نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دوره۳، شماره ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۳ (۸۶-۷۷)

قابلیت بیوکنترلی برخی اسانس‌های گیاهی بر رشد *Botrytis cinerea*، عامل کپک خاکستری سیب

۱. آیت طاهری دهکردی*؛ ۲. معین خجسته؛ ۳. عزیزاله خندان میرکوهی
۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، بیوتکنولوژی محصولات باغبانی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج؛ ۲. دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
۳. استادیار گروه علوم باغبانی و فضای سبز، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج
(تاریخ دریافت: ۹۳/۴/۱۸- تاریخ تصویب: ۹۳/۱۰/۱۵)

چکیده

قارچ‌کش‌های شیمیایی اولین راهکار برای کنترل ضایعات قارچی پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها محسوب می‌شوند و این در حالی است که استفادهٔ روزافزون آن‌ها با نگرانی عمومی در ارتباط با آلودگی مواد فاسدشدنی با بقایای قارچ کش ها و افزایش مقاومت در جمعیت های پاتوژن مواجه شده است. بنابراین، پژوهش‌های اخیر، بر توسعه و تکامل راهبردهای کنترلی جایگزین به‌منظور کاهش اتکا بر قارچ‌کش‌های شیمیایی تمرکز کرده است. در این مطالعه، فعالیت بیوکنترلی اسانس‌های گیاهان مرزه، رزماری، نعنافلفلی، آویشن شیرازی و زیرهٔ سبز در شرایط آزمایشگاهی و محیطی در برابر رشد قارچ *Botrytis cinerea*، عامل کپک خاکستری سیب، ارزیابی شد. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که اسانس‌های آویشن شیرازی، نعنافلفلی و زیرهٔ سبز بالاترین فعالیت بیوکنترلی را در بین اسانس‌های مورد آزمایش دارند؛ همچنین، نتایج آزمایش در شرایط محیطی حاکی از آن است که اسانس‌های مذکور در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام اثر بازدارندگی معنی‌داری بر رشد *Botrytis cinerea* دارند. آنالیز گاز ـ کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی اسانس‌های آویشن شیرازی، زیرهٔ سبز و نعنافلفلی نشان داد که به‌ترتیب کارواکرول (۷۱/۱۹ درصد)، گاما ترپینن (۳۰/۴۱ درصد) و منتول (۵۱/۱۹ درصد) اجزای اصلی این اسانس‌ها هستند. با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان اسانس‌های گیاهی را به‌عنوان جایگزینی برای مواد شیمیایی سینتیک پیشنهاد کرد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، پس از برداشت، فعالیت ضد قارچی، *Botrytis cinerea*

مقدمه

ضایعات میوه و سبزی بر اثر آلودگی‌های میکروبی هر ساله خسارت فراوانی را به تولیدکنندگان وارد می‌کنند و مقادیر قابل‌توجهی از این محصولات بر اثر فساد ناشی از این آلودگی‌ها دور ریخته می‌شوند. طی سال‌های گذشته تعداد زیادی از سموم شیمیایی چون ترکیبات بنزیمیدازول، ایمازالیل، ترکیبات گوگردی آلی و معدنی و مواد اکسیدکننده برای مهار این بیماری‌ها معرفی‌شده‌اند؛ اما در اکثر موارد به‌علت مشکلات زیست‌محیطی بازمانده‌های سموم، ایجاد سمیت برای انسان، ایجاد نژادهای مقاوم و در برخی موارد هزینه‌های بسیار بالا، مصرف این گونه ترکیبات با محدودیت مواجه است (Rahemi,2004). طبق برآوردها، حتی در کشورهای توسعه‌یافته نیز حدود ۲۵-۲۰ درصد از میوه‌ها و سبزی‌ها در طی فرایندهای پس از برداشت به‌وسیله‌ی عوامل بیماری‌زا تخریب می‌شوند (Droby 2005). اخیراً، کاربرد اسانس‌ها برای مهار بیماری‌های پس از برداشت به‌دلیل عدم سمیت گیاهی و زیست‌تخریب‌پذیری، مورد توجه قرار گرفته است. تولید اسانس‌ها به کمک گیاه ساز و کاری دفاعی و برجسته در

*تلفن: ۰۹۱۲۳۲۱۰۰۰۱+
E-mail: ayat.taheri@ut.ac.ir

برابر عوامل بیمارگر و آفات قلمداد می‌شود. براساس تحقیقات، اسانس‌ها دارای خصوصیات ضد میکروبی و ضد قارچی هستند (Znini *et al.* 2011).

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora*، گیاهی معطر و ادویه‌ای است که به خانوادهٔ نعناییان تعلق دارد و در ایران، پاکستان و افغانستان رشد می‌کند (Shaiq *et al.*, 2000). اسانس این گیاه تأثیرات مختلفی از جمله تأثیرات آنتی‌سمپاتیک، بی‌هوش‌کنندگی، ضد صرع و ضد باکتریایی دارد (Hosseinzadeh *et al.*, 2000). اجزای اصلی این گیاه، ترکیبات فنولی مثل کارواکرول و تیمول است (Shafiee and Javidnia 1997). نعنافلفلی با نام علمی Mentha piperita، به خانوادهٔ نعناییان تعلق دارد و گونه‌ای است که در ایران و قسمت‌های زیادی از دنیا یافت می‌شود؛ همچنین، ارزش اقتصادی به‌منظور چاشنی، عطر (رایحه) و ویژگی‌های درمانی در غذاها و محصولات آرایشی و صنعتی دارد. علاوه بر این، برگ و گل‌های این گیاه، خواص درمانی دارد (Tyler 1988;[Foster 1996). اسانس روغنی نعنافلفلی یکی از اسانس‌های مشهور گیاهی است که به‌دلیل ترکیبات اصلی آن شامل منتول و منتون، استفادهٔ گسترده‌ای دارد (Derwich *et al.*, 2010). زیرهٔ سبز، گیاهی علفی یک‌ساله، ظریف و معطر از خانوادهٔ چتریان است که به نام علمی *Cuminum cyminum* معروف است (Derwich *et al.*, 2010). میوهٔ زیرهٔ سبز حاوی ۵ـ۲ درصد اسانس است که قسمت اعظم آن را پاراسیمول، آلفا و بتا - پینن، کومیک الکل، کومیک آلدهید، آلفا و بتا - فلاندرن و اوژنول تشکیل داده است (Steinegger and Hänsel 1972).

