Archive of SID

کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۵، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۵ (۱۲-۱)

بررسی تأثیر اسانس چهار گیاه دارویی و دو گونهٔ *Trichoderma* در کنترل زیستی قارچ‌های عامل پوسیدگی میوهٔ انگور

۱. مهدی داوری*؛ ۲. رباب اعزازی
۱. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکدهٔ کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل
۲. دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاه‌پزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۰/۱۱- تاریخ تصویب: ۱۳۹۴/۱۱/۲۷)

چکیده

انگور همانند دیگر محصولات باغی به دلیل داشتن رطوبت زیاد، pH نسبی پایین و غنی بودن از مواد غذایی، در معرض حملهٔ انواع بیمارگرهای قارچی در مراحل برداشت و انبارداری قرار دارد. در این تحقیق، در آغاز اقدام به جداسازی قارچ‌های بیماری‌زای پس از برداشت انگور در منطقهٔ مشگین‌شهر شد و قارچ‌های *Botrytis cinerea* و *Cladosporium cladosporioides* به‌عنوان گونه‌های غالب شناسایی شدند. *Aspergillus tubingensis* نیز به عنوان عامل پوسیدگی و زهرابه‌زا (توکسین‌زا) روی انگور و کشمش برای این بررسی انتخاب شد. سپس به منظور ارزیابی امکان کنترل زیستی (بیولوژیک) آن‌ها، تأثیر دو گونهٔ *Trichoderma harzianum* T447 و *T. hamatum* T622 و اسانس چهار گیاه دارویی پونهٔ کوهی، نعناع خوراکی، رازیانه و بومادران در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که هر دو گونهٔ قارچ آنتاگونیست در رقابت تغذیه‌ای موفق‌تر از قارچ‌های بیمارگر هستند، ترکیبات فرّار این قارچ‌ها بیشترین تأثیر بازدارندگی را در تعامل با *C. cladosporioides* نشان دادند. غلظت ۱۰ درصد ترشحات برون یاخته‌ای جدایهٔ *T. harzianum* T447 نیز بازدارندگی بیش از ۸۵ درصد علیه قارچ‌های بیمارگر نشان داد. همچنین معلوم شد که بین گونهٔ قارچی، نوع اسانس و غلظت‌های مختلف آن در میزان بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ‌ها تفاوت معنی‌داری ($P\leq ۰/۰۱$) وجود دارد. پونهٔ کوهی و رازیانه به ترتیب به‌عنوان مؤثرترین و ضعیف‌ترین اسانس‌ها شناخته شدند. تجزیهٔ GC-MS چهار اسانس نام‌برده نیز نشان داد که به ترتیب پی‌پریتون و سیس‌پی‌پریتون اکسید، ال‌منتون، دی‌متیل-۴ (ای)۶-اکتادین-۲-ال و ترنس‌آنتول اجزای اصلی آن‌ها هستند. با توجه به بازدارندگی مناسب اسانس‌ها و قارچ‌های کنترل زیستی نام‌برده، تحقیقات تکمیلی در زمینهٔ به‌کارگیری آن‌ها برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت انگور توصیه می‌شود.

کلیدواژگان: اسانس، انگور، بیماری‌های پس از برداشت، کنترل زیستی، *Trichoderma* spp.

مقدمه

ضایعات پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها، آسیب و زیان شایان توجهی به تولیدکنندگان وارد می‌کنند، به‌طوری‌که حدود ۲۰-۲۵ درصد میوه‌ها و سبزی‌های برداشت‌شده، به‌وسیلهٔ بیمارگرها در طی فرآیندهای برداشت، حمل‌ونقل و انبارداری آسیب می‌بینند (Zhu 2006, Singh and Sharam 2007). میزان این آسیب و زیان در کشورهای درحال‌توسعه به دلیل نبود انبارهای

* تلفن: ۰۴۵۳۳۵۲۳۰۰۶
E-mail: Mdavari@uma.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مناسب و سامانهٔ حمل‌ونقل مناسب بسیار بیشتر است (Sharma *et al.* 2009). میوهٔ انگور همانند دیگر محصولات باغی به دلیل داشتن رطوبت بالا، pH پایین و غنی بودن از مواد غذایی در معرض حملهٔ انواع بیمارگرهای قارچی در مراحل برداشت و انبارداری قرار دارد. قارچ‌هایی مانند *Botrytis cinerea*، *Aspergillus* section Nigri، *Rhizopus stolonifer* و *Cladosporium* spp. از مهم‌ترین عامل‌های محدودکنندهٔ طول عمر پس از برداشت انگور و کاهش کیفیت آن هستند (Zahavi *et al.* 2000). قارچ *B. cinerea* عامل بیماری پوسیدگی خاکستری انگور و بسیاری از محصولات باغی دیگر، شایع‌ترین بیمارگر عامل پوسیدگی در بیشتر مناطق جهان است که در شرایط مناسب دمایی و رطوبتی، آسیب و زیان قابل‌توجهی وارد می‌کند (Bulit and Dubos 1988) و به دلیل توانایی رشد در دماهای پایین (نزدیک صفر یا انجماد)، مشکل جدی و اساسی در سردخانه‌ها به شمار می‌آید (Droby and Lichter 2004). گونه‌های *Aspergillus* متعلق به بخش Nigri به عنوان عامل بیماری پوسیدگی سیاه انگور گزارش شده‌اند که از گونه‌های مهم می‌توان به *A. niger*، *A. carbonarius* و *A. tubingensis* اشاره کرد (Logrieco *et al.* 2003, Varga *et al.* 2004). این گونه‌ها باعث تخریب حبه‌های انگور شده و موجب انتشار بوی نامطبوع از آن‌ها می‌شود. همچنین برخی جدایه‌های گونه‌های یادشده به دلیل تولید اکراتوکسین A روی میوهٔ انگور و فرآورده‌های آن اهمیت خاصی دارند (Chiotta *et al.* 2009). پوسیدگی کلادوسپوریومی ناشی از دو گونهٔ *Cladosporium cladosporioides* و*C. Herbarum* نیز از شایع‌ترین بیماری‌های انگور در برخی مناطق از جمله مناطق با اقلیم مدیترانه‌ای به شمار می‌آید، به‌ویژه اگر برداشت انگور به تأخیر بیفتد که باعث کاهش عملکرد و کیفیت انگور می‌شود (Briceño and Latorre 2008). قارچ‌کش‌های شیمیایی مختلفی به‌منظور کنترل بیماری‌های پس از برداشت معرفی و استفاده شده‌اند، اما افزایش نگرانی‌ها دربارهٔ تأثیر منفی آن‌ها بر سلامت انسان، آلودگی‌های زیست‌محیطی و ظهور نژادهای مقاوم بیمارگرها، استفاده از آن‌ها را با محدودیت روبه‌رو ساخته و توجه همگان را به سمت یافتن جایگزین‌های مناسب برای سموم شیمیایی معطوف کرده است (Bouchra *et al.* 2003, Droby *et al.* 2009). نتایج تحقیقات متعدد نشان می‌دهد که گیاهان، منبع عظیمی از ترکیبات فعال بیوشیمیایی هستند که خاصیت ضدقارچی آن‌ها به اثبات رسیده است (Bakkali *et al.* 2008). خاصیت ضدقارچی گیاهان دارویی متعددی مانند پونه، آویشن، مریم‌گلی، رزماری، ریحان، مرزه، نعناع، اکالیپتوس، رازیانه و میخک در تحقیقات متعددی گزارش شده است که توانایی بازدارندگی از رشد و حتی خاصیت قارچ‌کشی علیه قارچ‌های بیماری‌زای مختلف مانند *Botrytis cinerea*، *Fusarium* spp.، *Aspergillus* spp.، *Alternaria alternata*، *Rhizoctonia solani*، *Phytophthora infestans*، *Sclerotinia sclerotiorum*، *Penicillium digitatum* و *Rhizopus stolonifer* از خود نشان دادند (Daferera *et al.* 2003, Özcan *et al.* 2006, Rasooli *et al.* 2006, Soylu *et al.* 2007, Bluma and Etcheverry 2008, Farzaneh *et al* 2015). پونهٔ کوهی با نام علمی *Mentha longifolia* گیاهی معطر از خانوادهٔ نعناییان است که خواص حشره‌کشی (Khani and Asghari 2012)، ضداکسندگی (آنتی‌اکسیدانی)، ضدباکتریایی و ضدقارچی (Gulluce *et al.* 2007) آن به اثبات رسیده است. نعناع خوراکی با نام علمی *M. spicata* یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین گونه‌های نعناع در طب سنتی است که خواص ضدانگلی (Govindarajan *et al.* 2012)، ضداکسندگی (Kanatt *et al.* 2007) و ضدمیکروبی (Dhifi *et al.* 2013) دارد. رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* یکی از گیاهان دارویی با پراکنش گسترده از خانوادهٔ Apiaceae است و اسانس این گیاه خواص بیولوژیکی متعدد مانند خاصیت ضداکسندگی (Ruberto *et al.* 2000)، ضددیابتی (El-Soud *et al.* 2011)، حشره‌کشی (Lee 2004) و ضدمیکروبی (Özcan *et al.* 2006) دارد. جنس بومادران (Achillea) یکی از مهم ترین جنس‌های متعلق به تیرهٔ مرکبان (Asteraceae) است و فعالیت ضدمیکروبی و ضداکسندگی (Baris *et al.* 2006) این گیاه بررسی و اثبات شده است. خاصیت ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی به ترکیب شیمیایی مادهٔ مؤثرهٔ آن بستگی دارد، ترکیبات ضدمیکروبی اسانس‌های گیاهی به‌طور عموم ترپن‌ها هستند که ماهیت فنولی دارند و اغلب

