فصلنامه تحقیقات نوین در گیاه‌پزشکی
دانشگاه آزاد اسلامی شیراز
۳۸-۲۱ : (۱) ۱۰ - ۱۴۰۰

تأثیر اسانس گیاهان مرزنجوش، پونه و مرزه خوزستانی بر رشد میسلیوم قارچ *Botrytis cinerea*

احسان حسنوند[۱]، صدیقه محمدی[۲*]، طاهره بصیرنیا[۳]

۱- گروه گیاه‌پزشکی،دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

۲- گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد شیراز، دانشگاه آزاد اسلامی، شیراز، ایران

۳- گروه بیماری شناسی گیاهی، واحد مرودشت، دانشگاه آزاد اسلامی، مرودشت، ایران

(*)*Mohammadi.pp@gmail.com*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۲۴ **تاریخ پذیرش:** ۱۳۹۹/۱۱/۰۲

چکیده

استفاده از ترکیبات ضد قارچی طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی برای نگهداری میوه در دوره انبارداری به طور چشمگیری در حال افزایش است. در این تحقیق از اسانس گیاهان مرزه، مرزنجوش و پونه برای کنترل عامل فساد میوه کیوی در دوره انبارداری استفاده شد. برای این منظور اثر ضدقارچی اسانس‌ها، بر بازدارندگی از رشد قارچ بیماری‌زای گیاهی *Botrytis cinerea* روی محیط کشت PDA و بافت میوه بررسی شد. در محیط کشت قطر پرگنه قارچ بیماری‌زا به دو روش دیسک کاغذی روی محیط کشت و مواد فرار مورد بررسی قرار گرفت. برای بررسی اثر اسانس روی میوه، ابتدا ۳۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی لیتر) به میوه‌های کیوی تزریق و پس از یک ساعت میوه‌ها با غلظت‌های ۴ و ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر اسانس گیاهان مورد نظر اسپری‌پاشی شدند. هفت روز بعد از مایه زنی، میوه‌ها از نظر درصد آلودگی مورد بررسی قرار گرفتند. برای محاسبه درصد آلودگی هر میوه به هشت قسمت مساوی تقسیم شد و تعداد قسمت‌های آلوده در ۱۲/۵ ضرب و در صد آلودگی میوه‌ها به قارچ بیمارگر محاسبه گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که بیشترین بازدارندگی برای قارچ *B.cinerea* در روش دیسک کاغذی مربوط به اسانس مرزه خوزستانی با ۵۶/۵۴ درصد و در روش مواد فرار مربوط به اسانس مرزه خوزستانی با ۵۵/۹۷ درصد بود. نتایج آزمایش روی بافت میوه مایه‌زنی شده با سوسپانسیون اسپور نشان داد که غلظت ۲۰ میلی‌لیتر بر لیتر اسانس مرزنجوش روی *B. cinerea* (با ۳۵/۴۲ درصد بیماری) بیشترین درصد مهار کنندگی علیه این عوامل بیماری‌زا را داشتند.

واژه‌های کلیدی: اسانس گیاهی، بازدارندگی از رشد میسلیوم، *B.cinerea* ، کیوی.

مقدمه

بیماری‌های‌گیاهی یکی از مهمترین عوامل محدودکننده تولید محصولات کشاورزی هستند. هر ساله بخش قابل توجهی از تولیدات گیاهی در اثر بیماری‌های گیاهی از بین می‌روند و این در حالی است که بیش از ۸۰۰ میلیون نفر در جهان از غذای کافی برخوردار

نیستند (Jafari et al., 2006). مهم‌ترین و خطرناک‌ترین بیماری کیوی در سردخانه‌ها، کپک خاکستری است که عامل آن قارچ *Botrytis cinerea* Pers.F. می‌باشد (Brook, 1990; Manning & Lallu, 1995). کشاورزان برای مبارزه با آن مجبور به سمپاشی‌های مکرر می‌شوند یکی از راه‌های کاهش مصرف سموم، هزینه تولید و خطر آلودگی محیط زیست، استفاده از متابولیت‌های ثانویه برخی گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد قارچ‌ها موثر بوده و جایگزینی مناسب برای سموم شیمیایی هستند (Burt, 2004). در سال‌های گذشته، استفاده از خواص ضدمیکروبی گیاهان در بخش کشاورزی چندان مورد توجه قرار نگرفته است. اما اخیراً، عوارض جانبی بسیار زیاد مواد شیمیایی و گرانی آنها و مشکلات و تهدیدهای ناشی از مصرف بی‌رویه این سموم شیمیایی در سامانه‌های کشاورزی سبب شده تا متخصصین بخش کشاورزی در صدد بهره‌گیری هر چه بیشتر از گیاهان دارویی برآیند (Mohammadi et al., 2014). با مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است، به نظر میرسد که متابولیت‌های ثانویه گیاهان، به عنوان موادی طبیعی، نقش‌های اکولوژیکی مهمی در واکنش های دفاعی گیاهان دارند. بسیاری از این متابولیت ها در دفاع گیاه درمقابل آفات و امراض مؤثر می‌باشند. شناخت و بررسی این متابولیت‌ها می‌تواند کمک مؤثری به کنترل آفات و امراض نماید (Moghtader et al., 2009). در حال حاضر بیش از ۷۰۰۰۰ ترکیب شیمیایی درگیاهان شناخته شده است که ۳۰۰۰۰ نوع آن جزء متابولیت‌های ثانویه هستند (Mironescu et al., 2008). تعداد اسانس‌های گیاهی شناخته شده حدود ۳۰۰۰ نوع اسانس می‌باشد که ۳۰۰ نوع آن دارای ارزش اقتصادی هستند (Burt, 2004) . اسانس‌ها ترکیبات فراری هستند که چون از مواد چربی تشکیل نشده‌اند، قابلیت تولید به صابون را ندارند. برخی از این مواد دارای خواص جلب‌کنندگی و بعضی دیگر خواص دورکنندگی دارند. از جمله ترکیبات عمده یا موثر در اسانس‌های گیاهی ترپن‌ها با فرمول عمومی $(C_5H_8)_n$ می‌باشند. این ترکیبات نه تنها فاقد اثر جانبی بوده بلکه به علت خواص آنتی‌اکسیدانتی، کیفیت و طول دوره انبارداری میوه‌ها را افزایش می‌دهند (Rustaiyan et al., 2000; Plaza et al., 2004). گیاهان معطر متعلق به خانواده‌های نعناعیان و چتریان غنی از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی هستند (Ramezani et al., 2004; Hadidn et al., 2007). در سال‌های اخیر بررسی‌های آزمایشگاهی فراوانی در زمینه تأثیر فرآورده‌های گیاهی روی قارچ‌ها و باکتری‌های بیماری‌زای گیاهی انجام شده است و اثر بعضی از ترکیبات و اسانس‌ها به اثبات رسیده است (Kordal et al., 2005). هدف از پژوهش حاضر، بررسی تأثیر اسانس گیاهان مرزنجوش، مرزه خوزستانی و پونه بر توانایی جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ *B. cinerea* عامل بیماری کپک خاکستری کیوی بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی، خالص‌سازی، شناسایی و اثبات بیماری‌زائی جدایه قارچ Botrytis cinerea