گیاه رزماری با نام علمی *Rosmarinus officinalis* L. به خانوادهٔ نعناییان تعلق دارد و به‌دلیل خواص ضد میکروبی و ضد جهش‌زایی در صنایع دارویی و پزشکی به‌عنوان داروی گیاهی باارزش شناخته شده است (Tavassoli *et al.*, 2011). رزماری مقدار زیادی اسانس (بیش از ۱ درصد) دارد که به‌عنوان طعم‌دهنده در مواد غذایی، صنایع آرایشی و همچنین، گندزداها و حشره‌کش‌ها استفاده می‌شود (Pintore *et al.*, 2002). گیاه دارویی مرزهٔ تابستانی با نام علمی *Satureja hortensis*، به خانوادهٔ نعناییان تعلق دارد. این گیاه دارای ۵/۱ تا ۸ درصد اسانس به همراه تانن، رزینوموسیلاژ است. گونه‌های مختلف جنس مرزه به‌دلیل خواص دارویی و کاربرد در طب سنتی در کشورهای مختلف جهان به آن توجه و دربارهٔ آن بررسی می‌شود. اسانس این گیاه مایعی بی‌رنگ و یا مایل به رنگ زرد و دارای عطر و بوی تند و زننده‌ای است. (Hadizadeh *et al.*, 2009).

Botrytis cinerea شایع‌ترین گونهٔ جنس *Botrytis* است و روی دامنهٔ وسیعی از محصولات مهم باغی و زراعی به‌عنوان یک پارازیت یا ساپروفیت رشد می‌کند و یکی از عوامل بیماری مهم برای محصولاتی نظیر سیب است (Elad *et al.*, 2004). کنترل عامل بیماری کپک خاکستری به‌دلیل ویژگی زیستی این پاتوژن، قدرت تخریب در زمان برداشت، سازگاری با شرایط محیطی مختلف و مقاومت قارچ‌کشی آن، همچنان مورد بحث است (Viret *et al.*, 2004). استفاده از ترکیبات طبیعی می‌تواند راهکار مناسبی برای کنترل بیماری پوسیدگی کپک خاکستری محصولات باغی به‌ویژه طی عمر پس از برداشت آن‌ها باشد.

پژوهش حاضر با هدف ارزیابی قابلیت بیوکنترلی اسانس‌های گیاهان آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، نعنا فلفلی (*Mentha piperita*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.)، مرزه تابستانی (*Satureja hortensis*) از خانواده نعناییان (Lamiaceae) و اسانس زیره سبز (*Cuminum cyminum*) از خانواده چتریان (Apiaceae) علیه بیمارگر *Botrytis cinerea*، عامل کپک خاکستری، به اجرا در آمد.

مواد و روش‌ها

تهیهٔ مواد گیاهی و استخراج اسانس

مواد گیاهی گونه‌های مورد آزمایش شامل پیکرهٔ رویشی گیاهان آویشن شیرازی، نعنافلفلی، رزماری، مرزه و بذور زیره از هرباریوم دانشکدهٔ کشاورزی، دانشگاه تهران، تهیه شد. حدود ۲۰۰ گرم از هریک از نمونه‌ها با آسیاب خرد شده و سپس، اسانس آن‌ها به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر به‌مدت سه ساعت استخراج شد. اسانس به‌دست‌آمده با سولفات سدیم خشک، آب‌گیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد درون یخچال تا زمان آنالیز و آزمون بیولوژیک نگه‌داری شد.

آنالیز GC-MS[1] اسانس‌ها

آنالیز اسانس‌ها از طریق روش کروماتوگرافی گازی با مشخصات گاز کروماتوگراف نوع شیمادزو (Shimadzu, Japan) مدل 9A، متصل به طیف‌سنج جرمی واریان

1. Gas chromatography

(Varian) مدل ۳۴۰۰، نوع ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲/۵ میلی‌متر و ضخامت فاز ساکن ۰/۲۵میلی‌متر انجام شد. دمای اولیهٔ ستون ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه نگه‌داری شد؛ سپس، افزایش دما تا ۲۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد، به‌صورت افزایش‌های ۳ درجهٔ سانتی‌گراد در دقیقه برنامه‌ریزی شد. تزریق و آشکارسازی هر دو در دمای ۲۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد انجام شد. گاز حامل ستون، هلیم با سرعت خطی ۳۲ سانتی‌متر بر ثانیه بود. انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت، زمان اسکن ۱ ثانیه و محدودهٔ جرمی amu ۳۵۰ـ۴۰ قرار داده شد.

تهیهٔ بیمارگر

برای جداکردن اولیهٔ قارچ‌ها از محیط کشت PDA و آب آگار استفاده شد. برای این منظور میوه‌های آلوده پس از جمع‌آوری به آزمایشگاه منتقل و در جریان ملایم آب به مدت ۱۵ دقیقه شست و شو شدند، میوه‌ها روی کاغذ صافی سترون، در زیر هود خشک و قسمت‌های آلوده آن‌ها کشت شدند. سپس، در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه قرار گرفتند تا کلنی‌های قارچ ظاهر شوند. برای خالص‌سازی قارچ‌ها از روش تک اسپور استفاده شد. بیماریزایی قارچ‌ها براساس اصول کخ بررسی شد، بدین ترتیب برای شناسایی قارچ‌های بیماریزا، ریسه، کندیوفور، سلول‌های کنیدی‌زا، اسپور، رشد و رفتار قارچ روی محیط کشت مطالعه شد (Jobling 2000; Plotto *et al.*, 2002).

سنجش تأثیرات ضد قارچی در شرایط آزمایشگاه

اثر بازدارندگی اسانس گیاهان مرزه، رزماری، نعنافلفلی، آویشن شیرازی و زیرهٔ سبز علیه قارچ *Botrytis cinerea* به روش اختلاط با محیط کشت و در غلظت‌های صفر (شاهد)، ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر اسانس در یک لیتر محیط کشت در سه تکرار سنجش شد. به این منظور، ابتدا اسانس‌ها در شرایط سترون با استفاده از فیلتر ۰/۲ میکرون سرنگی سترون شدند. پس از تهیه و سترون‌کردن محیط کشت، هنگامی که دمای محیط کشت سترون بعد از خروج از اتوکلاو، به حدود ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد رسید، اسانس گیاه در غلظت مورد نظر به همراه ۰/۰۰۵ درصد توئین ۸۰ به آن اضافه شد (Tripathi *et al.*, 2008). سپس، محیط کشت حاوی اسانس به درون تشتک‌های پتری توزیع شد. بعد از انعقاد محیط‌های کشت، قرص‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر از حاشیهٔ پرگنهٔ در حال رشد قارچ *Botrytis cinerea* در مرکز تشتک‌های حاوی محیط کشت قرار داده شدند. سپس، تشتک‌ها درون کیسه‌های پلاستیکی گذاشته و به ژرمیناتور با دمای $25\pm1^{\circ}C$ منتقل شدند.

