات ضد میکروبی حاصل از گیاهان آویشن (*Thymus capitatus*) و مرزنگوش(*Origanum marjorana*) در غلظت Mg/ml ۳۰۰-۸۵ باعث کنترل قارچ *B. cinerea* شده است (دفررا و همکاران، ۲۰۰۲). بوشرا و همکاران (۲۰۰۳) ثابت کردند که *Thymus glandulosus* با غلظت ppm ۱۰۰، در شرایط آزمایشگاه به میزان ۱۰۰ درصد مانع از رشد میسلیوم های *B. cinerea* شده‌اند. هم‌چنین اسانس به‌دست آمده از گل داوودی (*Chrysanthemum leucanthemum*) با غلظت ppm۱۵۰ دارای خاصیت آنتاگونیستی علیه *B. cinerea* بوده است (چبلی و همکاران، ۲۰۰۴). ازان نیز در سال ۲۰۰۳ خاصیت آنتاگونیستی برخی از اسانس‌های گیاهی مانند مریم‌گلی، برگ‌بو، شوید، زیره سبز، رازیانه و آویشن را در کنترل *B. cinerea* به اثبات رساند (ازان، ۲۰۰۳).

هدف از این پژوهش بررسی پتانسیل اسانس‌های حاصل از برخی گونه‌های گیاهی از جمله رازیانه و میخک هندی در کنترل قارچ *B. cinerea* عامل کپک خاکستری سیب می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و استخراج اسانس

مواد گیاهی گونه‌های مورد آزمایش شامل بذور زیره سبز (*Cuminum cyminum*)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و پیکره رویشی نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) بودند، که از مزرعه پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی واقع در منطقه اوین تهران تهیه شدند. هم‌چنین گل‌های میخک هندی (*Syzygium aromaticum*) که از عطاری واقع در تهران تهیه گردید. گیاهان جمع آوری شده در دمای اتاق وشرایط سایه خشک گردید و پس از حذف مواد زائد، هر یک از نمونه‌ها به‌وسیله آسیاب خرد شده و سپس اسانس آن‌ها به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر (Clevenger apparatus) به مدت ۳ ساعت استخراج گردید. استخراج اسانس برای هر نمونه در سه تکرار و برای هر تکرار ۵۰ گرم نمونه گیاهی استفاده شد. اسانس به‌دست آمده به‌وسیله سولفات سدیم خشک، آب‌گیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون یخچال تا زمان آنالیز و آزمون

www.SID.ir

Archive of SID

بیولوژیک نگه‌داری شد. اسانس‌های بدست آمده از نمونه‌های گیاهی با دستگاه‌های گازکروماتوگرافی (GC) و گازکروماتوگرافی همراه با طیف سنجی جرمی (GC-MS) مورد شناسایی قرارگرفتند. به‌طوری‌که در ابتدا اسانس‌ها به دستگاه GC تزریق شده و پس از یافتن برنامه‌ریزی مناسب حرارتی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس و تعیین درصد و زمان بازداری (Retention time) هر ترکیب، اسانس‌ها به دستگاه GC-MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها تعیین گردید. شناسایی ترکیب‌ها بر اساس شاخص بازداری (Retention index) و مقایسه طیف جرمی آن‌ها با ترکیب‌های پیشنهادی به‌وسیله سازنده دستگاه انجام گرفت. درصد هر ترکیب با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC با روش نرمال کردن سطح منحنی و بدون محاسبه عامل تصحیح صورت گرفت (جانینگز و شیبا موتو، ۱۹۸۰ و آدامس، ۱۹۹۵).

تهیه بیمارگر

جداسازی اولیه *Botrytis cinerea* از روی میوه‌های پوسیده سیب صورت گرفت. جهت شناسایی قارچ بیمارگر ریسه، کنیدیوفور، سلول‌های کنیدیوم‌زا، اسپور و هم‌چنین رشد و رفتار قارچ روی محیط‌های کشت مورد مطالعه قرار گرفت. بیماری‌زایی قارچ نیز بر اساس اصول کخ مورد بررسی قرار گرفت. قارچ بیمارگر در لوله‌های حاوی PDA و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