به‌منظور جداسازی عامل بیماری نمونه‌های میوه‌ی کیوی مشکوک به بیماری، از انبارهای شهرستان خرم‌آباد جمع‌آوری گردید. برای جداسازی عامل بیماری ابتدا قسمت‌های آلوده به صورت تکه‌های ۵-۴ میلی‌متری خرد شده سپس ضدعفونی سطحی با هیپوکلریت سدیم یک در صد انجام شد و درون تشتک‌های پتری حاوی محیط‌های غذایی PDA (سیب‌زمینی، دکستروز و آگار) کشت داده شده و در شرایط دمایی ۲۰ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۳۰ درصد و ۱۲ ساعت نور و ۱۲ساعت تاریکی در اتاقک کشت قرار داده شدند. بعد از ۱۲ روز اسپورزایی قارچ، اسپورها از کاغذ صافی عبور داده تا اقدام به تهیه سوسپانسیون اسپور گردد. اسپورهای تهیه شده دوباره در محیط کشت PDA در اتاقک کشت، باز کشت شدند و پس از جدا کردن تک اسپور، بر اساس خصوصیات مورفولوژیکی بر گرفته از کلیدهای شناسایی معتبر(Ghosta et al., 2003) گونه قارچ بیمارگر شناسایی شد (Bouchra et al., 2003).

جهت انجام آزمون بیماری‌زایی گونه قارچی، میوه‌های سالم کیوی که از نظر شکل و اندازه تقریباً یکسان بودند، تعدادی انتخاب گردید و پس از شستشو با آب معمولی، توسط اتانول ۷۰ درصد ضدعفونی شدند. سپس در شرایط استریل، وسط هر میوه توسط

چوب‌پنبه سوراخ‌کن (کورک‌بورر) حفره‌ای به قطر نیم و عمق یک سانتی‌متر ایجاد گردید و از کشت جوان جدایه، قطعه‌ای از محیط کشت حاوی قارچ به قطر ۰/۵ سانتی‌متر در محل حفره قرار داده شد. محل مایه‌زنی توسط پارافیلم پوشانده شد و میوه‌ها به مدت ۱۵ روز در دمای ۱± ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. در تیمار شاهد فقط از قطعات محیط کشت استریل استفاده شد (Abdolmaleki *et al.*, 2011).

تهیه اسانس

پیکرهای هوایی گیاهان مرزنجوش، مرزه خوزستانی و پونه از رویشگاه‌های طبیعیشان در استان لرستان تهیه و با استفاده از دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شد.

گیاهان جمع‌آوری شده در دمای اتاق و شرایط سایه خشک گردیدند و پس از حذف مواد زائد، هر یک از گونه‌های گیاهی به‌وسیله آسیاب خرد شده و سپس اسانس آن‌ها به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر[1] به مدت ۳ ساعت استخراج گردید. استخراج اسانس برای هر نمونه در سه تکرار و برای هر تکرار ۱۰۰ گرم نمونه گیاهی استفاده شد. اسانس به دست آمده به‌وسیله سولفات سدیم خشک، آب‌گیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون یخچال تا زمان آنالیز و آزمون بیولوژیک نگه‌داری شد. ترکیب مواد تشکیل دهنده اسانس‌های به دست آمده از نمونه‌های گیاهی با استفاده دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی[2] و گاز کروماتوگرافی همراه با طیف‌سنجی جرمی[3] در آزمایشگاه دانشکده کشاورزی فردوسی مشهد شناسایی شدند. مدل دستگاه مورد استفاده در آنالیز اسانس‌ها Shinadzu-9A، ساخت کشور ژاپن، مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر، آشکارساز FID با دمای ۲۸۰، دمای محفظه تزریق ۳۰۰ درجه و گاز حامل شامل گاز هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹ درصد بود. در ابتدا اسانس‌ها به دستگاه GC تزریق شده سپس برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس و تعیین درصد و زمان بازداری[4] هر ترکیب، اسانس‌ها به دستگاه GC-MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها تعیین گردید. شناسایی ترکیب‌ها بر اساس شاخص بازدارندگی[5] و مقایسه طیف جرمی آن‌ها با ترکیب‌های پیشنهادی به‌وسیله سازنده دستگاه انجام گرفت. در صد هر ترکیب با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC با روش نرمال کردن سطح منحنی و بدون محاسبه عامل تصحیح صورت گرفت (Jannings & Shibamoto, 1980).