به‌منظور سنجش درصد بازدارندگی اسانس روی رشد میسلیومی قارچ، در فواصل زمانی مشخص نحوهٔ رشد پرگنهٔ قارچ بازبینی شد. زمانی که رشد پرگنهٔ بیمارگر در تیمار شاهد به حاشیهٔ تشتک پتری رسید، میزان رشد پرگنه در تیمارهای مختلف به‌عنوان معیار سنجش اثر بازدارندگی اسانس‌ها معین شد. برای ارزیابی هرچه دقیق‌تر رشد پرگنهٔ قارچ، از فاصلهٔ ثابت عکس‌هایی با وضوح بالا از تشتک‌های پتری تهیه شد. سپس، تعداد پیکسل عکس‌ها با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ CC نسخهٔ ۱۴ آنالیز شد؛ به این صورت که با انتخاب سطح کل محیط کشت در هر تشتک پتری، تعداد پیکسل کل و سپس، با انتخاب دقیق مساحت پرگنهٔ قارچ، تعداد پیکسل این ناحیه محاسبه و درصد بازدارندگی اسانس بر رشد قارچ با فرمول (۱) محاسبه شد.

درصد بازدارندگی اسانس: (فرمول ۱) $=100-(\frac{a}{b}\times 100)$

a=تعداد پیکسل ناحیهٔ رشد پرگنه در هر تشتک پتری

b=تعداد کل پیکسل هر تشتک پتری

به‌منظور بررسی ویژگی قارچ‌کشی[1] یا قارچ ایستایی[2] اسانس، دیسک قارچی تیمارهایی که رشد قارچی در آن‌ها مشاهده نشد روی محیط کشت PDA واکشت و رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت پس از یک هفته بررسی شد.

بررسی قابلیت بیوکنترلی اسانس‌ها روی میوه سیب

برای این منظور از میوه‌های سیب گلدن دلیشس سالم و هم‌اندازه استفاده شد که بدون هرگونه تیمار شیمیایی و عارضهٔ فیزیولوژیک بودند. پس از شست و شو و ضدعفونی نمونه‌ها با محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد و خشک‌شدن نمونه‌ها، روی هر میوه در شرایط سترون زخمی به قطر ۱ میلی‌متر و عمق ۳ میلی‌متر ایجاد شد و به محل زخم‌ها ۲۵ میکرولیتر از سوسپانسیون 1×10^{6} اسپور در میلی‌لیتر قارچ *Botrytis cinerea* تلقیح شد و اجازه داده شد که خشک شوند؛ سپس، ۲۵ میکرولیتر از اسانس آویشن شیرازی، زیرهٔ سبز و نعنافلفلی با غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر به محل زخم‌ها تزریق شد. در تیمار شاهد سالم از آب مقطر استریل و همچنین،

1. Fungicidal
2. Fungistatic

اسانس‌های مذکور در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر استفاده شد و تیمار شاهد آلوده نیز با سوسپانسیون اسپور *Botrytis cinerea* به غلظت 1×10^{6} اسپور در هر میلی‌لیتر تلقیح شد. نمونه‌ها در اتاقک رشد با دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و دورهٔ نوری ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگه‌داری شدند و پس از ۱۰ روز در شرایط سترون، مساحت لکه‌های تشکیل‌شده روی میوه‌های سیب تیمارشده با اسانس، با اندازه‌گیری قطر ناحیهٔ آلوده به‌دست آمد و با مقایسهٔ نتایج با تیمار شاهد (به عنوان ۱۰۰ درصد آلودگی)، شدت بیماری در تیمارها بر حسب درصد، محاسبه شد. در این بررسی برای هر تیمار شش تکرار در نظر گرفته شد (Safari *et al.* 2014؛ Lopez-Reyes *et al.* 2010).

آنالیز آماری

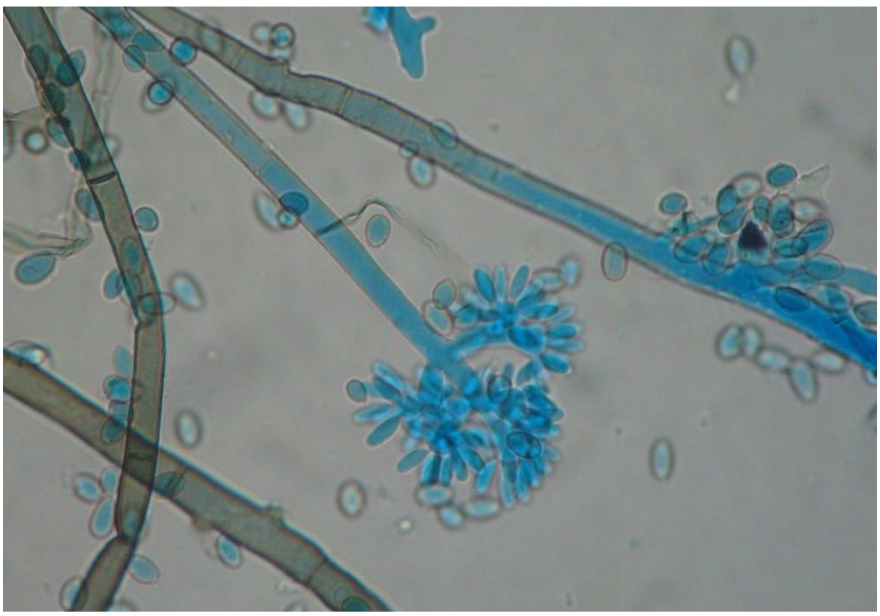
داده‌های آزمایش با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخهٔ ۹/۲ آنالیز شد. میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شد.

نتایج و بحث

شناسایی قارچ بیمارگر

پرگنهٔ قارچ جداشده از سیب، روی محیط کشت PDA به رنگ سفید تا سفید متمایل به خاکستری، کنیدیوفورها بلند و در بخش انتهایی منشعب، قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای و اغلب به طول ۲ میلی‌متر بودند.