تاثیر ضد قارچی اسانس‌ها در شرایط آزمایشگاه

اثر ضدقارچی اسانس‌های استخراج شده از نعناع فلفلی، رازیانه، زیره سبز و میخک هندی روی *B. cinerea* عامل کپک خاکستری سیب به روش اختلاط اسانس با محیط کشت بررسی شد. به این منظور از اسانس‌های مورد نظر در محلول توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) امولسیون تهیه شد. هم‌چنین محلول توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) در این بررسی به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDA پس از اتوکلاو، در دمای اتاق قرار داده شد تا دمای آن‌ها به ۴۵-۴۲ درجه سانتی‌گراد تنزل یابد. غلظت های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر اسانس در لیتر محیط کشت به فلاسک های حاوی محیط PDA اضافه و به هم زده شد تا امولسیون یکنواخت به وجود آید. محیطهای حاصل بلافاصله درون ظروف پتری به قطر ۸ سانتی متری تقسیم و اجازه داده شد تا محیط جامد گردد. سپس دیسک های قارچی به قطر ۵ میلی متر از کشتهای جوان قارچ در قسمت وسط ظروف پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. پتری‌های مایه زنی در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، رشد رویشی هاله قارچ به طور روزانه و تا زمانی که سطح محیط کشت پتری‌های شاهد توسط قارچ به‌طور کامل اشغال شود اندازه‌گیری شد. در انجام این آزمایش برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. درصد بازدارندگی غلظت-های مختلف اسانس‌ها با بهره‌گیری از فرمول Abbott:

$$IP= C-T/C \times ۱۰۰$$

تعیین (IP= Inhibitory percentage: درصد بازدارندگی، C= Check: میانگین قطر هاله قارچ در تیمار شاهد و T= Treatment: میانگین قطر هاله قارچ در تیمار مورد نظر) گردید و حداقل غلظت بازدارندگی کامل (MIC= Minimum Inhibitory Concentration) اسانس‌ها در جلوگیری از رشد قارچ‌ها محاسبه شد. هم‌چنین Half Maximal Effective Concentration (EC50) (غلظتی که باعث ۵۰ درصد بازدارندگی رشد میسلیوم قارچ می‌شود) با بهره‌گیری از تجزیه پروبیت نرم افزار (SPSS V.9) محاسبه گردید. به منظور بررسی ویژگی قارچ‌کشی (Fungicide) یا قارچ ایستایی (Fungistate) اسانس، دیسک قارچی تیمارهایی که رشد قارچی در آن‌ها مشاهده نگردید بر روی محیط کشت PDA واکشت شد و رشد یا عدم رشد قارچ بر روی محیط کشت پس از یک هفته بررسی گردید.

www.SID.ir

Archive of SID

قابلیت بیوکنترلی اسانس ها روی میوه سیب تلقیح شده

برای بررسی قابلیت بیوکنترلی اسانس های گیاهی در روی میوه سیب، از دو اسانس میخک هندی و رازیانه (با دو غلظت ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر) که نتایج قابل قبول تری را در شرایط آزمایشگاه نشان دادند، استفاده شد.

تلقیح میوه سیب

برای این منظور از میوه‌های سیب زرد (Golden delicious) که همگی سالم و فاقد هرگونه تیمار شیمیایی و عارضه فیزیولوژیک و هم‌چنین از نظر اندازه یک‌سان بودند، استفاده گردید. پس از ضدعفونی سطحی میوه‌ها به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد، روی هر میوه در شرایط سترون، زخمی به قطر ۱ میلی‌متر و عمق ۲ میلی‌متر ایجاد گردید. به محل زخم ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور *B. cinerea* به غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی لیتر تلقیح شد. پس از گذشت یک ساعت ۲۵ میکرولیتر از دو اسانس میخک هندی و رازیانه با دو غلظت ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر، در آب مقطر استریل تهیه شدند و با استفاده از سمپلر به میزا ن ۲۵ میکرولیتر به محل زخم‌ها تزریق شده است. همچنین برای تیمار سم نیز میوه‌های تلقیح شده با بیمارگر با ۲۵ میکرولیتر از سم تیابندازول با غلظت ۱/۵ در هزار تزریق شدند. در تیمار های شاهد سالم از آب مقطر سترون و هم‌چنین اسانس‌های میخک هندی و رازیانه در دو غلظت ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر استفاده شد و تیمار شاهد آلوده با سوسپانسیون اسپور *B. cinerea* به غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در هر میلی لیتر تلقیح شد. در این بررسی برای هر تیمار ۶ تکرار در نظر گرفته شد. تیمارها در اتاق کشت با دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد، در شرایط تاریکی و رطوبت نسبی ۵±۸۰ درصد نگه‌داری شدند. پس از گذشت ۱۰ و ۲۰ روز، در شرایط سترون مساحت لکه های تشکیل شده در روی میوه‌های سیب اندازه‌گیری و نتایج بر اساس درصد میزان بیماری در تیمارها ثبت گردید. این آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