تهیه سوسپانسیون اسپور

به‌منظور تهیه زادمایه *Botrytis cinerea* را به تشتک‌های پتری حاوی محیط PDA منتقل و در دمای زیر نور فلورسنت با چرخه نوری هشت ساعت روشنایی و ۱۶ ساعت تاریکی در انکوباتور دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Al-Mughrabi, 2004). پس از گذشت شش تا هفت روز سوسپانسیونی به غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر آب مقطر تهیه و برای آلوده‌سازی میوه جهت بررسی اثر اسانس‌ها در جلوگیری از بروز بیماری روی بافت میوه، به‌وسیله تزریق در بافت میوه استفاده شد.

شمارش اسپورها روی لام هماسیتومتر (اسپورشمار)

این لام دارای دو مربع در بالا و پایین (مربعی که حاشیه آن با سه خط موازی محصور شده است و خود دارای ۲۵ مربع کوچک‌تر است) است. تعداد اسپورهای روی یک قطر مربع بالا (هر قطر شامل پنج مربع است که تعداد اسپورهای هر مربع به‌طور جداگانه

---

[1] Clevenger apparatus
[2] Gas Chromatography
[3] Gas Chromatography–Mass Spectrometry
[4] Retention time
[5] Retention index

شمارش و در آخر باهم جمع شدند) شمرده شد و سپس تعداد اسپورهای روی یک قطر مربع پایین نیز شمرده شد. این عمل با سه تکرار انجام شد. سپس میانگین تعداد اسپور قطرهای مربع بالا و پایین در فرمول محاسبه شد. به همان ترتیب سوسپانسیون اسپور تهیه و غلظت آن به $۱۰^{۶}$ کنیدیوم در میلی‌لیتر تنظیم گردید (Risser *et al.*, 1976).

بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌ها بر رشد میسلیوم قارچ Botrytis cinerea

به‌منظور بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌ها، ابتدا از کشت چهار روزه قارچ با استفاده از کورک بورر بلوک‌های هم‌اندازه از میسلیوم جوان قارچ تهیه و در کناره‌ی محیط کشت حاوی PDA قرار داده شد. سپس در سمت مخالف بلوک‌های قارچی، مقدار ۱۰ میکرولیتر (غلظت ۵۰۰ میکرولیتر در لیتر) از هر اسانس روی دیسک کاغذی ۱۰ سانتی‌متری سترون قرار داده و تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور نگهداری شدند. از دیسک فاقد اسانس به‌عنوان شاهد رو به روی بلوک قارچ قرار داده شد. پس از گذشت ۱۴ ساعت، رشد رویشی هاله هر قارچ به طور روزانه و تا زمانی که سطح محیط کشت پتری‌های شاهد توسط قارچ بطور کامل اشغال شود اندازه‌گیری شد. در انجام این آزمایش برای هر تیمار سه تکرار در نظر گرفته شد (Mehrabani *et al.*, 2004). نتایج به صورت میانگین قطر کلنی قارچ اندازه‌گیری گردید و میزان بازدارندگی برا ساس فرمول I=C-T/C×100 محاسبه شد که I درصد بازدارندگی رشد میسلیوم، C میانگین قطر کلنی قارچ شاهد و T میانگین قطر کلنی قارچ تیمار است (Singh *et al.*, 2005).

بررسی اثر مواد فرار اسانس‌ها روی رشد میسلیوم قارچ Botrytis cinerea

در این روش مطابق با روش بالا با همان مقدار و غلظت نمونه‌ها تهیه گردید. تفاوت این روش با روش قبلی قرار دادن دیسک حاوی اسانس روی درب تشتک پتری رو به روی بلوک قارچی بود. این آزمون برای مشخص کردن وجود مواد فرار ضد قارچی درون هر نمونه اسانس استفاده شد. از دیسک کاغذی آغشته به آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد استفاده شد (Neslihan *et al.*, 2008).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی ($MIC^{۶}$) و حداقل غلظت کشندگی ($MFC^{۷}$) اسانس‌ها به روش میکرودیولیشن

