

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

۱. مهدی داوری*؛ ۲. رباب اعزازی

۱. استادیار بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده 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 حمله 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 منطقه مشکین شهر شد و قارچ‌های *Botrytis cinerea* و *Cladosporium cladosporioides* به‌عنوان گونه‌های غالب شناسایی شدند. *Aspergillus tubingensis* نیز به‌عنوان عامل پوسیدگی و زهرا به‌زا (توکسین‌زا) روی انگور و کشمش برای این بررسی انتخاب شد. سپس به منظور ارزیابی امکان کنترل زیستی (بیولوژیک) آن‌ها، تأثیر دو گونه *Trichoderma harzianum* T447 و *T. hamatum* T622 و اسانس چهار گیاه دارویی پونه کوهی، نعناع خوراکی، رازیانه و بومادران در شرایط آزمایشگاهی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که هر دو گونه قارچ آنتاگونیست در رقابت تغذیه‌ای موفق‌تر از قارچ‌های بیمارگر هستند، ترکیبات فرار این قارچ‌ها بیشترین تأثیر بازدارندگی را در تعامل با *C. cladosporioides* نشان دادند. غلظت ۱۰ درصد ترشحات برون‌یاخته‌ای جدایه *T. harzianum* T447 نیز بازدارندگی بیش از ۸۵ درصد علیه قارچ‌های بیمارگر نشان داد. همچنین معلوم شد که بین گونه قارچی، نوع اسانس و غلظت‌های مختلف آن در میزان بازدارندگی از رشد میسلیمی قارچ‌ها تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0.01$) وجود دارد. پونه کوهی و رازیانه به ترتیب به‌عنوان مؤثرترین و ضعیف‌ترین اسانس‌ها شناخته شدند. تجزیه GC-MS چهار اسانس نام‌برده نیز نشان داد که به ترتیب پی‌پریتون و سیس‌پی‌پریتون اکسید، ال‌متون، دی‌متیل-۴-۶-کتادین-۲-ال و ترنس‌آنتول اجزای اصلی آن‌ها هستند. با توجه به بازدارندگی مناسب اسانس‌ها و قارچ‌های کنترل زیستی نام‌برده، تحقیقات تکمیلی در زمینه به‌کارگیری آن‌ها برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت انگور توصیه می‌شود.

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

مقدمه

برداشت‌شده، به‌وسیله بیمارگرها در طی فرآیندهای برداشت، حمل‌ونقل و انبارداری آسیب می‌بینند (Zhu و Singh and Sharam 2006, 2007). میزان این آسیب و زیان در کشورهای درحال توسعه به دلیل نبود انبارهای

ضایعات پس از برداشت میوه‌ها و سبزی‌ها، آسیب و زیان شایان توجهی به تولیدکنندگان وارد می‌کنند، به‌طوری‌که حدود ۲۰-۲۵ درصد میوه‌ها و سبزی‌های

برای سموم شیمیایی معطوف کرده است (Bouchra et al. 2009, Droby et al. 2003). 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، نعنای، 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* spp.، *Fusarium* spp.، *Rhizoctonia solani*، *Alternaria alternata*، *Sclerotinia sclerotiorum*، *Phytophthora infestans* و *Penicillium digitatum* از خود نشان دادند (Daferera et al. 2003, Özcan et al. 2007, Rasooli et al. 2006, Soylu et al. 2007, Bluma and Etcheverry 2008, Farzaneh et al. 2015). پونه کوهی با نام علمی *Mentha longifolia* گیاهی معطر از خانواده نعنائیان است که خواص حشره‌کشی (Khani and Asghari 2012)، ضدآکسیدانی، ضدباکتریایی و ضدقارچی (Gulluce et al. 2007) آن به اثبات رسیده است. نعنای خوراکی با نام علمی *M. spicata* یکی از مهم‌ترین و پرکاربردترین گونه‌های نعنای در طب سنتی است که خواص ضدانگلی (Govindarajan et al. 2012)، ضدآکسیدانی، ضدقارچی (Kanatt et al. 2007) و ضد میکروبی (Dhifi et al. 2013) دارد. رازیانه با نام علمی *Foeniculum vulgare* یکی از گیاهان دارویی با پراکنش گسترده از خانواده Apiaceae است و اسانس این گیاه خواص بیولوژیکی متعدد مانند خاصیت ضدآکسیدانی (Ruberto et al. 2000)، ضددیابتی (El-Soud et al. 2011)، حشره‌کشی (Lee 2004) و ضد میکروبی (Özcan et al. 2006) دارد. جنس بومادران (*Achillea*) یکی از مهم‌ترین جنس‌های متعلق به تیره مرکبان (Asteraceae) است و فعالیت ضد میکروبی و ضدآکسیدانی (Baris et al. 2006) این گیاه بررسی و اثبات شده است. خاصیت ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی به ترکیب شیمیایی ماده مؤثره آن بستگی دارد، ترکیبات ضد میکروبی اسانس‌های گیاهی به‌طور عموم ترین‌ها هستند که ماهیت فنولی دارند و اغلب