به علت وجود عدد صفر در بین داده ها از تبدیل $\sqrt{X+0.5}$ استفاده شد. تجزیه و تحلیل داده های آزمایش با استفاده از نرم افزار آماری MSTATC انجام گردید. میانگین داده ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح P≤۰/۰۱ مقایسه شد.

نتایج

ترکیبات عمده اسانس های مورد آزمایش

گاما ترپینن (۲۹/۲٪)، بتا پینون (۲۰/۱٪)، کومین آلدهید (۱۴/۱٪)، پی منتا ۱و۴- دین ۷- آل (۱۳/۹٪) و پی منتا ۱و۳- دین ۷- آل (۱۰/۲٪) ترکیب‌های اصلی شناسایی شده در اسانس گونه *C. cyminum* می‌باشند. ترکیب‌های اصلی در اسانس *F. vulgare* شامل آنتول ترانس(۷۵/۸٪)، فنچون (۷/۲٪)، آلفا- فلاندرن (۴/۶٪) و آلفا-توجون (۴/۳) می‌باشند (جدول۱). منتانول (۳۶/۲٪) و منتون (۳۲/۴٪) ترکیب‌های اصلی شناسایی شده در اسانس گونه *M. piperita* می‌باشند. ترکیب‌های اصلی در اسانس میخک هندی (*S. aromaticum*) شامل اوجنول (۸۱٪)، اوجنیل استات (۷/۴٪) و بتاکاریوفیلن (۳/۶٪) می‌باشند (جدول ۲).

بررسی اثرضد قارچی اسانس ها در شرایط آزمایشگاه

به‌طوری‌که سه اسانس رازیانه، میخک هندی و زیره سبز بیش‌ترین درصد بازدارندگی را در جلوگیری از رشد قارچ *B. cinerea* در این غلظت نشان دادند. هم‌چنین اسانس رازیانه در غلظت ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر بیش‌ترین درصد بازدارندگی را نسبت به سایر تیمارها نشان داده است. بررسی اسانس زیره سبز در کنترل قارچ *B. cinerea*نتایج نشان داد که قابلیت بیوکنترلی این اسانس در یک غلظت معینی افزایش یافته است. به‌طوری‌که در غلظت ۲۵۰ میکرولیتر در لیتر درصد بازدارندگی ۶/۳۲ بوده است، در حالی‌که در دو غلظت ۵۰۰ و ۷۵۰ درصد بازدارندگی تا میزان ۶۱ درصد افزایش یافته است (جدول ۳). به عبارت دیگر با افزایش غلظت اسانس زیره سبز از ۲۵۰ به ۵۰۰ میکرولیتر فعالیت ضد قارچی آن افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا کرد، اما از غلظت ۵۰۰ به ۷۵۰ میکرولیتر خاصیت ضد قارچی افزایش ناچیزی داشت.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: نوع و درصد ترکیب‌های عمده (بالای ۳ درصد) شناسایی شده در اسانس *Foeniculum vulgare* و *Cuminum cyminum*

ترکیب	شاخص بازداری* (RI)	*Cuminum cyminum*	*Foeniculum vulgare*
α-thujone	۹۳۵	۰/۴	۴/۳
β-pinene	۹۷۵	۲۰/۱	۰/۴
α- phellandrene	۱۰۰۰	۰/۵	۴/۶
p-cymene	۱۰۱۶	۵/۸	۰/۳
ϒ-terpinene	۱۰۵۱	۲۹/۲	۰/۵
fenchone	۱۰۷۱	–	۷/۲
estragol	۱۲۲۱	–	۳/۰
cumin aldehyde	۱۲۶۶	۱۴/۱	–
P-mentha-1,3-dien-7-al	۱۲۶۸	۱۰/۲	–
P-mentha-1,4-dien-7-al	۱۲۷۳	۱۳/۹	–
Anethole trans	۱۲۷۹	–	۷۵/۸

*: اجسام به ترتیب خروج از ستون غیر قطبی DB-1 و بر اساس شاخص بازداری لیست گردیده‌اند.