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌ها از رشد قارچ از روش میکرودیولیشن (Vale-Silva *et al.*, 2012) استفاده شد. بدین منظور ابتدا از کشت هفت روزه قارچ روی محیط کشت PDA، سوسپانسیون $۱۰^{۶}$ اسپور در میلی‌لیتر تهیه شد. سپس از بین ۳۰ رقت، رقت‌های ۱/۵، ۱/۷، ۲، ۲/۳، ۷، ۸/۵، ۹، ۹/۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسانس انتخاب و درون محیط کشت PD Broth اضافه شد. از سوسپانسیون اسپورهای قارچ به میزان ۲۰ میکرو لیتر به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت PD Broth از غلظت‌های بالا اضافه شد. لوله‌های مایه‌زنی شده روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۷۰ بار بر دقیقه به مدت پنج روز نگه‌داری شدند. سپس میزان ۵۰ میکرولیتر از هر رقت برداشته و روی محیط کشت PDA کشت شد. بعد از ۱۴ تا ۱۶ ساعت تعداد اسپورهای جوانه‌زده شده محاسبه و حداقل غلظت بازدارندگی از رشد قارچ تعیین شد (Vale-Silva *et al.*, 2012). حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) حداقل غلظتی از اسانس می‌باشد که از رشد ۹۰ درصد اسپورهای قارچ نسبت به تیمار شاهد جلوگیری به‌عمل می‌آورد. حداقل غلظت کشندگی (MFC) حداقل غلظتی از اسانس است که به طور کامل از جوانه‌زنی اسپورهای قارچ جلوگیری کرد.

بررسی اثر اسانس‌ها در جلوگیری از بروز بیماری روی بافت میوه

میوه‌های کیوی که از نظر شکل، اندازه، رنگ و وزن یکسان بودند، از انبار و از یک جعبه تهیه شدند. میوه‌ها ابتدا با استفاده از هیپوکلرید سدیم یک درصد تجاری به مدت دو دقیقه، استریل شدند. سپس با استفاده از آب مقطر استریل شست‌وشو داده شدند.

---

[6] Minimum inhibitory concentration
[7] Minimum fungial concentration

برای مایه‌زنی میوه‌ها ابتدا توسط لانس استریل، زخمی به ابعاد ۲×۲ میلی‌متر ایجاد و سپس ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^6 اسپور قارچ در میلی‌لیتر آب مقطر به درون زخم هر میوه تزریق شد. غلظت های ۴ و ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر هرکدام از ا سانس‌های پونه، مرزه خوز ستانی و مرزنجوش جداگانه روی میوه‌ها ا سپری شد. در تیمار شاهد آلوده پس از تزریق عامل بیماری جهت اسپری پاشی به جای اسانس از آب مقطر سترون استفاده شد و همچنین در شاهد سالم ابتدا ۳۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به درون زخم تزریق شد و جهت ا سپری پا شی از آب مقطر سترون ا ستفاده شد. به‌منظورتأمین نمودن رطوبت جعبه‌های پلی‌اتیلن حاوی گوجه‌فرنگی از پنبه‌های سترون خیس استفاده شد. این آزمون در سه تکرار و به‌صورت طرح کاملاً تصادفی درون آزمایشگاه انجام شد. پس از اینکه علائم آلودگی در میوه‌های شاهد آلوده به‌صورت کامل ظاهر گردید یادداشت‌برداری از نمونه‌ها به عمل آمد. به این صورت که هر میوه را به‌وسیله چاقو به هشت قسمت مساوی تقسیم کرده و هر قسمت معادل ۱۲/۵ درصد در نظر گرفته شد و سپس قطعه‌های آلوده و سالم میوه‌ها شمارش و یادداشت شدند. جهت محاسبه درصد آلودگی تعداد قطعات آلوده در ۱۲/۵ ضرب و درصد آلودگی تعیین شد (Anthony *et al*., 2004).

تجزیه اسانس‌ها با استفاده از دستگاه GC/MC

ا سانس‌های مورد ا ستفاده در این پژوهش با ا ستفاده از د ستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی همراه با طیف سنجی جرمی (GC/MS) در دانشگاه فردو سی مشهد مورد شنا سایی قرار گرفتند. در ابتدا ا سانس‌ها به د ستگاه تزریق شده و پس از یافتن برنامه ریزی منا سب دمایی ستون برای جدا سازی کامل ترکیب‌های ا سانس، تعیین در صد و زمان بازداری هر ترکیب، ا سانس‌ها به د ستگاه GC/MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها تعیین گردید. شنا سایی ترکیب‌ها بر ا ساس شاخص بازداری و مقایسه طیف جرمی آنها با ترکیب‌های پیشنهادی کتابخانه دستگاه انجام گرفت. درصد هر ترکیب با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC با روش نرمال کردن سطح منحنی و بدون محاسبه عامل تصحیح صورت گرفت.

تجزیه آماری داده‌ها

آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و مقایسه میانگین تیمارها با ا ستفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن به کمک نرم‌افزار انالیز SASS انجام شد.

نتایج و بحث

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی جدایه قارچی

در مرحله جدا سازی قارچ عامل بیماری، از میوه‌های آلوده و مشکوک به بیماری که از سردخانه و انبار میوه جمع آوری شده بودند جداسازی و سپس خالص‌سازی و تک‌اسپور شدند. قارچ خالص‌سازی شده که از نظر مشخصات ظاهری با قارچ مورد نظر شباهت داشت با ا ستفاده از کلیدهای معتبر قارچ شنا سی شنا سایی شد. عامل بیماری کپک خاکستری کیوی قارچ *Botrytis cinerea* ا ست. نشانه‌های این بیماری با پوسیدگی از نوک بوته‌ها و یا از محل‌های زخم شروع می شود و به طرف پایین پیشرفت می‌کند. میوه آلوده ابتدا نرم شده و در سطح آن لکه‌های فرورفته به وجود می‌آید و پس از فساد بافت پوشش خارجی خاکستری رنگ، که در واقع ساختارهای رویشی و زایشی قارچ عامل هستند، تشکیل می‌گردد.