کنیدیوم‌ها تک‌سلولی، بیضوی، گرد، منفرد، بی‌رنگ تا قهوه‌ای کمرنگ و به ابعاد ۱۴-۸ × ۹-۶ میکرومتر اندازه‌گیری شد. بر پایهٔ اطلاعات موجود، عامل بیماری به عنوان *B. cinerea* شناسایی شد و به تأیید استادان قارچ‌شناسی دانشگاه تهران رسید (شکل ۱).



شکل۱. نمای عمومی قارچ *B.cinerea*: شامل کنیدیوفور و کنیدی قارچ

بیماری‌زایی قارچ *B. cinerea* روی میوهٔ سیب

با مقایسهٔ نتایج حاصل از میوه‌های تیمارشده با *B. cinerea* و تیمار شاهد، قارچ *B.cinerea* روی میوهٔ سیب، دارای قابلیت بیماری‌زایی بود؛ به‌گونه‌ای که تیمار شاهد فاقد هرگونه علائم، و تیمار میوه با قارچ دارای پوسیدگی در محل تلقیح بود.

تأثیر اسانس بر رشد شعاعی پرگنهٔ قارچ

نتایج به‌دست‌آمده از بررسی اثر بیوکنترلی اسانس‌ها نشان دادکه بین نوع اسانس‌ها و غلظت‌های مختلف هر اسانس اثر معنی‌داری وجود دارد (جدول ۱). به‌طور کلی سه اسانس آویشن شیرازی، نعنافلفلی و زیرهٔ سبز نسبت به دو اسانس دیگر قابلیت بیوکنترلی بیشتری علیه *Botrytis cinerea* نشان دادند. اسانس آویشن شیرازی در غلظت ۵۰۰ و اسانس‌های زیرهٔ سبز و نعنافلفلی در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام، اثر ممانعت‌کنندگی کاملی بر رشد میسلیومی *Botrytis cinerea* داشتند. اسانس‌های مرزه و رزماری از نظر میزان بازدارندگی در مرتبهٔ بعد قرار گرفتند به‌گونه‌ای که بین غلظت‌های مشابه این دو اسانس تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد؛ برای مثال بین

دو اسانس، در غلظت ۱۲۵ پی‌پی‌ام تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (شکل ۲).

جدول ۱. تجزیهٔ واریانس داده‌های حاصل از بررسی قابلیت بیوکنترلی چند اسانس گیاهی بر قارچ *Botrytis cinerea*

منابع تغییرات	درجهٔ آزادی	میانگین مربعات MS
نوع اسانس	۴	۲۰۹۳۷/۴۴*
غلظت اسانس	۳	۱۰۴۳/۰۱*
نوع اسانس×غلظت اسانس	۱۲	۵۲۸۶/۷۴*
خطا	۴۰	۶/۵۶
ضریب تغییرات		۴/۴۶

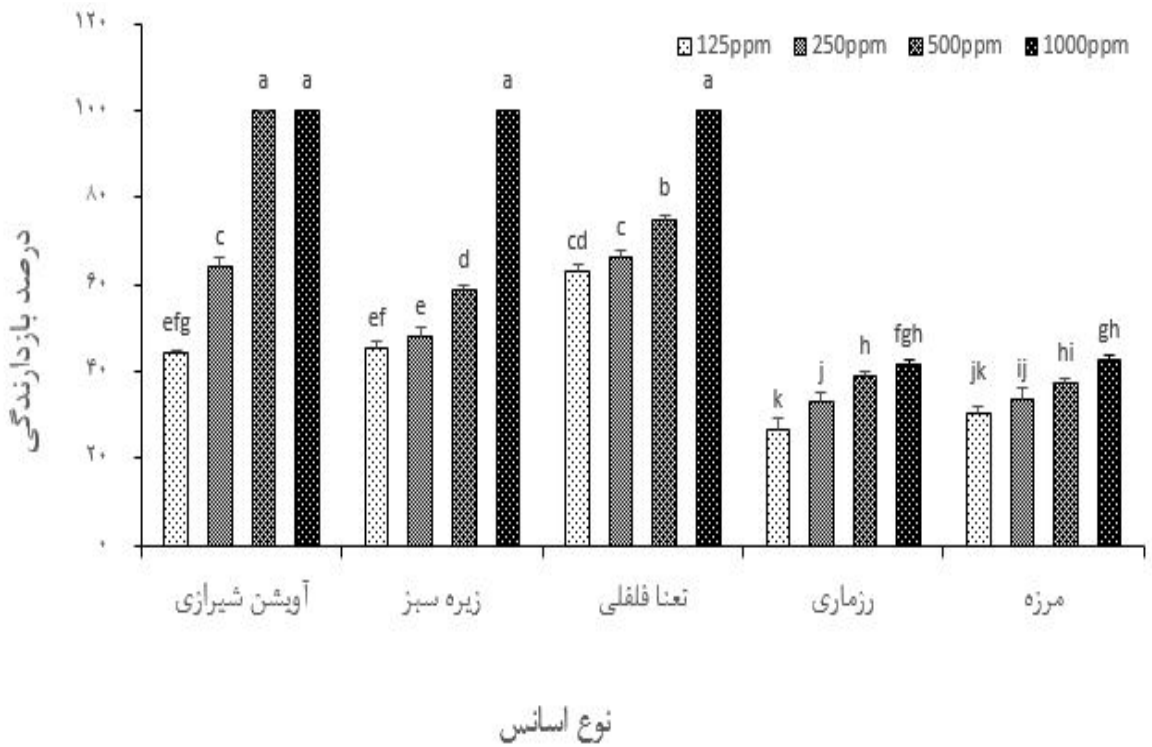
بررسی اثر قابلیت بیوکنترلی اسانس‌ها روی میوهٔ سیب تلقیح‌شده با قارچ *Botrytis cinerea*

پس از گذشت ۱۰ روز از تلقیح میوه‌ها، نتایج نشان داد که هر سه اسانس به‌طور معنی‌داری سبب کاهش پوسیدگی روی میوهٔ سیب شدند؛ اگرچه قابلیت بیوکنترلی اسانس‌های آزمایش‌شده با یکدیگر به‌طور معنی‌داری متفاوت بود به‌گونه‌ای که بهترین عملکرد مربوط به اسانس آویشن شیرازی با کاهش بیماری به میزان بیش از ۸۰ درصد است و دو اسانس زیرهٔ سبز و نعنافلفلی با داشتن اختلاف معنی‌دار نسبت به یکدیگر، با کاهش میزان آلودگی به‌ترتیب، ۷۲/۴ و ۶۳/۵۴ درصد در مرتبه‌های بعدی قرار گرفتند (شکل ۲).