جدول ۲: نوع و درصد ترکیب های عمده شناسایی شده در اسانس *Mentha piperita* و *Syzygium aromaticum*

ترکیب	شاخص بازداری* (RI)	*Mentha piperita*	*Syzygium aromaticum*
1,8-Cineol	۱۰۲۸	۹	۰/۰۱
linalool	۱۰۸۹	۰/۴	۰/۰۳
menthone	۱۱۵۲	۳۲/۴	–
isoimenthone	۱۱۵۸	۴/۱	–
menthofuran	۱۱۶۲	۳/۵	–
4-Terpineol	۱۱۶۷	–	–
α-Terpineol	۱۱۷۸	–	–
menthol	۱۱۸۰	۳۶/۲	–
pulegone	۱۲۲۶	–	–
Lavandulyl acetate	۱۲۷۲	–	–
neryl accate	۱۳۴۲	–	–
Eugenol	۱۳۶۱	–	۸۱
β-Caryophyllene	۱۴۱۵	–	۳/۶
Eugenyl acetate	۱۵۲۲	–	۷/۴

*: اجسام به ترتیب خروج از ستون غیر قطبی DB-1 و بر اساس شاخص بازداری لیست گردیده‌اند.

www.SID.ir

Archive of SID

این مطلب حاکی از آن است که حساسیت گونه‌های قارچی بسته به نوع اسانس و غلظت‌های مختلف آن متفاوت است و تفاوت در قابلیت بیوکنترلی اسانس‌های گیاهی به اجزاء تشکیل دهنده آن‌ها بستگی دارد. بدین-صورت که یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به‌صورت تشدیدکنندگی با سایر ترکیب‌ها قابلیت بیوکنترلی اسانس را باعث شود. بنابراین اثرات ضد قارچی اسانس زیره سبز ضمن اینکه تحت تاثیر ترکیب غالب اسانس می‌باشد، به نظر می‌رسد که اثرات تشدید کنندگی بین تمام ترکیب‌های تشکیل دهنده آن، فاکتور عمده و تعیین کننده‌ای در فعالیت ضد قارچی بالای این اسانس باشد. اسانس نعناع فلفلی در دو غلظت ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر به مراتب اثر بازدارندگی بیش‌تری نسبت به دو غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر داشته است. نتایج به‌دست آمده در ارتباط با این اسانس نیز، همان‌طوری‌که در بالا به آن اشاره شد اهمیت نوع اسانس گیاهی و درصد ترکیبات تشکیل دهنده آن و هم‌چنین غلظت به‌کار برده شده را در کنترل قارچ *B.cinerea* نشان می‌دهد.

حداقل غلظت بازدارندگی کامل اسانس‌های میخک هندی و زیره سبز بر روی *B. Cinerea*، ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر و در اسانس حاصل از رازیانه ۷۵۰ میکرولیتر در لیتر بوده است. در حالی‌که در مورد اسانس نعناع فلفلی حداقل غلظت بازدارندگی کامل، بیشتر از ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر بوده است. بدین‌ترتیب با بالابردن غلظت اسانس، فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی بر علیه *B. cinerea* یافته است. هم‌چنین همان-طوری که در جدول شماره ۴ مشخص شده است اسانس‌های رازیانه و میخک هندی کم‌ترین EC50 را بر روی قارچ عامل کپک خاکستری سیب نشان داده‌اند. در حالی‌که اسانس نعناع فلفلی بیش‌ترین EC50 را در مقایسه با سه اسانس دیگر در جلوگیری از رشد *B. cinerea* داشته است (جدول ۴).