پرگنه قارچ ابتدا سفید است و به تدریج خاکستری تا سبز خاکستری رنگ می‌شود. ریسه‌های آن به قطر تقریبی ۵ میکرومتر، کنیدیوفور چند شاخه است، انتهای آن تقریباً گرزی شکل بوده و کنیدیوم‌ها بر روی زائده‌های کوچک انتهایی کنیدیوفور تشکیل می‌شوند. کنیدیوم‌ها حدوداً ۱۰-۵ در ۱۶-۷ میکرومتر می‌باشند اسکلروت‌ها سیاه رنگ بوده و به قطر ۰/۱ تا ۰/۷ میلی‌تر می‌باشد.

آزمون اثبات بیماری‌زایی

قارچ عامل بیماری جدا شـده از میوه‌ها با روش ذکر شـد در قسـمت مواد و روش‌ها روی میوه مایه‌زنی و علائم بیماری ظاهر گردید. جهت شناسایی قارچ بیماری‌زا اندازه‌گیری‌های لازم انجام شد و مشخصات تاکسونومیکی قارچ اولیه با قارچ جدا شده از میوه‌های مایه‌زنی شده مطابقت داشت.

بررسی اثر اسانس‌ها در محیط کشت

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در هر دو آزمون دیسک کاغذی و مواد فرار اثر اسانس‌ها بر میزان بازدارندگی از رشد قارچ‌ها در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بود.

جدول ۱- تجزیه واریانس مربوط به تأثیر اسـانس‌ها به روش دیسـک کاغذی روی قارچ *Botrytis cinerea* در درون تشـتک پتری در شـرایط آزمایشگاه

Table1. Variance analysis effect of essential oils by paper discs method on fungus *Botrytis cinerea* into petri dishes in the vitro condition

Sources of Variance	Degrees of freedom	Total Squares	Mean Squares	F Values
Treatments	3	98.899	32.966	496.171**
Error	8	0.532	0.066	
Total	11	99.431		
Coefficient of Variance(%)	4.53			

جدول ۲- تجزیه واریانس مربوط به تأثیر اسانس‌ها به روش مواد فرار روی قارچ *Botrytis cinerea* در درون تشتک پتری در شرایط آزمایشگاه

Table 2. Variance analysis effect of essential oils by volatile essential oil methods on fungus *Botrytis cinerea* into petri dishes in the vitro condition

Sources of Variance	Degrees of freedom	Total Squares	Mean Squares	F Values
Treatments	3	98.899	32.966	496.171**
Error	8	0.532	0.066	
Total	11	99.431		
Coefficient of Variance(%)	4.53			

اثر بازدارندگی اسانس‌ها روی قارچ *Botrytis cinerea*

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که هر سه اسانس در روش دیسک کاغذی باعث بازدارندگی از رشد میسلیوم و پرگنه قارچ *B. cinerea* شده و اختلاف معنی‌داری بین اسانس‌ها در بازدارندگی از رشد پرگنه این قارچ وجود داشت (جدول3).

مقایسه میانگین داده‌ها در روش مواد فرار نشان داد که هر سه اسانس نسبت به شاهد باعث بازدارندگی از رشد میسلیوم و پرگنه قارچ بیماری‌زا شد. بیشترین بازدارندگی مربوط به ا سانس مرزه با ۵۵/۹۷ در صد و کمترین بازدارندگی مربوط به ا سانس پونه با ۴۸/۴۱

درصـد بود. اسـانس مرزه خوزسـتانی با مرزنجوش اختلاف معنی‌داری نداشـت ولی با پونه اختلاف معنی‌دار نشـان داد (جدول ۳، شکل ۱ و شکل ۲)

جدول ۳- مقایسه میانگین قطر پرگنه و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ *Botrytis cinerea* روی محیط کشت PDA توسط اسانس‌های مرزه خوزستانی، مرزنجوش و پونه در دو روش ارزیابی

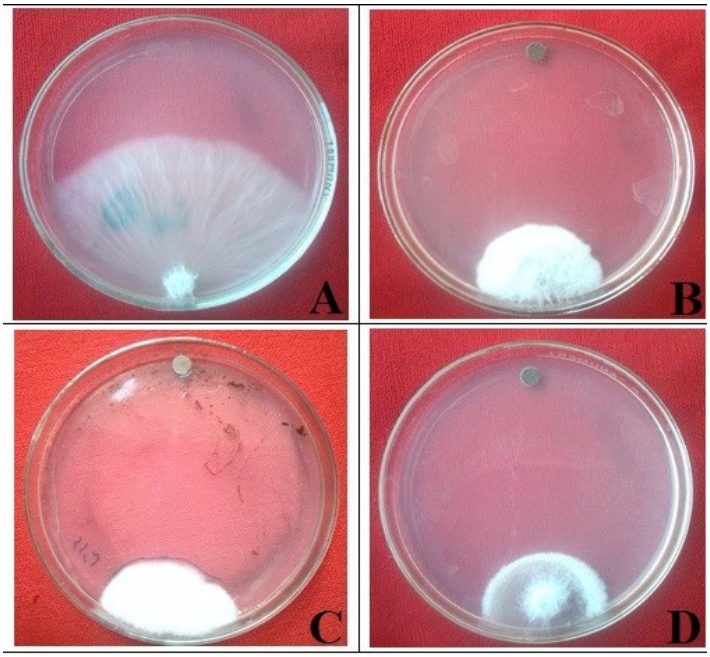
Table 3. Mean comparison of colony diameter and inhibitory percentages of growth of *Botrytis cinerea* by essential oil of Summer savory, wild mint and Marjoram in two methods of assessment