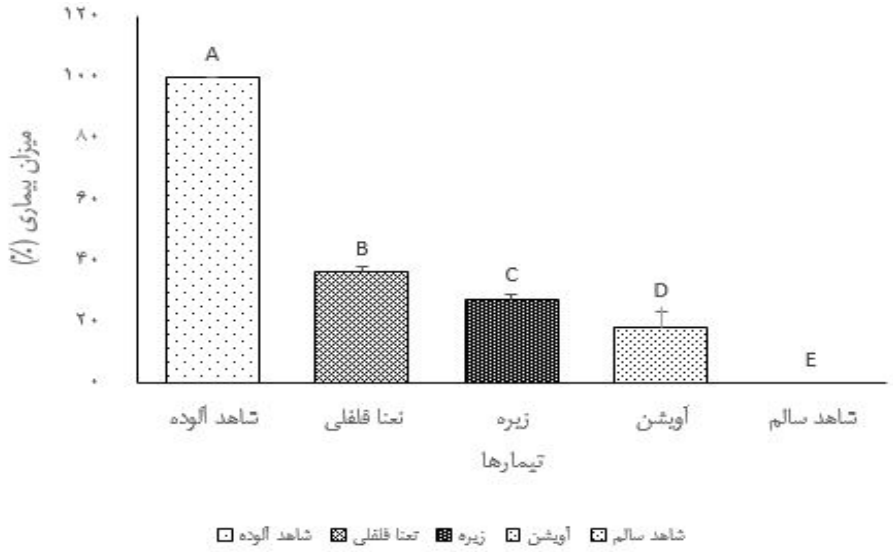
اجزای تشکیل‌دهندهٔ اسانس‌های مورد آزمایش

اسانس‌هایی که براساس شکل ۱ دارای بازدارندگی کامل بر رشد قارچ بودند با دستگاه گاز ـ کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی آنالیز و اجزای اصلی تشکیل‌دهندهٔ هر اسانس بررسی شدند؛ به‌گونه‌ای که مادهٔ شاخص در اسانس آویشن شیرازی و زیرهٔ سبز به‌ترتیب کارواکرول (۷۱/۱۹ درصد) و گاما ترپینن (۳۰/۴۱ درصد) و در مورد اسانس نعنافلفلی، منتول (۵۱/۱۹ درصد) تشخیص داده شد (جدول‌های ۲، ۳ و۴).

نتایج به‌دست‌آمده از واکشت دیسک‌های قارچی نشان داد که قارچ *B. cinerea* پس از گذشت یک هفته می‌تواند روی محیط کشت رشد کند که این حالت نشان‌دهندهٔ فعالیت قارچ ایستایی هر سه اسانس است.



شکل ۲. مقایسهٔ میانگین اثر بازدارندگی پنج اسانس گیاهی علیه رشد میسلیومی قارچ *Botrytis cinerea*
حروف غیرمشابه روی ستون‌ها نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵ درصد است.



شکل ۳. تأثیر اسانس‌های آویشن شیرازی، زیرهٔ سبز و نعنافلفلی در کاهش پوسیدگی ناشی از قارچ *B. Cinerea* در سیب.حروف غیرمشابه روی ستون‌ها نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح ۵ درصد است.

جدول ۲. نوع و درصد ترکیبات عمدهٔ شناسایی‌شده در اسانس *Z. multiflora*

ترکیب	شاخص بازداری (RI)	درصد
Carvacrol	۱۲۹۹	۷۱/۱۹
α-pinene	۹۳۷	۴/۲۴
Eucalyptol	۱۰۲۴	۳/۳۸
γ-Terpinene	۱۰۵۵	۳/۳۲
Globulol	۱۵۸۲	۲/۳۳
β- Myrcene	۹۸۵	۰/۸۵
Linalool	۱۰۹۰	۰/۶۹
Carvacrolmethyl ether	۱۲۴۳	۰/۴۹
Thymol methyl ether	۱۲۳۶	۰/۴۷
β-Pinene	۹۷۶	۰/۴۴
Trans-Caryophyllene	۱۴۱۸	۰/۳۹
Thujone	۹۳۰	۰/۲۱
جمع		۹۲/۱

* (Retention indices) شاخص بازداری به نسبت خروج آلکان‌های (C_{24} n-C_6) روی ستون DB-5 برآورد شده است.

جدول ۳. نوع و درصد ترکیبات عمدهٔ شناسایی‌شده در اسانس *C. cyminum*

ترکیب	شاخص بازداری (RI)	درصد
γ-Terpinene	۱۰۵۲	۳۰/۴۱
β-Pinene	۹۷۵	۱۹/۸۳
Cumin aldehyde	۱۲۶۶	۱۴/۱۱
p-Mentha-1,4-dien-7-al	۱۲۷۲	۱۳/۷۴
p-Mentha-1,3-dien-7-al	۱۲۶۹	۱۰/۷۸
p-Cymene	۱۰۱۵	۵/۴۰
Perill aldehyde	۱۱۸۲	۱/۶۱
α-Phellandrene	۱۰۰۰	۰/۷۴
α-Thujone	۹۳۵	۰/۴۳
جمع		۹۴/۶

* (Retention indices) شاخص بازداری به نسبت خروج آلکان‌های (C_{24} n-C_6) روی ستون DB-5 برآورد شده است.

جدول ۴. نوع و درصد ترکیبات عمدهٔ شناسایی‌شده در *M. piperita*

ترکیب	شاخص بازداری (RI)	درصد
Menthol	۱۱۷۱	۵۱/۱۹
Menthyl acetate	۱۲۹۵	۱۷/۲۴
Menthofuran	۱۱۶۴	۱۰/۸۸
1,8 Cineole	۱۰۳۱	۷/۳۲
Neomenthol	۱۱۶۵	۲/۴۷
Menthone	۱۱۵۲	۲/۳۳
(z)-Caryophyllene	۱۴۰۸	۲/۰۱
Germacrene D	۱۴۸۵	۱/۹۸
Neomenthyl acetate	۱۲۷۳	۰/۷۲
Isomenthyl acetate	۱۳۰۵	۰/۷۱
β-pinene	۹۷۹	۰/۶۲
cis-Sabinene hydrate	۱۰۷۰	۰/۵۳
β-Bourbonene	۱۳۸۸	۰/۲۸
α-Pinene	۹۳۹	۰/۲۶
E-*β*-farnesene	۱۴۵۶	۰/۲۴
Sabinene	۹۷۵	۰/۲۳
Bicyclogermacrene	۱۵۰۰	۰/۲۰
جمع		۹۹/۲۱

* (Retention indices) شاخص بازداری به نسبت خروج آلکان‌های (C_{24} n-C_6) روی ستون DB-5 برآورد شده است.