جدول ۳: درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس‌های چهار گونه گیاهی در جلوگیری از رشد قارچ *B. cinerea* عامل کپک خاکستری سیب روی محیط کشت PDA

غلظت (میکرولیتر در لیتر)	اسانس			
	رازیانه (b)	زیره سبز (c)	میخک هندی (a)	نعناع فلفلی (d)
۱۲۵ e	۱۷/۵۱± ۰/۰۱	-	۳۱/۱۶ ± ۰/۰۲	۸/۹۵ ± ۰/۰۳
۲۵۰d	۳۳/۸۳ ± ۰/۰۳	۶/۳۲ ± ۰/۰۱	۶۶/۸۱± ۰/۰۰۶	۲۰/۹۵ ± ۰/۰۱
۵۰۰c	۸۳/۸۲ ± ۰	۶۰/۵۵ ± ۰/۰۰۷	۶۸/۳۸ ± ۰/۰۳	۳۸/۳۹ ± ۰
۷۵۰b	۱۰۰± ۰	۶۱/۳ ± ۰	۸۵/۵۷ ± ۰	۶۳/۷± ۰/۰۳
۱۰۰۰a	۱۰۰± ۰	۱۰۰± ۰	۱۰۰± ۰	۶۹/۸۶ ± ۰

اعداد درصد بازدارندگی در هر تیمار و میانگین ۴ تکرار(**SE** ± میانگین ۴ تکرار). حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح (P≤۰/۰۱) می‌باشد.

جدول ۴: حداقل غلظت بازدارندگی کامل(MIC) و EC50 اسانس‌های چهار گونه گیاهی در جلوگیری از رشد قارچ *B. cinerea* عامل کپک خاکستری سیب در محیط کشت PDA

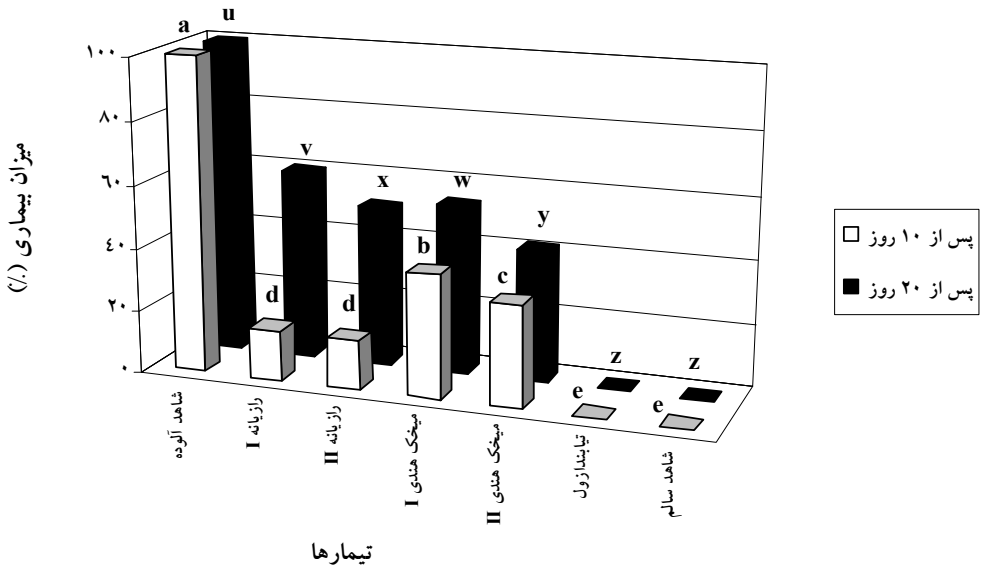
اسانس	MIC	$EC50^x$
رازیانه	۷۵۰	۳۱۸/۵۴۶ (۲۹۲/۵۶۷-۳۴۶/۴۶۶)
زیره سبز	۱۰۰۰	۵۰۱/۳ (۴۳۷/۴۳۲-۵۷۲/۸۳۱)
میخک هندی	۱۰۰۰	۳۱۱/۲۴۳(۲/۰۰۷-۵۷۸/۹۲۴)
نعناع فلفلی	>۱۰۰۰	۶۴۷/۹۳ (۵۴۰/۹۴-۸۶۶/۷۳۱)

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی اثر قابلیت بیوکنترلی اسانس‌ها روی میوه سیب تلقیح شده