Essential oils	volatile essential oil method		disk diffusion method	
	colony diameter	Percentage of growth inhibition	colony diameter	Percentage of growth inhibition
Summer savory	2.33	55.97a	2.30	56.54a
Marjoram	2.37	55.29ab	2.33	55.97a
Wild mint	2.73	48.41b	2.70	49.05a
Control	5.30	0.00c	5.30	0.00b

*Means with similar letters in each column are not significantly different at 5% level of probability

شکل ۱- اثر اسانس‌ها روی رشد پرگنه قارچ *Botrytis cinerea* به روش مواد فرار: تیمار شاهد (A)، تیمار اسانس مرزنجوش (B)، تیمار اسانس پونه (C) و تیمار اسانس مرزه خوزستانی (D)

Figure 1. Effect Essential oils on the growth of *Botrytis cinerea* by volatile essential oil methods: control treatment(A), Marjoram treatment(B), Wild mint treatment(C), Summer savory treatment(D)



شکل ۲- اثر اسانس‌ها روی رشد پرگنه قارچ *Botrytis cinerea* به روش دیسک کاغذی: تیمار شاهد (A)، تیمار اسانس مرزنجوش (B)، تیمار اسانس پونه (C) و تیمار اسانس مرزه خوزستانی (D)

Figure 2. Effect Essential oils on the growth of *Botrytis cinerea* by paper discs methods: control treatment(A), Marjoram treatment(B), Wild mint treatment(C), Summer savory treatment(D)

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌ها (MIC) به روش میکرودیولیشن

نتایج اثر اسانس‌ها روی قارچ *B. cinerea* نشان داد که غلظت‌های ۱/۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر مرزه خوزستانی، ۱/۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر مرزنجوش و ۱/۷ میکرولیتر در میلی‌لیتر پونه به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی و غلظت‌های ۸ میکرولیتر در میلی‌لیتر مرزه خوزستانی، ۷/۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر مرزنجوش و ۸/۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر پونه به عنوان حداقل غلظت کشندگی روی این قارچ بودند (جدول ۴).

جدول ٤- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) اسانس‌های مرزه‌خوزستانی، مرزنجوش و پونه روی قارچ *Botrytis cinerea*

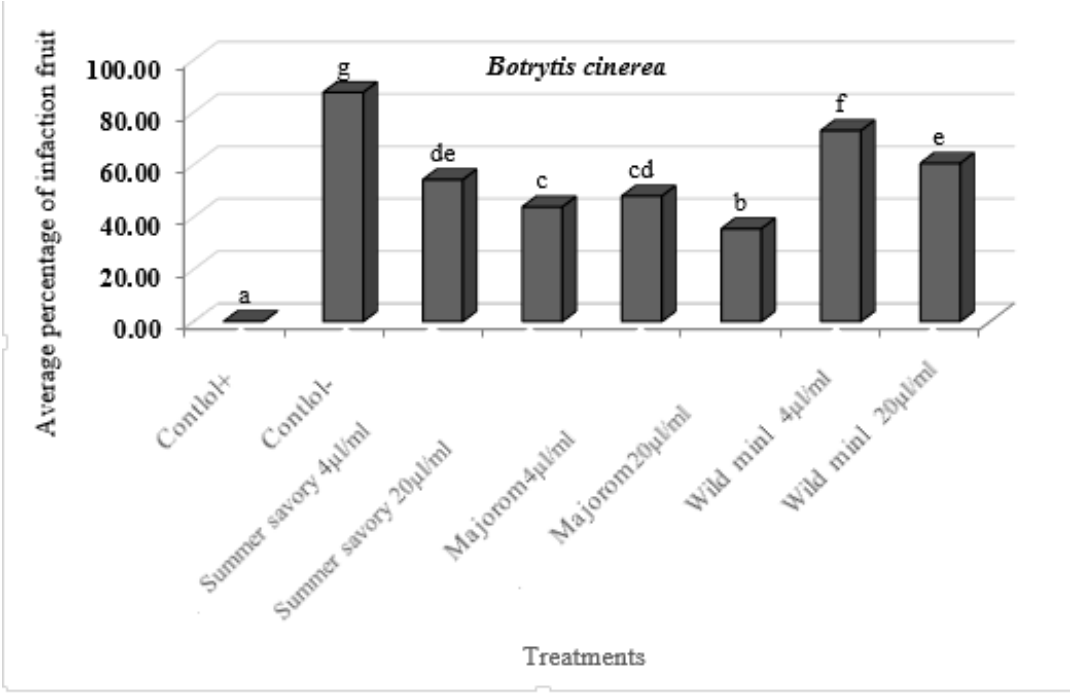
Table 4. Inhibitory the minimum concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) essential oil of Summer savory, marjoram and wild mint on the fungus *Botrytis cinerea*

Treatment	Number of germinated spore	Concentration of essential (µl/ml)	Percentage of germinated spore to control
B. cinerea control	62	۰	100
B. cinerea + Summer savory	34	1.3	54.84
	6	1.5	9.68
	3	6	4.84
	۰	8	۰
B. cinerea + marjoram	33	1.3	53.23
	6	1.5	9.68
	2	6	3.23
	۰	7.5	۰
B. cinerea + wild mint	37	1.3	59.68
	6	1.7	9.68
	4	6	6.45
	۰	8.5	۰

اثر اسانس‌ها در جلوگیری از بروز بیماری روی میوه

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف اسانس‌ها در جلوگیری از آلودگی میوه به قارچ بیمارگر در سطح احتمال ۵ درصد معنی‌دار بوده است. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که هر دو غلظت ۴ و ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از اسانس‌ها باعث کنترل آلودگی میوه به قارچ بیمارگر نسبت به شاهد منفی بوده است.