روش معمول برای تضمین امنیت غذایی در محصولات، از طریق اضافه‌کردن مواد ضد میکروبی است؛ این ترکیبات باعث ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های عامل تخریب محصولات یا کاهش قابل‌ملاحظهٔ آن‌ها می‌شوند. استفادهٔ گسترده از قارچ‌کش‌ها با کاستی‌های مهمی از جمله افزایش هزینه، مخاطرات مربوط به حمل و نقل، نگرانی در ارتباط با بقایای این ترکیبات در غذاها و محیط زیست مواجه است. آگاهی عمومی از این مخاطرات سبب ایجاد انگیزه‌ای مضاعف در پیداکردن مواد جایگزین ایمن‌تر برای قارچ‌کش‌های شیمیایی شده است که از جملهٔ این ترکیبات می‌توان به مواد طبیعی گیاهی مثل اسانس‌ها و اجزای آن‌ها اشاره کرد (Mine Soylu *et al.*, 2010; Burt 2004). این پژوهش به‌خوبی فعالیت بیوکنترلی اسانس‌های آویشن شیرازی، زیرهٔ سبز و نعنافلفلی را در شرایط محیطی و آزمایشگاهی علیه *B. cinerea* نشان می‌دهد و گویای این مطلب است که ترکیبات آلی دارای پتانسیل بالایی در زمینهٔ مدیریت بیماری‌های قارچی پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها هستند.

امروزه به‌منظور افزایش سرعت و در عین حال دقت آزمایش‌هایی که مستلزم اندازه‌گیری برخی صفات مورفولوژیکی است، از روش‌های مبتنی بر عکس‌برداری دیجیتال و آنالیز پیکسل استفاده می‌شود (Ruusuvuori *et al.*, 2014)؛ لذا بر آن شدیم که در این پژوهش به‌منظور اندازه‌گیری میزان رشد پرگنهٔ قارچ از روش آنالیز پیکسل استفاده کنیم. اگرچه دستگاه‌های تخصصی از جمله انواع پیشرفته‌تر دستگاه سنجش سطح برگ نیز وجود دارند که در صورت تضاد رنگ قابل تشخیص بین دو سطح، قابلیت آنالیز پیکسل به‌وسیلهٔ نرم‌افزار مربوطه را دارند، از آنجا که ممکن است استفاده از این دستگاه‌ها در همهٔ مراکز علمی کشور ممکن نباشد، در این پژوهش از روشی نوین با استفاده از قابلیت آنالیز پیکسل نرم‌افزار فتوشاپ استفاده شد که نه‌تنها روشی ساده، سریع و در دسترس محققان است بلکه از دقت کافی نیز برخوردار است.

در این مطالعه، از بین پنج اسانس گیاهی مورد آزمایش، اسانس‌های آویشن شیرازی در غلظت ۵۰۰ و زیرهٔ سبز و نعنافلفلی در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام به‌طور کامل رشد میسلیومی قارچ *B. cinerea* را مهار کردند، اما اسانس‌های گیاهان رزماری و مرزه اثر بیوکنترلی کاملی بر رشد پاتوژن نشان ندادند؛ این در حالی است که گیاهان آویشن شیرازی، نعنافلفلی، مرزه و رزماری متعلق به یک خانوادهٔ گیاهی هستند. به نظر می‌رسد که این تفاوت به نوع رفتار مقاومتی قارچ علیه ترکیبات مختلف موجود در اسانس‌های گیاهی بازمی‌گردد و مطابق با نتایج پژوهش‌های گذشته در این زمینه است (Soylu *et al.*, 2006; Soylu *et al.*, 2010). پیغامی آشنایی و همکاران گزارش کردند که اسانس زیره سبز در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام به طور کامل از رشد *B. cinerea* روی محیط کشت جلوگیری کرده‌است که با

نتایج تحقیق حاضر همخوانی دارد؛ همچنین گزارش کردند که میزان بازدارندگی اسانس نعنا فلفلی از رشد *B. cinerea* روی محیط کشت در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام به میزان ۶۹/۸۶ درصد بوده و این در حالی است که در تحقیق پیش رو، اسانس نعنا فلفلی در غلظت مشابه، سبب بازدارندگی کامل از رشد قارچ شده که با نتایج آنها مغایرت دارد (Peighami-Ashnaei *et al.*, 2008). رنجبر و همکاران گزارش کردند که حداقل غلظت بازدارندگی کامل اسانس نعنافلفلی بر رشد قارچ *B. cinerea* بیشتر از ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام است که در تضاد با نتایج این پژوهش است (Ranjbar *et al.*, 2009). ازآنجا که روش استفاده‌شده در هر دو پژوهش یکسان بوده است مغایرت ایجادشده در نتیجهٔ به‌دست‌آمده از بررسی اثر بازدارندگی اسانس نعنافلفلی در مهار رشد میسلیومی *B. Cinerea* صرف‌نظر از تفاوت احتمالی در مقاومت جدایه‌های قارچی، ممکن است ناشی از روش اختلاط اسانس با محیط کشت باشد؛ با توجه به فراربودن اسانس‌های گیاهی احتمال تبخیر اسانس در فرایند اختلاط با محیط کشت وجود دارد. همچنین بر اساس گزارش فرشباف‌مقدم و همکاران، شرایط محیطی بر میزان عملکرد و درصد اجزای تشکیل‌دهندهٔ اسانس تأثیر دارد بنابراین ممکن است اختلاف مشاهده‌شده، ناشی از تفاوت شرایط محیط رشد گیاهان اسانس‌گیری شده (Farshbaf-Moghadam *et al.*, 2005) و حتی روش‌های مختلف خشک‌کردن گیاه و اسانس‌گیری باشد (Kayhani *et al.*, 2014). صفری و همکاران طی گزارشی بیان کردند اسانس گیاه مرزهٔ خوزستانی در غلظت ۳۰۰ میکرولیتر در لیتر محیط کشت و نیز اسانس نعنا فلفلی در غلظت ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر محیط کشت سبب بازدارندگی کامل از رشد قارچ *Penicillium expansum* شده است (Safari *et al.*, 2014) ؛ در حالی که در پژوهش حاضر، اسانس گیاه مرزه تابستانی حتی در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام نیز بازدارندگی کاملی از رشد *B. cinerea* نشان نداد و در مورد اسانس نعنا فلفلی، بازدارندگی کامل از رشد قارچ *B. cinerea* در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام بدست آمد.