مناسب و سامانه حمل‌ونقل مناسب بسیار بیشتر است (Sharma et al. 2009). میوه انگور همانند دیگر محصولات باغی به دلیل داشتن رطوبت بالا، pH پایین و غنی بودن از مواد غذایی در معرض حمله انواع بیمارگرهای قارچی در مراحل برداشت و انبارداری قرار دارد. قارچ‌هایی مانند *Aspergillus*، *Botrytis cinerea*، *Rhizopus stolonifer*، section Nigri و *Cladosporium* spp. از مهم‌ترین عامل‌های محدودکننده 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 قابل توجهی 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 میوه انگور و فرآورده‌های آن اهمیت خاصی دارند (Chiotta et al. 2009). پوسیدگی کلادوسپوریومی ناشی از دو گونه *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 درباره 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

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 اتافک رشد (انکوباتور)، شناسایی گونه‌ها با استفاده از کلیدهای Beaver 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 آلوده آذربایجان شرقی جداسازی شده بود (اهدایی از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه تبریز)، برای این منظور انتخاب شد.

تهیه قارچ‌های کنترل زیستی

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

تهیه مواد گیاهی و استخراج اسانس

مواد گیاهی مورد بررسی شامل پونه 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 به‌وسیله سولفات سدیم خشک‌آوری 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 تشکیل‌دهنده اسانس‌های گیاهی،

به دیواره و غشای باخته‌های قارچ‌ها آسیب وارد می‌کنند، البته ممکن است مکان‌های هدف دیگری هم در باخته قارچی داشته باشند (Tabassum and Vidyasagar 2013). راهکار دیگر برای مبارزه با بیمارگرهای گیاهی، به‌ویژه بیمارگرهای پس از برداشت، استفاده از ریز جانداران (میکروارگانسیم‌های) آنتاگونیست از جمله قارچ‌های آنتاگونیست است که می‌تواند یک جایگزین مؤثر و امیدبخش برای مبارزه شیمیایی باشد (Monte 2001). گونه‌های متعلق به جنس *Trichoderma* مشهورترین و مؤثرترین جنس قارچی در زمینه کنترل زیستی بیمارگرهای گیاهی است که بعضی از سویه (استرین)‌های آن به مرحله 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 میوه انجیر و خرمالو (Batta 2001)، *Penicillium expansum* میوه سیب (Batta 2004)، مرکبات (*B. cinerea*) (Borras and Aguilar 1990)، 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 کمی و کیفی این قارچ‌ها به‌ویژه آلودگی به زهرابه‌های قارچی ناشی از *A. tubenginsis* تأثیر اسانس گیاهان دارویی پونه کوهی (*M. longifolia*)، نعناع خوراکی (*M. spicata*)، رازیانه (*F. vulgare*)، بومادران (*Achillea sp.*) و دو گونه تریکودرما شامل *T. hamatum* و *T. harzianum* T447 در کنترل زیستی قارچ‌های *B. cinerea* T622 در کنترل زیستی قارچ‌های *A. tubingensis* و *C. cladosporioides* که مهم‌ترین قارچ‌های بیماری‌زای پس از برداشت انگور در منطقه مشگین‌شهر استان اردبیل به عنوان یکی از مناطق مهم انگور کاری شمال غرب کشور به شمار می‌آیند، بررسی شد.