مقایسه میانگین اثر اسانس‌ها روی قارچ بیماری‌زا *B. cinerea* عامل کپک خاکستری کیوی نشان که هر دو سطح اسانس مرزنجوش، مرزه خوز ستانی و پونه بیماری کپک خاکستری کیوی را کنترل نموده ا ست، بطوری که کم‌ترین در صد آلودگی میوه به قارچ بیمارگر بعد از شاهد مثبت (a) مربوط به تیمار ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر لیتر مرزنجوش (b) و بیشترین در صد آلودگی میوه به قارچ بیمارگر بعد از شاهد منفی (g) مربوط به تیمار ۴ میکرولیتر بر میلی‌لیتر پونه (f) بود (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر اسانس‌های مرزه خوزستانی، مرزنجوش و پونه در کاهش آلودگی بافت میوه کیوی آلوده شده با قارچ *B. cinerea* (ستون‌ها با حرف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵% هستند)

Figure 3. Compare the average effect of essential oil of Summer savory, marjoram and wild mint in reducing infection in Kiwi fruit infected with the fungus *B. cinerea* (columns with same letter are not significantly different at the 5% level)

تعیین درصد ترکیبات اسانس‌ها با استفاده از GS-MC

نتایج حاصل از تجزیه اسانس مرزه‌خوزستانی با دستگاه GC/MC نشان داد که اسانس مرزه خوزستانی حاوی کارواکرول (۸۸/۶۵ درصد)، پی- سیمن (۳/۴۲ درصد)، آلفا-بیسابولن (۱/۲۵ درصد)، آلفا-پینن (۱/۲ درصد) و سایر ترکیبات به مقدار خیلی اندک است (جدول۵). نتایج حاصل از آنالیز اسانس مرزنجوش با دستگاه GC/MC نشان داد که اسانس مرزنجوش حاوی تیمول (۱۹/۴۶ درصد)، ترپنن-۴-ال (۱۶/۱ درصد)، پی-سیمن (۸/۹۱ درصد)، سیس-سابینن هیدرات (۵/۵۶ درصد)، سابینن (۴/۷۲ درصد)، آلفا-ترپینن (۴/۵۳ درصد)، آلفا-ترپینولن (۳/۵۲) و سایر ترکیبات به مقدار خیلی اندک است (جدول۶). نتایج حاصل از آنالیز اسانس پونه با دستگاه GC/MC نشان داد که اسانس پونه حاوی پولگون (۴۷/۶۶ درصد)، ۸،۱- سینئول (۲۵/۷۹ درصد)، منتون (۱۰/۴۳ درصد)، آلفا-ترپینه ال (۴/۰۱ درصد) و سایر ترکیبات به مقدار خیلی اندک است (جدول۷).

جدول ۵- ترکیبات شیمیایی اسانس مرزه خوزستانی در تجزیه با دستگاه GC-MC

Table 5. Analysis essential oil components Summer savory with GC-MC

Row	Percent compound	Compound	(RI) Retention index	Retention times in minutes
1	1.2	α-Pinene	925	5.27
2	0.41	β-Myrcene	989	6.55
3	0.20	α-Terpinene	1175	7.26
4	3.42	p-Cymene	1014	7.48
5	0.51	Limonene	1028	7.59
6	0.17	trans-β-Ocimene	1035	7.80
7	0.29	ɣ-Terpinene	1053	8.44
8	0.20	Linalool	1085	9.64
9	1.01	Terpinene-4-ol	1178	12.14
10	0.82	Thymol	1292	15.87
11	88.65	Carvacrol	1411	16.45
12	0.40	trans-Caryophyllene	1424	19.91
13	1.25	α-Bisabolene	1509	22.59
	98.53	Total		