بررسی اسانس زیرهٔ سبز در کنترل قارچ *B. cinerea* نشان داد که اگرچه بین غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام تفاوت معنی‌دار وجود دارد، این تفاوت، تأثیر ناچیزی بر بازدارندگی اسانس داشته درصورتی‌که با تغییر غلظت از ۵۰۰ به ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام با افزایش تقریباً دو برابری در قابلیت بیوکنترلی اسانس مواجه هستیم که مطابق با تحقیقات رنجبر و همکاران است (Ranjbar *et al.*, 2009). 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 اجزای تشکیل‌دهندهٔ آن‌ها بستگی دارد؛ بنابراین به نظر می‌رسد تأثیرات ضدقارچی اسانس زیرهٔ سبز ضمن اینکه تحت تأثیر ترکیب غالب اسانس است، پتانسیل سمیت اسانس‌ها به علت اثر هم‌افزایی[1] بین اجزای تشکیل‌دهندهٔ آن نیز می‌باشد؛ بنابراین احتمال کمی برای توسعهٔ نژادهای مقاوم قارچ، پس از کاربرد اسانس بر روی میوه‌ها و سبزی‌ها وجود دارد (Plotto *et al.*, 2002).

به دلیل آنکه اسانس‌های مختلف بررسی شده در این پژوهش، دارای درصد و اجزای تشکیل‌دهندهٔ متفاوت بودند، با مقایسهٔ نتایج فعالیت ضدقارچی این اسانس‌ها، به‌خوبی می‌توان استنباط کرد که نوع اسانس و اجزای تشکیل‌دهندهٔ آن‌ها می‌توانند نقش اساسی در فعالیت بیوکنترلی اسانس‌ها ایفا کنند. اجزای اصلی سه اسانس آویشن شیرازی، زیرهٔ سبز و نعنا فلفلی از گروه ترکیبات فنولی‌اند و به‌خوبی آشکار شده است که اجزای فنولیکی اسانس‌ها دارای بالاترین فعالیت ضد میکروبی هستند و آلدهیدها، کتون‌ها و الکل‌ها در رتبه‌های بعد قرار می‌گیرند (Özcan and Boyraz, 2000). بخش گسترده‌ای از مطالعات در مورد سازوکار اثر ترکیبات فنولی، مربوط به تأثیر آنها بر غشای سلولی و تغییر کارایی غشاها و در برخی موارد، تغییر در ساختار آنها است که باعث افزایش آماس و نفوذپذیری غشای سلولی می‌شود (Skocibusic *et al.*, 2006). الکل‌های ترپنوئیدی به‌واسطهٔ تجزیه و آب‌گیری پروتئین‌های میکروارگانیسم‌ها باعث توقف رشد آنها می‌شوند (Martinez-Romero *et al.*, 2005).

پژوهش‌های متعددی به‌منظور پی بردن به سازوکار اسانس‌ها انجام گرفته است؛ به‌طور مثال مشخص گردیده است که اسانس *Citrus sinensis* باعث دو شاخه‌ای شدن نوک هیف[2] و جوانه‌زنی فراوان در هیف رویشی *Aspergillus niger* شده که منجر به از دست رفتن کامل سیتوپلاسم هیف شده است (Sharma and Tripathi 2008)؛ بر اساس مطالعات تریپاتی و همکاران به نظر می‌رسد که اسانس‌ها به دلیل داشتن ترکیبات متعدد، دارای چندین سازوکار اثرند (Tripathi *et al.*,

1. Synergist
2. Bifurcation of hyphal apex

2004). اخیراً بررسی سازوکار ضدقارچی اسانس‌ها نشان می‌دهد که این مواد باعث بیش‌قطبیت میتوکندریایی[1] در قارچ‌ها شده که نشان‌دهندهٔ اختلال در فعالیت میتوکندری است؛ همچنین اسانس‌ها باعث تولید گونه‌های فعال اکسیژن[2] درون سلولی می‌شوند و این مطلب گویای این حقیقت است که ROSها به عنوان واسطهٔ عملکرد ضدقارچی اسانس‌ها عمل می‌کنند؛ اختلال فعالیت میتوکندری باعث ترقیب تجمع ROS در سلول شده و از طریق آسیب اکسیداتیو به درشت‌مولکول‌های‌زیستی[3] یا میانجی‌گری در مرگ برنامه‌ریزی‌شدهٔ سلول[4]، در نهایت باعث مرگ آن می‌شوند؛ بنابراین غشای سلول و میتوکندری، هدف‌های اصلی اسانس‌ها هستند (Chen *et al.*, 2013).

در این پژوهش بین غلظت‌های ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام دو اسانس زیرهٔ سبز و نعنافلفلی در شرایط آزمایشگاهی تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد، اما هر دو اسانس به‌طور کامل از رشد کلنی قارچ ممانعت کردند و این در حالی است که تیمار دو اسانس روی میوهٔ سیب در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام دارای تفاوت معنی‌داری با یکدیگر هستند؛ شاید بتوان علت این امر را به واکنش متفاوت بافت میوه به ترکیب غالب دو اسانس نسبت داد.

با توجه به نتایج این تحقیقات می‌توان گفت که اسانس‌ها ضمن تأمین سلامت و ایمنی محصولات می‌توانند به‌عنوان جایگزینی برای مواد شیمیایی استفاده شوند.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله از جناب آقای دکتر مسعود احمدزاده، استاد بخش بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه تهران، بابت راهنمایی‌های ارزندهٔ ایشان طی این پژوهش، مراتب تشکر و قدردانی خود را ابراز می‌دارند.

REFERENCES

Burt S (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology 94(3): 223-253.

Chen Y, Zeng H, Tian J, Ban X, Ma B, Wang Y (2013) Antifungal mechanism of essential oil from Anethum graveolens seeds against *Candida albicans*. Journal of medical microbiology 62(8): 1175-1183.