مواد و روش‌ها

جداسازی و تهیه بیمارگر

در اواخر تابستان ۹۳ هم‌زمان با رسیدن میوه‌های انگور در منطقه مشگین‌شهر، میوه‌های انگور مشکوک به

Abbott: $IP = C - T / C \times 100$

IP= (Inhibitory percentage) درصد بازدارندگی

C=Check میانگین قطر هاله قارچ در تیمار شاهد

T=Treatment میانگین قطر هاله 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. hamatum* و *T. harzianum* T447

T622 در رقابت با قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی

دیسک‌های میسلیمی به قطر ۵ میلی‌متر از کشت تازه جدایه‌های دو گونه *Trichoderma* و قارچ‌های بیمارگر بافاصله ۱/۵ سانتیمتر از حاشیه 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 پرگنه قارچ آنتاگونیست از دیسک میسلیمی محیط کشت سترون استفاده شد. اندازه‌گیری شعاع پرگنه‌های قارچی که به سمت یکدیگر در حال رشد بودند، تا هنگامی که پرگنه تیمارهای شاهد به نزدیک لبه 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 غیرفرار و پادزی‌های تولیدشده

به‌وسیله قارچ‌های آنتاگونیست بر رشد قارچ‌های بیمارگر برابر روش دنیس و ویستر از کشت هفت روزه تریکودرما در محیط مایع PDB، عصاره 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 عصاره برون یاخته‌ای در محیط کشت PDA تهیه و قارچ‌های بیمارگر در آن کشت داده شدند. در تیمار شاهد از آب مقطر سترون به جای عصاره برون یاخته‌ای استفاده شد.

از دستگاه فام‌نگاری (کروماتوگرافی) گازی مدل Agilent-7890A مجهز به ستون HP-5MS به طول ۳۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه 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 محفظه 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 تشکیل‌دهنده اسانس‌ها با استفاده از فراسنجه (پارامتر)های مختلف مانند زمان بازداری، بررسی طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیب‌های استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MS صورت گرفت (Farzaneh et al. 2015).

سنجش تأثیر ضدقارچی اسانس‌های گیاهی

تأثیر ضدقارچی اسانس‌های استخراج‌شده روی سه گونه 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 تهیه غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر اسانس در لیتر محیط کشت به فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDA سترون با دمای ۴۵-۴۲ °C اضافه و به هم زده شد تا نامیزه 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 هاله هر قارچ به‌طور روزانه و تا هنگامی که سطح محیط کشت تشتک‌های پتری شاهد توسط قارچ به‌طور کامل 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:

تأثیر اسانس‌های گیاهی بر رشد قارچ‌های بیمارگر

نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر بازدارندگی اسانس‌های مورد استفاده نشان داد که از نظر میزان بازدارندگی از رشد، بین نوع اسانس، گونه قارچی و غلظت‌های مختلف اسانس‌ها تفاوت معنی‌داری ($P \leq 0/01$) وجود دارد (جدول ۱). در مجموع، *B. cinerea* به‌عنوان حساس‌ترین گونه قارچی شناخته شد، به‌طوری‌که غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر همه اسانس‌ها به‌استثنای اسانس رازیانه به‌طور کامل بازدارنده رشد آن شدند و حتی در غلظت ۶۰۰ میکرولیتر بر لیتر، اسانس پونه کوهی نیز نتیجه 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 نعنای خوراکی (۳۶درصد)، بومادران (۲۴درصد) و رازیانه (۲۵/۵۵درصد) کمتر از ۵۰ درصد ثبت شد (جدول ۲). همچنین اسانس پونه کوهی و نعنای 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 مورد استفاده قادر به مهار کامل قارچ‌های بیماری‌زای مورد بررسی نبود (جدول ۲). 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 مورد استفاده 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 پونه 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 نعنای خوراکی علیه *B. cinerea* و *C. cladosporioides* و بالاترین غلظت اسانس بومادران علیه *B. cinerea* مشاهده شد.

تشتک‌های مایه‌زنی‌شده در دمای 25°C نگهداری و درصد کاهش رشد پرگنه بیمارگر نسبت به شاهد، به عنوان معیاری برای ارزیابی اثر ضد میکروبی سوخت‌وسازهای مایع برون یاخته‌ای قارچ‌های آنتاگونیست استفاده شد (Dennis and Webster 1971c).

بررسی تأثیر ترکیبات فرآر قارچ‌های آنتاگونیست روی رشد قارچ‌های بیمارگر

تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت PDA مایه‌زنی‌شده با قارچ تریکودرما و بیمارگر (جدداگانه) درون هود لامینار و کنار شعله روبه‌روی هم قرار داده شده و شکاف بین دو تشتک پتری با استفاده از نوار پارافیلیم به منظور جلوگیری از خروج مواد فرآر تولیدشده به‌وسیله قارچ آنتاگونیست مسدود شد. سپس تشتک‌های پتری به اتاقک رشد با دمای 25°C منتقل و قطر پرگنه 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.

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه 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 آلوده‌کننده 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 و شناسایی شدند. یک جدایه از گونه 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.