www.SID.ir

Archive of SID

به دیواره و غشای یاخته‌ای قارچ‌ها آسیب وارد می‌کنند، البته ممکن است مکان‌های هدف دیگری هم در یاخته قارچی داشته باشند (Tabassum and Vidyasagar 2013).

راهکار دیگر برای مبارزه با بیمارگرهای گیاهی، به‌ویژه بیمارگرهای پس از برداشت، استفاده از ریز جانداران (میکروارگانیسم‌های) آنتاگونیست از جمله قارچ‌های آنتاگونیست است که می‌تواند یک جایگزین مؤثر و امیدبخش برای مبارزهٔ شیمیایی باشد (Monte 2001). گونه‌های متعلق به جنس *Trichoderma* مشهورترین و مؤثرترین جنس قارچی درزمینهٔ کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی است که بعضی از سویه (استرین)های آن به مرحلهٔ تجاری رسیده و در سراسر جهان استفاده می‌شود (Harman *et al.* 2004). قابلیت (پتانسیل) آنتاگونیستی گونه‌های تریکودرما در کنترل زیستی قارچ‌های بیمارگر انباری مانند *Alternaria alternata* روی میوهٔ انجیر و خرمالو (Batta 2001)، *Penicillium expansum* میوهٔ سیب (Batta 2004)، *P. digitatum* مرکبات (Borras and Aguilar 1990)، *B. cinerea* میوهٔ توت‌فرنگی (Freeman *et al.* 2004, Naeimi and Zare 2014)، *Monilinia fructigena* در هسته‌داران (Hong *et al.* 1998) و موارد پرشمار دیگر گزارش و اثبات شده است.

در این پژوهش، با عنایت به اهمیت انگور و کشمش از نظر صادرات برای کشور و آسیب و زیان‌های کمّی و کیفی این قارچ‌ها به‌ویژه آلودگی به زهرابه‌های قارچی ناشی از *A. tubenginsis*، تأثیر اسانس گیاهان دارویی پونهٔ کوهی (*M. longifolia*)، نعناع خوراکی (*M. spicata*)، رازیانه (*F. vulgare*)، بومادران (*Achillea* sp.) و دو گونه تریکودرما شامل *T. harzianum* T447 و *T. hamatum* T622 در کنترل زیستی قارچ‌های *B. cinerea*، *A. tubingensis* و *C. cladosporioides* که مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌زای پس از برداشت انگور در منطقهٔ مشگین‌شهر استان اردبیل به عنوان یکی از مناطق مهم انگور کاری شمال غرب کشور به شمار می‌آیند، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و تهیهٔ بیمارگر

در اواخر تابستان ۹۳ هم‌زمان با رسیدن میوه‌های انگور در منطقهٔ مشگین‌شهر، میوه‌های انگور مشکوک به آلودگی قارچی گردآوری و به آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی منتقل شد. به‌منظور جداسازی گونه‌های بیمارگر، با استفاده از سوزن سترون از بافت آلوده، اندام قارچی به همراه مقداری از بافت میوه را برداشته و به محیط کشت PDA منتقل شد. خالص‌سازی به روش تک‌اسپور کردن انجام شد و پس از نگهداری در شرایط مناسب درون اتاقک رشد (انکوباتور)، شناسایی گونه‌ها با استفاده از کلیدهای Beever and Weeds (2004) و Bensch *et al.* (2012) (به ترتیب برای *Botrytis* و *Cladosporium*) انجام شد. جدایه‌ای از قارچ *A. tubingensis* نیز که از انگورهای آلودهٔ آذربایجان شرقی جداسازی شده بود (اهدایی از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه تبریز)، برای این منظور انتخاب شد.

تهیهٔ قارچ‌های کنترل زیستی

دو جدایهٔ استاندارد قارچ‌های آنتاگونیست *T. harzianum* (با کد استاندارد T447) و *T. hamatum* (با کد استاندارد T612) تهیه‌شده از مؤسسهٔ تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور برای آزمون کنترل زیستی استفاده شدند.

تهیهٔ مواد گیاهی و استخراج اسانس

مواد گیاهی مورد بررسی شامل پونهٔ کوهی (*M. longifolia*)، نعناع خوراکی (*M. spicata*) و بومادران (*Achillea* sp.) از رویشگاه‌های طبیعی‌شان در استان اردبیل گردآوری و بذر رازیانه (*F. vulgare*) از عطاری خریداری و استفاده شدند. گیاهان گردآوری‌شده در دمای اتاق و سایه خشک شد و پس از تأیید هویت گونه‌ها و حذف مواد زائد، هر یک از نمونه‌ها با آسیاب خرد شدند. اسانس نمونه‌های گیاهی به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت استخراج شد. اسانس به‌دست‌آمده به‌وسیلهٔ سولفات سدیم خشک آبگیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴°C درون یخچال تا زمان تجزیه و آزمون‌های زیستی نگهداری شد.