Derwich E, Benziane Z, Taouil R, Senhaji O, Touzani M (2010) Comparative essential oil composition of leaves of *Mentha rotundifolia* and *Mentha pulegium* a traditional herbal medicine in Morocco. American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture 4(1): 47-54.

Droby S (2005) Improving quality and safety of fresh fruits and vegetables after harvest by the use of biocontrol agents and natural materials. *In*: the 1st International Symposium on Natural Preservatives in Food Systems, 30-31 Mar., Princeton, USA, 709.

Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, Delen N (2004) Botrytis: biology, pathology and control. Kluwer Academic Publishers, the Netherlands.

Ellis M B, (1971) Dematiaceous Hyphomycetes. Commonwealth Mycological Institute, Kew, England.

Farshbaf-Moghadam M, Omidbaigi R, Sefidkon F (2005) Evaluation of the effect of environmental condition on yield and composition of Mexican tagetes essential oil. Journal of Medicinal Plants 5(18). (In persian).

Hadizadeh I, Peivastegan B, Hamzehzarghani H (2009) Antifungal Activity of Essential Oils from Some Medicinal Plants of Iran against *Alternaria alternata*. American Journal of Applied Sciences 6(5): 857.

Hosseinzadeh H, Ramezani M, Salmani G (2000) Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Zataria multiflora* Boiss extracts in mice and rats. Journal of ethnopharmacology 73(3): 379-385.

Jobling J (2000) Essential oils: a new idea for postharvest disease control. Good Fruit and Vegetables magazine, 11: 50.

Kayhani A, Sefidkon F, Monfared A (2014) The effect of drying an distillation methods on essential oil content and composition of *Satureja sahandica* Bornm. Iranian Journal of medicinal and aromatic plants 30(2). (In persian).

Lopez-Reyes J G, Spadaro D, Gullino M L, Garibaldi A (2010). Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rot caused by fungi on four cultivars of apples in vivo. Flavor and fragrance journal 25(3): 171-177.

Martinez-Romero D, Castillo S, Serrano M, Valverde J M, Guillen F, Valero D (2005) The use of natural aromatic essential oils helps to maintain postharvest quality of Crimson table grapes. Acta Horticultuare 682: 1723-1727.

Özcan M, Boyraz N (2000) Antifungal properties of some herb decoctions. European Food Research and Technology 212(1): 86-88.

Peyghami-Ashnaei S, Farzaneh M, Hadian J, Sharifi-Tehrani A, Ghorbanpoor M (2008) Evaluation of antifungal activity of some plant essential oils against the grey mold of apple caused by *Botrytis cinerea*. Agricultural research: water, soil and plant in agriculture 7(3). (In persian).

Pintore G, Usai M, Bradesi P, Juliano C, Boatto G, Tomi F, Casanova J (2002) Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. Flavor and Fragrance Journal 17(1): 15-19.

Plotto A, Roberts D, Roberts R (2002) Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato *(Lycopersicon esculentum). In:* the 26th International Horticultural Congress: Issues and Advances in Postharvest Horticulture, 11-17 Aug., Toronto, Canada, 628.

Rahemi M (2004) An introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamental plants. Shiraz University, Shiraz, Iran. (In Persian).

Ranjbar H, Farzaneh M, Hadian J, Mirjalili M H, Sharifi R (2009) Antifungal effect of some essential oils against postharvest diseases of strawberry. Pajouhesh and Sazandegi 81: 54-60 (In Persian).

Ruusuvuori P, Lin J, Scott A C, Tan Zh, Sorsa S, Kallio A, Nykter M, Yli-Harja O, Shmulevich I, Dudley A M (2014) Quantitative analysis of colony morphology in yeast. BioTechniques 56(1): 18.

Safari N, Hemmati R, Farzane M, Chegini S (2014) Study on three essential oils from *Mentha piperita*, *Thymus daenensis* and *Satureja khuzistanica* for controlling *Penicillium expansum* against of Apple Blue Mould. Applied researches in plant protection 3(1): 19-33. (In Persian).

Shafiee A, Javidnia K (1997) Composition of essential oil of *Zataria multiflora*. Planta medica 63(04): 371-372.

Shaiq Ali M, Saleem M, Ali Z, Ahmad V U (2000) Chemistry of *Zataria multiflora* (Lamiaceae). Phytochemistry 55(8): 933-936.

Sharma N, Tripathi A (2008) Effects of *Citrus sinensis* L. Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* L. Van Tieghem. Microbiological Research 163(3): 337-344.

Skocibusic M, Bezic N, Dunkic V (2006) Phytocemical composition and antimicrobial activities of the essential oil from *Satureja subspicata* Vis. Growing in Crotia. Food Chemistry 96: 20-28.

Soylu E M, Kurt Ş, Soylu S (2010) *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mold disease agent *Botrytis cinerea*. International journal of food microbiology 143(3): 183-189.

Soylu E M, Soylu S, Kurt S (2006) Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia 161(2): 119-128.

Steinegger E, Hänsel R (1972). Lehrbuch der Pharmakognosie. Auf phytochemischer Grundlage. Angewandte Chemie, 86(18): 681-682.

Tavassoli S, Mousavi S, Emam-Djomeh Z, Razavi S (2011) Comparative Study of the Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil and Methanolic Extract. Middle-East Journal of Scientific Research 9(4): 467-471.

Tripathi P, Dubey N, Shukla A (2008) Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mold of grapes caused by *Botrytis cinerea*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 24(1): 39-46.

Tripathi P, Dubay N K (2004) Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables review. Postharvest Biology and Technology 32: 235-245.

Tyler V E, Brady L R, Robbers J E (1988). *Pharmacognosy* (9th Ed.). Lea & Febiger, Philadelphia, Pa, USA.

Viret O, Keller M, Jaudzems V G, Cole F M (2004) *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. Phytopathology 94(8): 850-857.

Zhao H, Kim Y K, Huang L, Xiao C L (2010) Resistance to thiabendazole and baseline sensitivity to fludioxonil and pyrimethanil in *Botrytis cinerea* populations from apple and pear in Washington State. Postharvest biology and technology. 56(1): 12-18.

Znini M, Bouklah M, Majidi L, Kharchouf S, Aouniti A, Bouyanzer A, Al-Deyab S (2011) Chemical composition and inhibitory effect of *Mentha spicata* essential oil on the corrosion of steel in molar hydrochloric acid. International Journal of Electrochemistry Science 6: 691-704.