جدول ۱. تجزیه 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 |

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

جدول ۲. درصد بازدارندگی ناشی از کاربرد غلظت‌های مختلف اسانس‌های پونه کوهی، نعناع خوراکی، بومادران و رازیانه در جلوگیری

از رشد سه قارچ عامل پوسیدگی میوه 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 <i>B. cinerea</i> | Inhibition percent of <i>A. tubingensis</i> | Inhibition percent of <i>C. cladosporioides</i> |
|---------------------------|-----------------------------|---|---|---|
| <i>M. longifolia</i> | 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 |
| <i>M. spicata</i> | 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 |
| <i>Achillea</i> 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 |
| <i>Foeniculum vulgare</i> | 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 $p \leq 0.05$ 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

نعناع را تشکیل می‌دهد (جدول ۴). ترکیب 2,7-dimethyl-4(E), 6-octadien-2-ol (۳۵/۴۰ درصد) ماده شاخص اسانس بومادران است. همچنین ترکیباتی مانند 1,8-Cineole (۹/۵ درصد) و Borneol (۵/۹۹ درصد) از اجزای اصلی اسانس یادشده هستند (جدول ۵). ترکیبات اصلی در اسانس رازیانه نیز شامل trans-Anethole (۶۸/۸۸ درصد) و L-Fenchone (جدول ۶). (۱۲/۲۷ درصد) است (جدول ۶).

شناسایی ترکیبات اسانس گیاهان مورد استفاده 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 (۱۵/۴ درصد)، اجزای اصلی شناسایی شده در اسانس پونه کوهی هستند (جدول ۳). ترکیب L-Menthone (۵۱/۰۹ درصد) قسمت عمده اسانس

جدول ۳. نوع و درصد ترکیب‌های عمده شناسایی شده در اسانس پونه 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 عمده شناسایی شده در اسانس نعنای 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 |
| Isocaryophyllene | 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 عمده 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 |

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

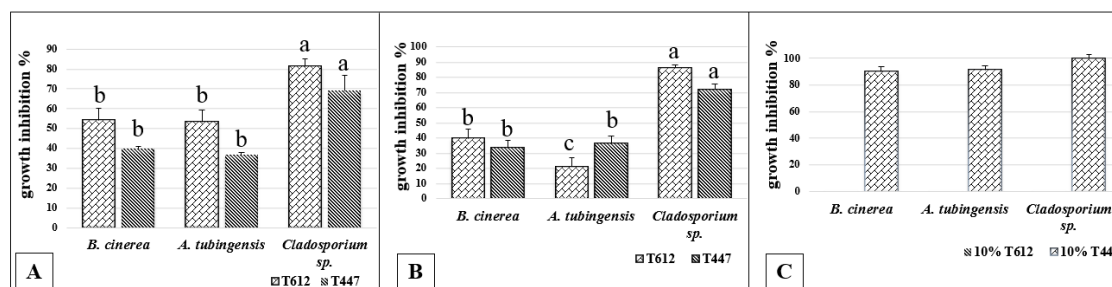
Table 6. Type and percent of main components identified in the essential oil of fennel (*F. vulgare*)

| 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 |

شد. جدایی *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 شایان توجه 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).

تأثیر قارچ‌های آنتاگونیست روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در روش کشت متقابل

نتایج به‌دست‌آمده از مقایسه میانگین بازدارندگی از رشد سه قارچ بیماری‌زای انگور توسط دو جدایی قارچ آنتاگونیست با استفاده از آزمون توکی نشان داد که بیشترین درصد بازدارندگی در تعامل بین جدایی *T. hamatum* T612 و قارچ بیماری‌زای *C. cladosporioides* مشاهده می‌شود که میانگین آن ۸۱/۱۱ درصد محاسبه



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

حروف متفاوت روی ستون‌های همسان بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها با استفاده از آزمون توکی در $P < 0.05$ 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 metabolite, 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 $P < 0.05$.

بیماری‌زای مورد آزمایش متفاوت است (شکل ۱، B). بیشترین درصد بازدارندگی رشد مربوط به ماده فرار ترشح‌شونده از *T. hamatum* T612 در برابر قارچ *C. cladosporioides* با میزان بازدارندگی ۸۶/۲۲ درصد مشاهده شد. همچنین ترکیبات فرار 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.