تجزیه و شناسایی ترکیبات شیمیایی اسانس

برای شناسایی اجزای تشکیل‌دهندهٔ اسانس‌های گیاهی،

www.SID.ir

Archive of SID

از دستگاه فام‌نگاری (کروماتوگرافی) گازی مدل Agilent-7890A مجهز به ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایهٔ فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر، گاز حامل هلیوم (درصد خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد) با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه، متصل به طیف‌سنج جرمی مدل Agilent-MSD5975C استفاده شد. دمای محفظهٔ تزریق روی ۲۵۰°C تنظیم و اسانس‌ها به میزان ۱ میکرولیتر تزریق شد. دمای ستون برای سه دقیقه در ۵۰°C نگهداری و تا ۱۸۰°C افزایش یافت و سپس برای دو دقیقه در ۱۸۰°C نگهداری شد. شناسایی مواد تشکیل‌دهندهٔ اسانس‌ها با استفاده از فراسنجه (پارامتر)های مختلف مانند زمان بازداری، بررسی طیف‌های جرمی و مقایسهٔ این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانهٔ رایانهٔ دستگاه GC-MS صورت گرفت (Farzaneh *et al*. 2015).

سنجش تأثیر ضدقارچی اسانس‌های گیاهی

تأثیر ضدقارچی اسانس‌های استخراج‌شده روی سه گونهٔ قارچ به روش اختلاط اسانس با محیط کشت بررسی شد. به این منظور از اسانس‌های موردنظر در محلول توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد)، نامیزه (امولسیون) تهیه شد. همچنین محلول توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. مقادیر مناسبی از اسانس‌های یادشده برای تهیهٔ غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر اسانس در لیتر محیط کشت به فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDA سترون با دمای ۴۲-۴۵°C اضافه و به هم زده شد تا نامیزهٔ یکنواخت به وجود آید. پس از توزیع محیط کشت در تشتک‌های پتری و انعقاد آن، دیسک قارچی به قطر ۵ میلی‌متر در وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. تشتک‌های پتری مایه‌زنی‌شده در اتاقک رشد با دمای ۲۵ °C قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، رشد رویشی هالهٔ هر قارچ به‌طور روزانه و تا هنگامی‌که سطح محیط کشت تشتک‌های پتری شاهد توسط قارچ به‌طورکامل اشغال شود، اندازه‌گیری شد. در انجام این آزمایش برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد. درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها با بهره‌گیری از فرمول زیر محاسبه شد:

Abbott: IP = C-T/C × 100

IP= (Inhibitory percentage) درصد بازدارندگی

C=Check میانگین قطر هالهٔ قارچ در تیمار شاهد

T=Treatment میانگین قطر هالهٔ قارچ در تیمار موردنظر)

همچنین کمترین غلظت بازدارندگی کامل (MIC) اسانس‌ها در جلوگیری از رشد قارچ‌ها محاسبه شد. به‌منظور تعیین قارچ‌کش یا قارچ ایستابودن اسانس، دیسک قارچی تیمارهایی که رشد قارچی در آن‌ها مشاهده نشد، روی محیط کشت PDA واکشت شد و رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت پس از یک هفته بررسی شد.

بررسی قابلیت *T. harzianum* T447 و *T. hamatum* T622 در رقابت با قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی

دیسک‌های میسلیومی به قطر ۵ میلی‌متر از کشت تازهٔ جدایه‌های دو گونهٔ *Trichoderma* و قارچ‌های بیمارگر بافاصلهٔ ۱/۵ سانتیمتر از حاشیهٔ تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA در برابر همدیگر قرار داده شدند، سپس تشتک‌های پتری در اتاقک رشد با دمای ۲۵ °C نگهداری شدند. در تیمار شاهد به جای پرگنهٔ قارچ آنتاگونیست از دیسک میسلیومی محیط کشت سترون استفاده شد. اندازه‌گیری شعاع پرگنه‌های قارچی که به سمت یکدیگر در حال رشد بودند، تا هنگامی‌که پرگنهٔ تیمارهای شاهد به نزدیک لبهٔ تشتک پتری برسد، اجرا شد (Dennis and Webster 1971a). این آزمایش برای هر قارچ بیمارگر و نیز قارچ آنتاگونیست در سه تکرار انجام شد.

بررسی تأثیر مواد غیرفرّار و پادزی‌های تولیدشده به‌وسیلهٔ قارچ‌های آنتاگونیست بر رشد قارچ‌های بیمارگر

برابر روش دنیس و وبستر از کشت هفت روزهٔ تریکودرما در محیط مایع PDB، عصارهٔ برون یاخته‌ای به کمک سانتریفیوژ کردن با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ده دقیقه و عبور دادن از پالایشگر زیستی ۰/۲ میکرومتری تهیه شد. سپس غلظت ۱۰ درصد از عصارهٔ برون یاخته‌ای در محیط کشت PDA تهیه و قارچ‌های بیمارگر در آن کشت داده شدند. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون به جای عصارهٔ برون یاخته‌ای استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

تشتک‌های مایه‌زنی‌شده در دمای ۲۵ ºC نگهداری و درصد کاهش رشد پرگنهٔ بیمارگر نسبت به شاهد، به عنوان معیاری برای ارزیابی اثر ضدمیکروبی سوخت‌وسازهای مایع برون یاخته‌ای قارچ‌های آنتاگونیست استفاده شد (Dennis and Webster 1971c).

بررسی تأثیر ترکیبات فرّار قارچ‌های آنتاگونیست روی رشد قارچ‌های بیمارگر

تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA مایه‌زنی‌شده با قارچ تریکودرما و بیمارگر (جداگانه) درون هود لامینار و کنار شعله روبه‌روی هم قرار داده شده و شکاف بین دو تشتک پتری با استفاده از نوار پارافیلم به منظور جلوگیری از خروج مواد فرّار تولیدشده به‌وسیلهٔ قارچ آنتاگونیست مسدود شد. سپس تشتک‌های پتری به اتاقک رشد با دمای ۲۵ºC منتقل و قطر پرگنهٔ قارچ بیمارگر به‌طور منظم اندازه‌گیری شد و درصد بازدارندگی با استفاده از فرمول آبوت محاسبه شد (Dennis and Webster 1971b). آزمایش بالا در سه تکرار انجام شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیهٔ آماری پس از بررسی عادی (نرمال) بودن داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (V16) انجام شد. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵درصد مقایسه و نمودارها با نرم‌افزار Excell رسم شدند.

نتایج

شناسایی قارچ‌های بیمارگر

دو قارچ متداول آلوده‌کنندهٔ میوه‌های انگور مشگین‌شهر با بررسی ویژگی‌های ریخت‌شناختی و با استفاده از کلیدهای Beever and Weeds (2004) و Bensch *et al.* (2012)، به ترتیب گونه‌های *B. cinerea* Pers(1794) و *C. cladosporioides* (Fresen.) GA de Vries شناسایی شدند. یک جدایه از گونهٔ قارچی *Aspergillus tubingensis* جداسازی‌شده از انگورهای آلوده نیز که با روش‌های ریخت‌شناختی و توالی‌یابی ژن *β–tubulin* شناسایی شده بود (Khodaie *et al.* 2014)، برای این منظور انتخاب شد.