پس از گذشت ۱۰ روز، نتایج نشان داد که دو اسانس میخک هندی و رازیانه در هر دو غلظت به‌کار برده شده اختلاف معنی‌داری را با شاهد آلوده دارند. هم‌چنین بین فعالیت ضد قارچی دو اسانس میخک هندی و رازیانه نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. عملکرد هر دو غلظت به‌کار برده شده در اسانس رازیانه یک‌سان بوده و میزان بیماری از ۱۰۰ درصد به ۱۵/۵ درصد کاهش یافته است. در حالی‌که عملکرد هر دو غلظت به‌کار برده شده در اسانس میخک هندی یک‌سان نبوده است. این اسانس در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر نتیجه قابل قبول‌تری را نشان داد و میزان بیماری را از ۱۰۰ درصد به ۳۲/۳ درصد کاهش داد. به‌طور کلی پس از گذشت ۱۰ روز، اسانس رازیانه در هر دو غلظت نتایج قابل قبول‌تری را در مقایسه با اسانس میخک هندی نشان داد. هم‌چنین سم تیابندازول نیز در مقایسه با هر دو اسانس موثرتر بوده و با شاهد سالم تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۱). پس از گذشت ۲۰ روز، نتایج نشان داد که دو اسانس میخک هندی و رازیانه در هر دو غلظت به‌کار برده شده اختلاف معنی‌داری را با شاهد آلوده دارند. هم‌چنین بین فعالیت ضد قارچی دو اسانس میخک هندی و رازیانه و هم‌چنین بین دو غلظت به‌کار برده شده اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. هر دو اسانس میخک هندی و رازیانه در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر موثرتر بوده و میزان بیماری از ۱۰۰ درصد به ترتیب به میزان ۴۱/۶ و ۵۰/۸ درصد کاهش یافته است. به‌طور کلی پس از گذشت ۲۰ روز نتایج نشان داد که بر خلاف ۱۰ روز اول، اسانس میخک هندی در هر دو غلظت نتایج قابل قبول‌تری را در مقایسه با اسانس رازیانه داشته است. هم‌چنین سم تیابندازول نیز مانند ۱۰ روز اول، در مقایسه با هر دو اسانس موثرتر بوده و با شاهد سالم تفاوت معنی‌داری را نشان نداد (شکل ۱).



شکل ۱: میزان بیماری در میوه‌های سیب تلقیح شده با قارچ *B. cinerea*، پس از تلقیح با دو اسانس رازیانه و میخک هندی در دو غلظت ۷۵۰ (I) و ۱۰۰۰ (II) میکرولیتر در لیتر، پس از گذشت ۱۰ و ۲۰ روز. هر یک از ستون‌ها با حروف آماری متفاوت، نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد. گروه‌بندی تیمارها در هر دوره ۱۰ و ۲۰ روزه به صورت مجزا و بر اساس آزمون دانکن در سطح $P\leq ۰/۰۱$ انجام شده است.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

استفاده از اسانس‌های گیاهی در کنترل بیماری‌های پس از برداشت میوه و سبزی به عنوان روشی بیولوژیک در سال‌های اخیر مطرح گردیده است و به عنوان روشی موثر و در عین حال ایمن توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. استفاده از اسانس‌های گیاهی می‌توانند ضمن تامین سلامت و ایمنی محصول باعث کاهش ضایعات میوه شدند. حساسیت گونه‌های قارچی بسته به نوع اسانس و غلظت‌های مختلف آن متفاوت است .تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی به ترکیب آن‌ها بستگی دارد. یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت تشدیدکنندگی با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضد قارچی اسانس را باعث شود (پلوتو و همکاران، ۲۰۰۳).

در این پژوهش نشان داده شد که نوع اسانس و غلظت‌های مختلف آن در میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ و خاصیت قارچ‌کشی نقش کلیدی و مهم دارد. مسکوکی و مرتضوی تاثیر اسانس‌های آویشن و زنیان را در کنترل رشد قارچ *Aspergillus parasiticus* روی گلابی موثر دانستند و هم‌چنین نشان دادند که اسانس‌های مریم گلی و درمنه کوهی روی چهار قارچ بیماری‌زا روی میوه‌های پس از برداشت از جمله *Botrytis cinerea* تاثیر قابل قبولی ندارند (مسکوکی و مرتضوی، ۱۳۸۳). در صورتی‌که پژوهش‌های فرزانه و همکاران و هم‌چنین هادیان و همکاران بر روی اسانس‌های گیاهان درمنه شرقی، درمنه دشتی، درمنه خراسانی و درمنه کوهی نشان داد که این اسانس‌ها از رشد برخی قارچ های خاک‌زی در شرایط آزمایشگاه جلوگیری می‌کنند (فرزانه و همکاران، ۲۰۰۶، فرزانه و همکاران، ۲۰۰۷ و هادیان و همکاران، ۲۰۰۷).