تأثیر سوخت‌وسازهای فرار قارچ‌های آنتاگونیست روی رشد میسلیمی قارچ‌های بیمارگر

مقایسه میانگین داده‌های به‌دست‌آمده از تأثیر ترکیبات فرار قارچ‌های آنتاگونیست به روش توکی نشان می‌دهد که مواد فرار ترشح‌شونده از قارچ‌های آنتاگونیست، تأثیر معنی‌داری در بازداری از رشد قارچ‌های بیمارگر داشته‌اند. درصد بازدارندگی مواد فرار ترشح‌شونده از جدایه‌های قارچ آنتاگونیست بسته به جدایی قارچ آنتاگونیست و نیز بسته به گونه قارچ

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 ضد میکروبی دارند و تفاوت در فعالیت ضدقارچی اسانس‌های گیاهی به اجزاء تشکیل‌دهنده آن‌ها بستگی دارد. یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت 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 گزارش شده که سبب افزایش توان ضد میکروبی 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 (میکوپارازیتسم)، تأثیر ترشحات مایع برون یاخته‌ای و ترکیبات فرآر ظاهر می‌شود (Howell 2003). نکته 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 گونه قارچ تریکودرما در رقابت تغذیه‌ای در برابر قارچ‌های بیمارگر مختلف مورد بررسی است. در آزمون کشت متقابل، هر دو جدایه *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

تأثیر مواد غیرفرآر و پادزی‌های ترشح‌شده به‌وسیله قارچ‌های آنتاگونیست بر رشد قارچ‌های بیمارگر نتایج نشان داد که غلظت ۱۰ درصد ترشحات برون یاخته‌ای غیرفرآر *T. harzianum* T447 به نحو مؤثری از رشد میسلیمی قارچ‌های بیماری‌زا جلوگیری کرده، به‌طوری‌که بازدارندگی کامل و خاصیت قارچ ایستایی علیه *C. cladosporioides* و بازدارندگی بالای ۸۵ درصد علیه دو قارچ دیگر مشاهده شد (شکل ۱، C). در برابر، ترشحات برون یاخته‌ای غیرفرآر *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 درعین حال ایمن، توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است. این ترکیبات نه تنها بدون تأثیر جانبی بوده، بلکه به‌علت خواص ضداسندگی، کیفیت و طول دوره انبارداری میوه‌ها را نیز افزایش می‌دهند (Arras and Usai 2001, Plotto *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 پونه کوهی بیشترین خاصیت ضدقارچی را دارد. ترکیبات پیپریتون‌اکسید، سیس‌پیپریتون‌اکسید و پولگون به عنوان ترکیبات مؤثره اسانس پونه 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

غیرفرار تریکودرما حاوی آنزیم‌های چندی مانند سلولاز، کیتیناز، لامیناریناز و بتا ۱ و ۳ گلوکاناز و پادزی‌هایی مانند تریکودرمین، تریکوتوکسین، پاراسلین، درمادین و آلامتیسین 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. koningii* و *T. hammatum* نقش مهمی دارد (Okuda et al. 1982).

به‌طورکلی نتایج این تحقیق گویای قابلیت کنترل زیستی بالای اسانس پونه کوهی و دو گونه جدایه *T. hamatum* T612 و *T. harzianum* T447 عصاره برون یاخته‌ای *T. harzianum* T447 در مهار زیستی قارچ‌های عامل پوسیدگی میوه انگور است و ضرورت انجام تحقیقات بیشتر برای استفاده 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 بودجه لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

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 فرار، باعث جلوگیری از رشد میسلیم قارچ‌های بیمارگر می‌شوند. دنیس و وبستر، استالدید را به عنوان مهم‌ترین سوخت‌وسازگر فرار *T. viride* معرفی کردند. Zeppa و همکاران (1991)، سوخت‌وسازگرهای فرار 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 فرار مؤثرند (Zeppa et al. 1991).

نتایج به‌دست‌آمده از تأثیر ترشحات برون یاخته‌ای دو گونه تریکودرما گویای تفاوت بارز دو جدایه در کنترل زیستی قارچ‌های بیمارگر بود، به‌طوری‌که غلظت ۱۰ درصد ترشحات برون یاخته‌ای جدایه *T. hamatum* T612 نتوانست از رشد میسلیم قارچ‌های بیمارگر جلوگیری کند، ولی در برابر، غلظت ۱۰ درصد ترشحات برون یاخته‌ای جدایه *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 پاپویزاس انجام شده، نشان داده که سوخت‌وسازگرهای

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.

- 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.
- Briceno 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-Sánchez 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, Ponson 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.
- Daferera 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, Litaïem 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, Reisd 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, Yogalakshmi 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.

- 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, Soyly 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.

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 Ezazi²

1. Assistant Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, 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 dominant 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 antagonistic 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 ($\geq 85\%$) 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.