تأثیر اسانس‌های گیاهی بر رشد قارچ‌های بیمارگر

نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر بازدارندگی اسانس‌های مورداستفاده نشان داد که از نظر میزان بازدارندگی از رشد، بین نوع اسانس، گونهٔ قارچی و غلظت‌های مختلف اسانس‌ها تفاوت معنی‌داری (P≤۰/۰۱) وجود دارد (جدول۱). در مجموع، *B. cinerea* به‌عنوان حساس‌ترین گونهٔ قارچی شناخته شد، به‌طوری‌که غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر همهٔ اسانس‌ها به‌استثنای اسانس رازیانه به‌طورکامل بازدارندهٔ رشد آن شدند و حتی در غلظت ۶۰۰ میکرولیتر بر لیتر، اسانس پونهٔ کوهی نیز نتیجهٔ همسانی نشان داد (جدول ۲). اسانس‌های مورد استفاده، کمترین اثر را بر *A. tubingensis* داشتند، به‌طوری‌که بازدارندگی کامل حتی در بالاترین غلظت هیچ‌کدام از اسانس‌ها مشاهده نشد و حتی درصد کاهش رشد توسط سه اسانس نعناع خوراکی (۳۶درصد)، بومادران (۲۴درصد) و رازیانه (درصد۲۵/۵۵) کمتر از ۵۰ درصد ثبت شد (جدول ۲). همچنین اسانس پونهٔ کوهی و نعناع به ترتیب به عنوان مؤثرترین اسانس‌ها بوده و فعالیت ضدقارچی بالایی از خود نشان دادند. اسانس رازیانه به عنوان ضعیف‌ترین اسانس از نظر بازدارندگی از رشد قارچ‌های مورد بررسی شناخته شد، به‌طوری‌که حتی در بیشینه غلظت مورداستفاده قادر به مهار کامل قارچ‌های بیماری‌زای مورد بررسی نبود (جدول۲). در این ارزیابی، همبستگی مثبت معنی‌داری بین افزایش غلظت اسانس (صرف‌نظر از نوع اسانس) و افزایش میزان بازدارندگی مشاهده شد، به‌طوری‌که بیشترین مقدار بازدارندگی در بالاترین غلظت مورداستفاده رخ داد.

نتایج به‌دست‌آمده از واکشت دیسک‌های قارچی در تیمارهایی که رشد قارچی در آن‌ها مشاهده نشده بود، به‌منظور بررسی قارچ‌کش یا قارچ ایستابودن غلظت اسانس نشان داد که اسانس پونهٔ کوهی در غلظت ۶۰۰ میکرولیتر بر لیتر علیه *B. cinerea* و در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر علیه هر سه قارچ، خاصیت قارچ ایستایی از خود نشان داد (جدول ۲). همچنین فعالیت قارچ ایستایی در بالاترین غلظت اسانس نعناع خوراکی علیه *B. cinerea* و *C. cladosporioides* و بالاترین غلظت اسانس بومادران علیه *B. cinerea* مشاهده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس داده‌های ناشی از بررسی قابلیت کنترل زیستی اسانس‌های گیاهی بر قارچ‌های مورد بررسی

Table 1. Analysis of variance of data resulted from assessment of biocontrol abilities of essential oils on tested fungi

source		Df	Mean square
treatment			
	fungi	2	5258.028**
	essential oil	3	7469.517**
	concentration	4	28775.901**
	essential oil× fungi	6	1345.878**
	concentration× fungi	8	1317.577**
	essential oil× concentration	12	2090.547**
	essential oil× concentration × fungi	24	476.016**
Error		120	9.169

**: Significant in 1% level. **: معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد.

جدول ۲. درصد بازدارندگی ناشی از کاربرد غلظت‌های مختلف اسانس‌های پونهٔ کوهی، نعناع خوراکی، بومادران و رازیانه در جلوگیری از رشد سه قارچ عامل پوسیدگی میوهٔ انگور در شرایط آزمایشگاهی به روش اختلاط با محیط کشت PDA

Table 2. The inhibition percent resulted from the application of different concentration of mentha, spearmint, fennel and yarrow essential oils against grapefruit rot fungi in vitro tested by mixing with PDA

Essential oil	essential oil concentration	Inhibition percent of *B. cinerea*	Inhibition percent of *A. tubingensis*	Inhibition percent of *C. cladosporioides*
M. longifolia	75	0	0	0
	150	0	0	0
	300	26.33 a	8.23 b	0 c
	600	100* a	65.33 b	42.33 c
	1000	100* a	99.33 a	100* a
M. spicata	75	0 b	0 b	10 a
	150	0 b	0 b	13.77 a
	300	8 b	0 b	27.11 a
	600	88.44 a	12 c	54.22 b
	1000	100* a	36 b	100* a
Achillea sp.	75	0	0	0
	150	0	0	0
	300	29.44 a	0 b	0 b
	600	41.88 a	9.77 b	15.66 b
	1000	100* a	24 c	37.22 b
Foeniculum vulgare	75	0	0	0
	150	0	0	0
	300	2.58 a	0 b	0 b
	600	6.77 b	0 c	9.81 a
	1000	51.11 a	25.55 b	14.35 c

حروف ناهمسان در هر ردیف بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در $p\leq ۰/۰۵$ است.

*: فعالیت قارچ ایستایی

Values followed by the different letter within the same line have not significant differences in P > 0.05.

*: Fungistatic action

اجزای شیمیایی اسانس‌ها

شناسایی ترکیبات اسانس گیاهان مورداستفاده در این پژوهش با دستگاه فام‌نگاری گازی متصل به طیف‌سنج جرمی نشان می‌دهد که ترکیبات piperitone oxide (۲۱/۵۹ درصد)، Cis piperitone oxide (۱۷/۸۹ درصد) و Pulegone (۴/ ۱۵درصد)، اجزای اصلی شناسایی شده در اسانس پونهٔ کوهی هستند (جدول ۳). ترکیب L-Menthone (۵۱/۰۹ درصد) قسمت عمدهٔ اسانس نعناع را تشکیل می‌دهد (جدول۴). ترکیب 2,7-dimethyl-4(E), 6-octadien-2-ol (۳۵/۴۰ درصد) مادهٔ شاخص اسانس بومادران است. همچنین ترکیباتی مانند 1,8-Cineole (۹/۵ درصد) و Borneol (۵/۹۹ درصد) از اجزای اصلی اسانس یادشده هستند (جدول۵). ترکیبات اصلی در اسانس رازیانه نیز شامل trans-Anethole (۶۸/۸۸ درصد) و L-Fenchone (۱۲/۲۷ درصد) است (جدول ۶).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳. نوع و درصد ترکیب‌های عمدهٔ شناسایی شده در اسانس پونهٔ کوهی (*M. longifolia*)

Table 3. Type and percent of main components identified in the essential oil of mentha (*M. longifolia*)

Compound	Retention time (min)	%
α-Pinene	6.010	6.010
Camphene	6.396	0.59
β-Pinene	7.126	1.34
β-Myrcene	7.595	0.99
1,8-Cineole	8.687	4.40
Linalool	10.746	2.14
Camphor	12.022	0.97
Menthone	12.367	12.70
L-Menthone	12.681	6.45
Isomenthol	12.925	2.03
Pulegone	14.860	15.40
Cis piperitone oxide	15.328	17.89
Piperitenone oxide	18.373	21.59
trans- Caryophyllene	19.667	3.01
Germacrene-D	21.181	0.82
Caryophyllene oxide	23.602	2.05