در پژوهش حاضر اسانس‌های رازیانه و میخک هندی نسبت به سایر اسانس‌ها بر روی قارچ *B. cinerea* در شرایط آزمایشگاه خاصیت ضد قارچی قابل قبول‌تری را نشان دادند. هم‌چنین این دو اسانس نتایج چشم‌گیری را در کاهش بیماری پوسیدگی خاکستری بر روی میوه‌های سیب نشان دادند.

ترکیب‌های اصلی در اسانس میخک هندی (*S. aromaticum*) شامل اوجنول (۹۰-۸۰٪)، اوجنیل استات (۱۵٪) و بتاکاریوفیلن (۱۲-۵٪) می‌باشند (هاکی و همکاران، ۲۰۰۷). در مورد اسانس زیره سبز نتایج ضد قارچی نشان داد که با افزایش غلظت اسانس زیره سبز از ۲۵۰ به ۵۰۰ میکرولیتر فعالیت ضد قارچی آن افزایش قابل ملاحظه‌ای پیدا کرد اما از غلظت ۵۰۰ به ۷۵۰ میکرولیتر خاصیت ضد قارچی افزایش ناچیزی داشت. این مطلب حاکی از آن است که حساسیت گونه‌های قارچی بسته به نوع اسانس و غلظت‌های مختلف آن متفاوت است و تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی به اجزاء تشکیل دهنده آن‌ها بستگی دارد به‌طوری‌که یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت تشدیدکنندگی با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضد قارچی اسانس را باعث شود تا در غلظت معینی تاثیر قابل قبولی داشته باشد. بنابراین با توجه به نتایج این پژوهش به نظر می‌رسد که اثرات ضد قارچی قابل توجه اسانس‌های رازیانه و میخک هندی ضمن اینکه تحت تاثیر ترکیب غالب اسانس می‌باشد، اما اثرات تشدید کنندگی بین تمام ترکیب‌ها فاکتور عمده تعیین کننده فعالیت ضد قارچی بالای اسانس این دو گیاه می‌باشد. هرچند اسانس رازیانه در مقایسه با میخک هندی در کنترل بیماری پس از گذشت ده روز موثرتر است، اما در ادامه آزمایش و پس از گذشت بیست روز اسانس میخک هندی فعالیت کنترل ضد قارچی و کنترل کنندگی بیشتری نشان داد که می‌توان چنین نتیجه گرفت که اسانس میخک هندی از لحاظ ماندگاری و حفظ خاصیت بیوکنترلی پایدارتر است.

سپاسگزاری

این پروژه با مساعدت و همکاری بخش بیماری شناسی گروه گیاه‌پزشکی دانشگاه تهران و پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی انجام شده است که بدین‌وسیله نگارندگان مراتب سپاس و قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

منابع

راحمی، م. ۱۳۸۲. فیزیولوژی پس از برداشت: مقدمه‌ای بر فیزیولوژی و جابه‌جایی میوه، سبزی‌ها و گیاهان زینتی. انتشارات دانشگاه شیراز. ۴۳۷ صفحه.

مسکوکی، ع. مرتضوی، س.ع. ۱۳۸۳. تاثیر اسانس‌های آویشن و زنیان در کنترل رشد قارچ *Aspergilus parasiticus* روی گلابی در سردخانه. علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی جلد ۸ شماره. ۲، صفحه ۲۱۵-۲۰۷.

Adams, R. P. 1995. Identification of Essential Oil components by gas chromatography/ mass spectroscopy. Allured Publishing. Carol stream. IL. 404p.

Anthony, S., Abeyvikrama, k. and Wilson, W. S. 2003. The effect of spraying essential oils of *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon flexuosus* and *Ocimum basilicum* on postharvest diseases and storage life of *Embul banana*. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology December, 78: 780-785.

Arras, G. and Usai, M. 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. J. Food Prot, 64: 9-1025.

Bouchra, C., Achouri, M., Idrissi-Hassani, L M. and Hmamouchi, M. 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Morcoccan Labiatea against Botrytis cinerea Pers: Fr. Journal of Ethnopharmacology, 89: 165-169.