جدول ۴. نوع و درصد ترکیب‌های عمدهٔ شناسایی شده در اسانس نعناع خوراکی (*M. spicata*)

Table 4. Type and percent of main components identified in the essential oil of spearmint (*M. spicata*)

Compound	Retention time (min)	%
α-Pinene	6.093	1.11
β-Pinene	7.286	3.15
beta.-Myrcene	7.636	0.97
l-Phellandrene	8.058	2.01
1,8-Cineole	8.977	9.90
trans-Sabinene	9.838	0.95
L-Menthone	13.263	51.09
α-Terpineol	13.761	0.91
Pulegone	15.085	3.48
β-Bourbonene	18.830	0.44
Isocaryophillene	19.388	0.45
trans-β-Caryophyllene	19.934	7.36
α-Humulene	20.617	1.87
Germacrene-D	21.430	5.15
bicyclogermacrene	21.721	1.31
Germacrene D-4-OL	23.513	0.25
Caryophyllene oxide	23.703	0.45
Phytol	34.392	0.65

جدول ۵. نوع و درصد ترکیب‌های عمدهٔ شناسایی شده در اسانس بومادران (*Achillea* sp.)

Table 5. Type and percent of main components identified in the essential oil of yarrow (*Achillea* sp.)

Compound	Retention time (min)	%
Santolina triene	5.333	4.48
α-Pinene	6.016	1.55
Camphene	6.402	1.25
β-Pinene	7.138	0.61
Trans-Epoxy-Ocimene	7.749	1.69
1,8-Cineole	8.722	9.50
2,7-dimethyl-4(E),6-octadien-2-ol	8.984	35.40
Linalool	10.242	0.32
α-Campholene aldehyde	10.705	0.65
Camphor	11.963	1.76
L-Menthone	12.295	0.56
Pinocarvone	12.551	0.60
Borneol	12.699	5.99
Camphene	14.765	4.17
Piperitone oxide	15.216	0.83
Piperitenone oxide	18.201	1.07
trans-Caryophyllene	19.620	0.48
Germacrene D	21.175	0.89
Caryophyllene oxide	24.190	0.74
Cadina-1,4-diene	24.777	2.15
β-Eudesmol	25.151	0.70

www.SID.ir

Archive of SID

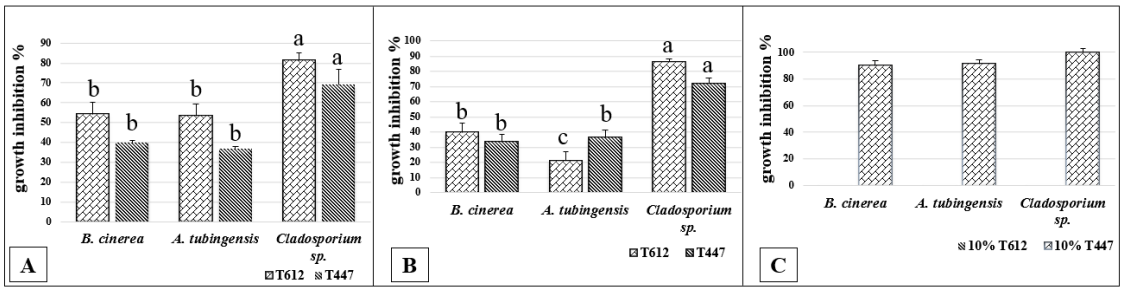
جدول ۶. نوع و درصد ترکیب‌های عمدهٔ شناسایی شده در اسانس رازیانه (*F. vulgare*)

Table 6. Type and percent of main components identified in the essential oil of fennel (*F. vulgare*)

Compound	Retention time (min)	%
α-Pinene	5.963	0.69
Sabinene	7.023	0.3
β-Myrcene	7.489	0.31
Limonene	8.589	5.09
L-Fenchone	10.348	12.27
Camphor	11.927	0.41
E-Citral	15.672	0.44
trans-Anethole	16.209	68.88
β-Bourbonene	18.667	0.22
trans-Caryophyllene	19.54	0.25
Caryophyllene oxide	23.512	0.33

تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در روش کشت متقابل

نتایج به‌دست‌آمده از مقایسهٔ میانگین بازدارندگی از رشد سه قارچ بیماری‌زای انگور توسط دو جدایهٔ قارچ آنتاگونیست با استفاده از آزمون توکی نشان داد که بیشترین درصد بازدارندگی در تعامل بین جدایهٔ *T. hamatum* T612 و قارچ بیماری‌زای *C. cladosporioides* مشاهده می‌شود که میانگین آن ۸۱/۱۱ درصد محاسبه شد. جدایهٔ *T. harzianum* T447 نیز بیشترین بازدارندگی را علیه قارچ *C. cladosporioides* با میانگین ۶۸/۸۸ درصد نشان داد. البته درصد بازدارندگی از رشد *B. cinerea* و *A. tubingensis* با قارچ‌های آنتاگونیست نیز شایان‌توجه بود. در مجموع، ملاحظه می‌شود که *T. hamatum* T612 از نظر میزان درصد بازدارندگی هر سه قارچ بیماری‌زا بهتر از *T. harzianum* T447 عمل کرده است (شکل ۱، A).



شکل ۱. مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد قارچ‌های بیمارگر گیاهی به‌وسیلهٔ قارچ‌های آنتاگونیست *T. harzianum* T447 و *T. hamatum* T612، A: کشت متقابل، B: ترکیبات فرّار، C: عصاره برون یاخته‌ای ۱۰ درصد.

حروف متفاوت روی ستون‌های همسان بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها با استفاده از آزمون توکی در $p\leq ۰/۰۵$ است.

Figure 1. Mean comparison of the effect of *T. harzianum* T447 *and T. hamatum* T612 on percent of growth inhibition of phytopathogenic fungi, A: dual culture, B: volatile methabolite, C: 10% filtrate culture extract.

For each column, the data followed with the same letter were not statistically different according to Tukey's HSD test in P< 0.05.

تأثیر سوخت‌وسازهای فرّار قارچ‌های آنتاگونیست روی رشد میسلیومی قارچ‌های بیمارگر

مقایسهٔ میانگین داده‌های به‌دست‌آمده از تأثیر ترکیبات فرّار قارچ‌های آنتاگونیست به روش توکی نشان می‌دهد که مواد فرّار ترشح‌شونده از قارچ‌های آنتاگونیست، تأثیر معنی‌داری در بازداری از رشد قارچ‌های بیمارگر داشته‌اند. درصد بازدارندگی مواد فرّار ترشح‌شونده از جدایه‌های قارچ آنتاگونیست بسته به جدایهٔ قارچ آنتاگونیست و نیز بسته به گونهٔ قارچ بیماری‌زای مورد آزمایش متفاوت است (شکل ۱، B). بیشترین درصد بازدارندگی رشد مربوط به مادهٔ فرّار ترشح‌شونده از *T. hamatum* T612 در برابر قارچ *C. cladosporioides* با میزان بازدارندگی ۸۶/۲۲ درصد مشاهده شد. همچنین ترکیبات فرّار ترشح‌شده از قارچ آنتاگونیست *T. harzianum* T447 بیشترین تأثیر بازدارندگی را علیه *C. cladosporioides* با میزان بازدارندگی ۷۲ درصد نشان داد. میزان بازدارندگی از رشد دو قارچ دیگر بین ۲۱-۳۹ درصد متغیر بود.

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر مواد غیرفرّار و پادزی‌های ترشح‌شده به‌وسیلهٔ قارچ‌های آنتاگونیست بر رشد قارچ‌های بیمارگر

نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ درصد ترشحات برون یاخته‌ای غیرفرّار *T. harzianum* T447 به نحو مؤثری از رشد میسلیومی قارچ‌های بیماری‌زا جلوگیری کرده، به‌طوری‌که بازدارندگی کامل و خاصیت قارچ ایستایی علیه *C. cladosporioides* و بازدارندگی بالای ۸۵درصد علیه دو قارچ دیگر مشاهده شد (شکل۱، C). در برابر، ترشحات برون یاخته‌ای غیرفرّار *T. hamatum* T612 در غلظت ۱۰ درصد از نظر قدرت بازدارندگی قارچ‌های مورد بررسی بسیار ضعیف عمل کرده و بدون تأثیر بازدارندگی علیه قارچ‌های بیمارگر بود.

بحث

قارچ‌های عامل پوسیدگی و کپک‌زدگی پس از برداشت با تولید هیدرولازهای برون یاخته‌ای چندی مانند پکتینازها، پروتئینازها، آمیلازها و کوتیناز روی شمار گسترده‌ای از محصولات کشاورزی و مواد غذایی رشد کرده و با تولید زهرابه‌های قارچی موجب آلودگی آن‌ها می‌شوند (Bautista-Baños 2014). استفاده از اسانس‌های گیاهی در کنترل بیماری‌های گیاهی به عنوان روشی زیستی در چند سال اخیر مطرح شده و به عنوان روشی مؤثر و درعین‌حال ایمن، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. این ترکیبات نه تنها بدون تأثیر جانبی بوده، بلکه به‌علت خواص ضداکسندگی، کیفیت و طول دورهٔ انبارداری میوه‌ها را نیز افزایش می‌دهند (Arras and Usai 2001, Plotto *et al.* 2002, Anthony *et al.* 2003). تحقیقات مختلف نشان داده است که حساسیت گونه‌های قارچی بسته به نوع اسانس و غلظت‌های مختلف آن متفاوت است. نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر اسانس‌های گیاهی روی قارچ‌های مورد بررسی در این پژوهش گویای آن است که اسانس پونهٔ کوهی بیشترین خاصیت ضدقارچی را دارد. ترکیبات پیپریتون‌اکسید، سیس‌پیپریتون‌اکسید و پولگون به عنوان ترکیبات مؤثرهٔ اسانس پونهٔ کوهی شناخته شدند (جدول ۳) که در تحقیقات دیگر محققان، وجود این ترکیبات (Ghoulami *et al.* 2001, Jaimand and Rezaee 2002, Gulluce *et al.* 2007) و همچنین توان ضدقارچی و ضدباکتریایی (Gulluce *et al.* 2007) آن گزارش شده است. Tripathi و همکاران (۲۰۰۸) پس از آزمایش تأثیر ضدقارچی ۲۶ گیاه دارویی بومی هندوستان روی قارچ *B. cinerea* عامل کپک خاکستری انگور نتیجه گرفتند که از بین آن‌ها، ده گیاه خاصیت بازدارندگی شایان قبولی دارد (Tripathi *et al.* 2008). اسانس‌های گیاهی، مخلوطی از ترکیبات مختلف با وزن مولکولی کم هستند که خاصیت ضدمیکروبی دارند و تفاوت در فعالیت ضدقارچی اسانس‌های گیاهی به اجزاء تشکیل‌دهندهٔ آن‌ها بستگی دارد. یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به‌صورت هم‌افزایی با دیگر ترکیب‌ها، فعالیت ضدقارچی اسانس را باعث شود (Plotto *et al.* 2002). تحقیقات Cárdenas-Ortega و همکاران نشان داد که پیپریتون در غلظت پایین، به‌طورکامل از رشد *A. flavus* جلوگیری کرده (Cárdenas-Ortega *et al.* 2005) و حتی گزارش‌شده که سبب افزایش توان ضدمیکروبی پادزی‌های فورازولیدون و نیتروفورانتون شده است (Shahverdi *et al.* 2004).

گونه‌های مختلف تریکودرما به عنوان یکی از پرکاربردترین عامل‌های کنترل زیستی برای مهار بیمارگرهای مختلف در میزبان‌های گیاهی چندی به کار رفته‌اند. سازوکارهای کنترل زیستی گونه‌های تریکودرما به چند حالت از جمله رقابت، قارچ انگل (میکوپارازیتیسم)، تأثیر ترشحات مایع برون یاخته‌ای و ترکیبات فرّار ظاهر می‌شود (Howell 2003). نکتهٔ مهمی که بسیاری از محققان به آن اشاره کرده‌اند، وجود اختلاف بین گونه‌ها و حتی جدایه‌های مختلف یک‌گونه از نظر سازوکارهای کنترلی یادشده و شدت و ضعف این سازوکارها است که نتایج این تحقیق نیز این مطلب را تأیید می‌کند. نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق، گویای توانایی هر دو گونهٔ قارچ تریکودرما در رقابت تغذیه‌ای در برابر قارچ‌های بیمارگر مختلف مورد بررسی است. در آزمون کشت متقابل، هر دو جدایهٔ *T. hamatum* T612 و *T. harzianum* T447 با سرعت رشد بیشتر و اشغال سریع‌تر بستره (سوبسترا) در رقابت تغذیه‌ای در بیشتر موارد موفق‌تر از قارچ‌های بیمارگر بودند. توانایی رشد سریع، قارچ تریکودرما را قادر می‌سازد تا بهره‌برداری مطلوبی از زیستگاهش به عمل آورد و حتی در شرایط و

www.SID.ir

Archive of SID

زیستگاه‌های نامطلوب، بقاء خود را حفظ کند. یک چنین خصوصیتی باعث شده تا از این قارچ به عنوان عامل کنترل زیستی مناسب علیه عامل‌های بیماری‌زای مختلف استفاده شود (Bhatnagar 1996).

در این تحقیق مشخص شد که گونه‌های تریکودرما با تولید ترکیبات فرّار، باعث جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ‌های بیمارگر می‌شوند. دنیس و وبستر، استالدئید را به عنوان مهم‌ترین سوخت‌وسازگر فرّار *T. viride* معرفی کردند. Zeppa و همکاران (1991)، سوخت‌وسازگرهای فرّار چندی شامل لاکتون‌ها، الکل‌ها، مشتقات ترپن و مشتقات آلفاپیرون را در شرایط کشت متفاوت از *T. viride* به دست آوردند و نشان دادند که جدایه‌های قارچ، مواد و روش کشت در کمیت و کیفیت تولید سوخت‌وسازگرهای فرّار مؤثرند (Zeppa *et al.* 1991).

نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر ترشحات برون یاخته‌ای دو گونهٔ تریکودرما گویای تفاوت بارز دو جدایه در کنترل زیستی قارچ‌های بیمارگر بود، به‌طوری‌که غلظت ۱۰درصد ترشحات برون یاخته‌ای جدایهٔ *T. hamatum* T612 نتوانست از رشد میسلیوم قارچ‌های بیمارگر جلوگیری کند، ولی در برابر، غلظت ۱۰درصد ترشحات برون یاخته‌ای جدایهٔ *T. harzianum* T447 بازدارندگی بسیار بالا یا حتی بازدارندگی کامل علیه قارچ‌های بیمارگر نشان داد. تحقیقاتی که توسط دنیس و وبستر، ژیس‌آلبرتی و رولند و پاپاویزاس انجام شده، نشان داده که سوخت‌وسازگرهای غیرفرّار تریکودرما حاوی آنزیم‌های چندی مانند سلولاز، کیتیناز، لامیناریناز و بتا ۱و۳ گلوکاناز و پادزی‌هایی مانند تریکودرمین، تریکوتوکسین، پاراسلسین، درمادین و آلامتیسن هستند که تعداد و میزان ترشح این مواد در گونه‌های مختلف تریکودرما و حتی در جدایه‌های مربوط به یک‌گونه ممکن است متفاوت باشد (Dennis and Webster 1971c, Papavizas 1985, Ghisalberti and Rowland 1993)، به‌طوری‌که انواع مختلف پادزی‌های ایزونیتریلی در تشخیص گونه‌های مهم تریکودرما نظیر *T. harzianum*، *T. viride*، *T. hammatum* و *T. koningii* نقش مهمی دارد (Okuda *et al.* 1982).

به‌طورکلی نتایج این تحقیق گویای قابلیت کنترل زیستی بالای اسانس پونهٔ کوهی و دو گونه جدایهٔ *T. harzianum* T447 و *T. hamatum* T612 به‌ویژه عصارهٔ برون یاخته‌ای *T. harzianum* T447 در مهار زیستی قارچ‌های عامل پوسیدگی میوهٔ انگور است و ضرورت انجام تحقیقات بیشتر برای استفادهٔ عملی از آن‌ها به عنوان جایگزین مناسب و ایمن برای سموم شیمیایی را آشکار می‌سازد.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی و فناوری دانشگاه محقق اردبیلی به‌خاطر تأمین بودجهٔ لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Anthony SK, Abeyvikrama W, Wilson 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. Journal of Horticultural Science and Biotechnology 78(6): 780-785.

Arras G, 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. Journal of Food Protection 64(7):1025-1029.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – a review. Food and Chemical Toxicology 46: 446-475.

Baris O, Gulluce M, Sahin F, Ozer H, Kilic H, Ozkan H, Sokmen M, Ozbek T (2006) Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Achillea biebersteinii* Afan. (Asteraceae). Turkish Journal of Biology 30(2): 65-73.

Batta YA (2001) Effect of fungicides and antagonistic microorganisms on the black fruit spot disease on persimmon. Dirasat: Agricultural Sciences 28: 165-171.

Batta YA (2004) Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. International Journal of Food Microbiology 96: 281-288.

Bautista-Baños S (2014) Postharvest decay, control strategies. Academic Press. London, UK.

Beever RE, Weeds PL (2004) Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. pp. 29-52 In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P Delen, N (eds). *Botrytis*, Biology, Pathology and Controls. Kluwer Academic Publisher. Netherland.

Bensch K, Braun U, Groenewald JZ, Crous PW (2012) The genus *Cladosporium*. Studies in Mycology 72: 1-401.

www.SID.ir

Archive of SID

Bhatnagar H (1996) Influence of environmental condition on antagonistic activity *Trichoderma* spp. against *Fusarium udum*. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology 26: 58-65.

Bluma RV, Etcheverry MG (2008) Application of essential oils in maize grain: impact on *Aspergillus* section Flavi growth parameters and aflatoxin accumulation. Food Microbiology 25: 324-334.

Borras D, Aguilar RV (1990) Biological control of *Penicillium digitatum* on postharvest citrus fruit. International Journal of Food Microbiology 11: 179-184.

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

Briceño EX, Latorre BA (2008) Characterization of *Cladosporium* rot in grapevines, a problem of growing importance in Chile. Plant Disease 92: 1635-1642.

Bulit J, Dubos B (1988) Botrytis bunch rot and blight. In: Pearson RC, Goheen AC (Eds.), Compendium of Grape Diseases. APS Press, The American Phytopathological Society, MN, pp. 13-15.

Cárdenas-Ortega NC, Zavala-Sánches MA, Aguirre-Rivera J R, Pérez-Gonzalez C, Pérez-Gutiérrez S (2005) Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray. Journal of Agricultural and Food Chemistry 3: 4347-4349.

Chiotta ML, Ponsone ML, Combina M, Torres AM, Chulze SN (2009) *Aspergillus* section Nigri species isolated from different wine grape growing regions in Argentina. International Journal of Food Microbiology 136: 137-141.

Dafereraa DJ, Ziogasb, BN, Polissiou MG (2003) The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Crop Protection 22: 39-44.

Dennis C, Webster J (1971a) Antagonistic properties of species group of *Trichoderma* III. Hyphal interactions. Transactions of British Mycological society 57: 363-369.

Dennis C, Webster J (1971b) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II, production of volatile antibiotics. Transactions of British Mycological Society 57: 41-47.

Dennis C, Webster J (1971c) Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I, production of non-volatile antibiotics. Transactions of British Mycological Society 57: 25-39.

Dhifi W, Jelali N, Mnif W, Litaiem M, Hamdi N (2013) Chemical composition of the essential oil of *Mentha spicata* L. from Tunisia and its biological activities. Journal of Food Biochemistry 37: 362–368.

Droby S, Lichter A (2004) Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and management. In: Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (Eds.), Botrytis: Biology. Pathology and Control. Kluwer Academic Publishers London, UK.

Droby S, Wisniewski M, Macarisin D, Wilson C (2009) Twenty years of postharvest biocontrol research: is it time for a new paradigm? Postharvest Biology and Technology 52: 137-145.

El-Soud NA, El-Laithy N, El-Saeed G., Wahby MS, Khalil M, Morsy F, Shaffie N (2011) Antidiabetic activities of *Foeniculum vulgare* Mill. Essential oil in Streptozotocin induced diabetic rats. Macedonian Journal of Medical Sciences 173: 1857-5773.

Farzaneh M, Kiani H, Sharifi R, Reisid M, Hadiana J (2015) Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology 109: 145-151.

Freeman S, Minz D, KolesnikBarbul I, Zreibi, O, Maymon A, Nitzani M, Kirshner Y, Rav-David B, Bilu D A, Da A, Shafir S, Elad Y (2004) Trichoderma biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea*, and survival in strawberry. European Journal of Plant Pathology 110: 361-370.

Ghisalberti E, Rowland GY (1993) Antifungal metabolites from *Trichoderma harzianum*. Journal of Natural Products 56: 1799-1804.

Ghoulami S, Idrissi A, Fkih-Tetouani S (2001) Phytochemical study of *Mentha longifolia* of Morocco. Fitoterapia 72(5): 596-598.

Govindarajan M, Sivakumar R, Rajeswari M, Yogalakshm K (2012) Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. Parasitology Research 110: 2023-2032.

Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A, Polissiou M, Adiguzel A, Ozkan H (2007) Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. Food Chemistry 103: 1449-1456.

Harman GE, Howell CR, Viterbo A, Chet I, Lorito M (2004) *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2: 43-56.

Hong CX, Michailides TJ, Holtz BA (1998) Effects of wounding, inoculum density, and biological control agents on postharvest brown rot of stone fruits. Plant Disease 82: 1210-1216.

Howell CR (2003) Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease 87: 4-10.

www.SID.ir

Archive of SID

Jaimand K, Rezaee MB (2002) Chemical constituents of essential oils from *Mentha longifolia* (L.) Hudson var. *asiatica* (Boriss.) Rech. f. from Iran. Journal of Essential Oil Research 14(2): 107-108.

Kanatt SR, Chander R, Sharma A (2007) Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. Food Chemistry 100: 451-458.

Khani A, Asghari J (2012) Insecticide activity of essential oils of *Mentha longifolia*, *Pulicaria gnaphalodes* and *Achillea wilhelmsii* against two stored product pests, the flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus*. Journal of Insect Science 12: 1-10.

Khodaei A, Arzanlou M, Babai-Ahari A, Darvishi F (2014) Identification of black Aspergilli species on grape and raisin in Southern regions of East and West Azerbaijan Provinces. Applied Researches in Plant Protection 3(1): 49-64. (In Persian).

Lee SH (2004) Acaricidal activity of constituents identified in *Foeniculum vulgare* fruit oil against *Dermatophagoides* spp. (Acari: Pyroglyphidae). Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 2887-2889.

Logrieco A, Bottalico A, Mulé G, Moretti A, Perrone G (2003) Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. European Journal of Plant Pathology 109: 645-667.

Monte E (2001) Editorial Paper: Understanding *Trichoderma*: Between Agricultural Biotechnology and Microbial Ecology. International Microbiology 4: 1-4.

Naeimi S, Zare R (2014) Evaluation of indigenous *Trichoderma* spp. isolates in biological control of *Botrytis cinerea*, the causal agent of strawberry gray mold disease. Biocontrol in Plant Protection 1(2): 55-74. (In Persian)

Okuda T, Fujiwara A, Fujiwara M (1982) Correlation between species of *Trichoderma* and production of isonitrile antibiotics. Agricultural and Biological Chemistry 46: 1811-1822.

Özcan MM, Chalchat JC, Arslan D, Ates A, Ünver A (2006) Comparative essential oil composition and antifungal effect of bitter fennel (*Foeniculum vulgare* ssp. *piperitum*) fruit oils obtained during different vegetation. Journal of Medicinal Food 9 (4): 552-561.

Papavizas GC (1985) *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Annual Review of Phytopathology 23: 23-57.

Plotto A, Roberts D, Roberts RG (2002) Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Acta Horticulture 628: 737-745.

Rasooli I, Rezaei MB, Allameh A (2006) Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. Food Control 17: 359-364.

Ruberto G, Baratta MT, Deans SG, Dorman HJD (2000) Antioxidant and antimicrobial activity of *Foeniculum vulgare* and *Crithmum maritimum* essential oils. Planta Medica 66: 687-693.

Shahverdi AR, Rafii F, Fazeli MR, Jamalifar H (2004) Enhancement of antimicrobial activity of furazolidone and nitrofurantoin against clinical isolates of Enterobacteriaceae by piperitone. International Journal of Aromatherapy 14: 77-80.

Sharma RR, Singh D, Singh R (2009) Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control 50: 205-221.

Singh D, Sharma RR (2007) Postharvest diseases of fruit and vegetables and their management. In: Prasad D (Ed.), Sustainable Pest Management. Daya Publishing House, New Delhi, India.

Soylu S, Yigitbas H, Soylu EM, Kurt S (2007) Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Applied Microbiology 103: 1021-1030.

Tabassum N, Vidyasagar GM (2013) Antifungal investigations on plant essential oils. A review. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 5: 19-28.

Tripathi P, Dubey NK, Shukla AK (2008) Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24: 39-46.

Varga J, Juhasz A, Kevei F, Kozakiewicz Z (2004) Molecular diversity of agriculturally important *Aspergillus* species. European Journal of Plant Pathology 110: 627-640.

Zahavi T, Cohen L, Weiss B, Schena L, Daus A, Kaplunov T, Zutkhi J, Ben-Arie R, Droby S (2000) Biological control of *Botrytis*, *Aspergillus* and *Rhizopus* rots on table and wine grapes in Israel. Postharvest Biology and Technology 20: 115-124.

Zeppa G, Allengron G, Barbeni M Guarda PA (1991) Variability in the production of volatile metabolites by *Trichoderma viride*. Plant Pathology 70(8): 604.

Zhu SJ (2006) Non-chemical approaches to decay control in postharvest fruit. In: Noureddine B, Norio S (Eds.), Advances in Postharvest Technologies for Horticultural Crops. Research Signpost, Trivandrum, India.

www.SID.ir

Archive of SID

Biological Control of Pests and Plant Diseases
Vol. 5, No. 1, Spring & Summer 2016

Study on the effects of four medicinal plant essential oils and two *Trichoderma* species on biocontrol of grape fruit rot fungi

Mahdi Davari[1*] and Robab Ezazi[2]
1. Assistant Professor, Depatment of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resourses, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran
2. Ph. D. Student, Department of Plant Protection, University College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran
(Received: Jan. 1, 2016 - Accepted: Feb. 16, 2016)

ABSTRACT

Grape, like other horticultural products due to high humidity, low relative pH and wealth of nutrients, is subjected to attack by pathogenic fungi during the harvest and storage stages. In this study, at first, the some post-harvest pathogenic fungi of grape were isolated in Meshgin-shahr and two fungal species including *Botrytis cinerea* and *Cladosporium cladosporioides* were identified as the domonant species. *Aspergillus tubingensis*, causal agent of fruit rot and toxigenic species on grape and raisin was selected as well. In order to evaluate their biocontrol possibility, the effects of *Trichoderma harzianum* T447 and *T. hamatum* T622 and four medicinal plant essential oils (EOs) including mentha, spearmint, fennel and yarrow were tested *in vitro*. Results revealed that both of anthagonistic fungi were prospering than pathogenic fungi in nutrient competition and their volatile metabolites showed the highest inhibition to *C. cladosporioides.* 10% filtrate culture extract of *T. harzianum* T447 could effectively (≥85%) prevented the fungal mycelial growth. Also, our results showed that fungal species, EO type and its concentration play a critical role ($P \leq 0.01$) in fungal mycelia inhibition. Mentha and fennel EOs were known respectively as the most effective and weakest treatments. GC-MS analysis demonstrated that piperitoneoxid and Cis piperitone oxide, L-Menthone, dimethyl-4(E),6-octadien-2-ol and trans-Anethole were the main components of the essential oils of *Mentha longifolia, M. spicata, Foeniculum vulgare* and *Achillea* sp., respectively. Due to the significant inhibition of essential oils and biocontrol fungi, additional researches about their use for grape post-harvest diseases control are recommended.

Keywords: Biological control, essential oil, grape, post-harvest diseases, *Trichoderma* spp.

***** Corresponding author E-mail: Mdavari@uma.ac.ir Tel: +98 45 33523006

www.SID.ir