Chebli, B., Hmamouchi, M., Achouri, M. and Idrissi-Hassani, L. M. 2004. Composition and in vitro fungitoxic activity of 19 essential oils against two post-harvest pathogens. Journal of Essential Oil Rsearch, 16: 507-511.

Couladis, M., Tzakou, O., Kujundzi, S., Sokovi, M. and Mimica-Dukic, N. 2004. Chemical analysis and antifungal activity of *Thymus striatus*. Phytother. Res, 18: 40–42.

Deferera, D. J., Zigas, B. N. and Polission, M. G. 2002. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*. Crop Protection, 22: 39-44.

Farzaneh, M., Ahmadzadeh, M., Hadian, J. and Sharifi-Tehrani, A. 2007. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soil-borne phytopathogens. Comm. Appl. Biol. Sci, Ghent University, 71/3b: 1327-1333.

Farzaneh, M., Ghorbani-Ghouzhdi, H., Ghorbani, M. and Hadian, J. 2006. Composition and antifungal activity of essential oil of *Artemisia sieberi* Bess.on soil-born phytopathogens. Pakistan J. Biol. Sci, 9: 1979-1982.

Hadian, J., Farzaneh, M., Ghorbani, M. and Mirjalili, M. H. 2007. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia khorasanica* on soil-born phytopathogens. J. Esse. Oil Res,10: 53-58

Hakki Alma, M., Ertas, M., Nits, S. and Kollamannsberger, H. 2007. Chemical composition and content of essential oil from the bud of cultivated Turkish Clove (*Syzygium aromaticum* L.). BioResource, 2: 265-269.

Jannings, W. and Shibamoto, J. 1980. Qualitative analysis of Flavour and Fragrance by capillary gas chromatography. New York, Academic Press. 375p.

Ozan, M. 2003. Antifungal effects of some Turkish spice essential oils on *Aspergillus niger* and *Botrytis cinerea* growth. Agrimedia GmbH, 8: 173-175.

Plaza, P., Torres, R., Usall, J., Lamarca, N. and Vinasa, I. 2004. Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. J. Hort. Sci. and Biotech, 79: 935-940.

Plotto, A., Roberts, D. and Roberts, R. G. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of Tomato (Lycopersicon Esculentum). Acta Horticulturae, 628 : 737-745.

www.SID.ir

Archive of SID

Evaluation of Antifungal Activity of Some Plant Essential Oils Against the Grey Mold of Apple Caused by *Botrytis cinerea*

Peighami-Ashnaei[1], S., Farzaneh[2], M., Hadian[3], J., Sharifi-Tehrani[4], A and Ghorbanpoor[5], M

Abstract

In this study, antifungal activity of some essential oils extracted from *Syzygium aromaticum, Foeniculum vulgare*, *Cuminum cyminum* and *Mentha piperita* were investigated against grey mold of apple. The essential oils of *S. aromaticum* and *F. vulgare* showed considerable antifungal activities on PDA medium against *Botrytis cinerea*. Results indicated that the increasing of dosage of the essential oils caused to the more antifungal activity against *B. cinerea in vitro* condition. Also, biocontrol potential of two essential oils of *S.aromaticum* and *F. vulgare* in two concentrations 750 and 1000 µL/L were investigated on infected fruits, at 20 ˚C and under darkness condition. After 10 days, results showed that the essential oil of *F. vulgare* in both of the concentrations was more effective than the essential oil of *S. aromaticum* against grey mold of apple and decreased the disease up to 15.5% in comparison with the check treatment (100%). After 20 days, biocontrol potential of the essential oils of *S. aromaticum* and *F. vulgare* at 1000 µL/L were more effective than the other treatments and the percentage of disease was evaluated as 41.6% and 50.8% respectively, in comparison with the check treatment (100%) . Tiabandazol was more effective against grey mold of apple as compared to the essential oils of *S.aromaticum* and *F. vulgare*.

Key words: Essential oils, *Syzygium aromaticum, Foeniculum vulgare*, Biocontrol potential and *Botrytis cinerea*

1. Graduate Student of University of Tehran
2. PhD Student of University of Tehran
3. PhD Student of University of Tehran
4. Professor of University of Tehran
5. PhD Student of University of Tehran

www.SID.ir