جدول ۶- ترکیبات شیمیایی اسانس مرزنجوش در تجزیه با دستگاه GC-MC

Table 6. Analysis essential oil components marjoram with GC-MC

Row	Percent compound	Compound	(RI) Retention index	Retention times in minutes
۱	1.30	α-Thujene	۹۲۵	5.11
۲	۱	α-Pinene	۹۳۲	5.27
۳	0.36	Camphene	۹٤۸	5.62
۴	4.72	Sabinene	۹۷۵	6.18
۵	0.7	1-Octen-3-ol	۹۷٦	6.25
۶	0.75	3-Octanone	۹۸٤	6.44
۷	1.30	β-Myrcene	۹۸۹	6.55
۸	0.21	3-Octanol	۹۹۸	6.74
۹	4.53	α-Terpinene	۱۰۱۷	7.28
۱۰	8.91	*p*-Cymene	۱۰۲۵	7.5
۱۱	2.43	Limonene	۱۰۲۸	7.61
۱۲	8.34	ɣ-Terpinene	۱۰٦۰	8.47
۱۳	3.52	α-Terpinolen	۱۰۸۸	9.32
۱۴	5.56	cis-Sabinenehydrate	۱۰۹۸	9.65
۱۵	0.9	p-menth-2-en-1-ol	۱۱۲۲	10.35
۱۶	1.18	Menthone	۱۱۵٤	11.38
۱۷	1.24	Borneol	۱۱٦٦	11.78
۱۸	1.56	Menthol	۱۱۷٤	12.04
۱۹	16.1	Terpinene-4-ol	۱۱۷۷	12.21
۲۰	1.6	α-Terpineol	۱۱۸۹	12.57
۲۱	1.56	Bornyl acetate	۱۲۸۵	15.64
۲۲	19.46	Thymol	۱۲۹۰	15.92
۲۳	1.94	Carvacrol	۱٤۰۲	16.17
۲۴	1.5	*trans*-Caryophyllene	۱٤۲۱	19.92
۲۵	1.1	Germacrene-D	۱٤۸۳	21.8
۲۶	0.47	Bicyclogermacrene	۱۵۰۰	21.83
۲۷	0.61	Spathulenol	۱۵۷۸	24.66
۲۸	0.75	Caryophyllen oxide	۱۵۸٦	24.82
	93.60	Total		

جدول ۷- ترکیبات شیمیایی اسانس پونه در تجزیه با دستگاه GC-MC

Table 7. Analysis essential oil components wild mint with GC-MC

Row	Percent compound	Compound	(RI) Retention index	Retention times in minutes
1	0.02	α-Thujene	925	5.11
2	1.16	α-Pinene	934	5.28
3	0.09	Camphene	970	5.62
4	1.38	Sabinene	974	6.17
5	2.37	β-Pinene	978	6.28
6	0.64	Myrcene	990	6.56
7	0.15	3-Octanol	99۶۹۹	6.67
8	0.04	α-Terpinene	1016	7.27
9	0.07	p-Cymene	1025	7.48
10	0	Limonene	1028	7.66
11	25.79	1,8-Cineole	1033	7.71
12	0	cis-Ocimene <Y>	1036	7.81
13	0.06	ɣ-Terpinene	1057	5.45
14	0.07	Sabinene hydrate	1066	8.72
15	0.03	α-Terpinolene	1086	9.34
16	0.14	Linalool	1100	9.65
17	10.43	Menthone	1155	11.42
18		neo-Menthol	1159	11.72
19		Borneol	1166	11.77
20	0.12	Menthol	1173	11.99
21	0	Terpinen-4-ol	1178	12.15
22	4.01	α-Terpineol	1192	12.58
23	0.05	Dihydrocarveol	1196	12.72
24	47.66	Pulegone	1249	14.55
25		Piperitone	1282	14.64
26	0.09	Thymol	1296	15.85
27	0	Carvacrol	1302	16.17
28	0.35	Piperitenone	1344	17.49
29	0.23	Piperitenone oxid	1368	18.27
30	0	α-Copaene	1377	18.54
31	0	β-Bourbonene	1387	18.85
32	0	β-Elemene	1392	19
33	0.11	β-Caryophyllene	1413	19.92
34	0	α-Humulene	1457	21.25
35	0	Germacrene-D	1482	21.81
36	0	Bicyclogermacrene	1498	22.27
37	0	(+) Spathulenol	1581	24.66
38	0.15	Caryophyllene oxide	1587	24.83
	95.21	Total		

اثر نامطلوب و مضر آفت‌کش‌ها بر محیط زیست و سلامتی انسان موضوع بسیار مهمی است که امروزه در کانون توجه قرار گرفته است و نیاز به پژوهش و مطالعه برای جایگزین‌های سموم شیمیایی، روز به روز بیشتر احساس می شود. از جمله جایگزین‌های بالقوه مهم برای سموم شیمیایی، اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان عالی می‌باشند. اسانس‌های گیاهی می‌توانند ضمن تأمین سلامت و ایمنی محصول، باعث کاهش ضایعات محصولات کشاورزی در اثر آلودگی به آفات و عوامل بیماری‌زای گیاهی شوند (Kumar *et al.*, 2008; Giordani *et al.*, 2008; Feng *et al.*, 2011). حساسیت گونه‌های قارچی، به اسانس‌های گیاهی تابع نوع اسانس گیاهی و غلظت‌های مورد استفاده اسانس می‌باشد. تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی به ترکیب مواد تشکیل دهنده آنها بستگی دارد و نوع و در صد این ترکیبات نیز به نوبه خود می‌تواند تابع گونه گیاه و شرایط محیطی قرار گیرد (Plotto *et al.*, 2003). در پژوهش حاضر، مشخص شد که نوع اسانس و غلظت‌های مورد استفاده اسانس و نوع قارچ در میزان بازدارندگی اسانس از رشد میسلیومی قارچ و خاصیت قارچکشی اهمیت دارد. در این تحقیق اثر سه اسانس مرزه خوزستانی، مرزنجوش و پونه روی قارچ بیماری‌زای گیاهی *B. cinerea* در محیط کشت و میوه مورد مطالعه قرار داده شدند. در محیط کشت قطر پرگنه قارچ بیماری‌زا به دو روش دیسک کاغذی روی محیط کشت و مواد فرار مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که نتایج نشان داد هر چه اندازه قطر کلنی برای قارچ کمتر باشد، درصد بازدارندگی بیشتر خواهد بود. در میوه هم درصد بیماری مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش نتایج به دست آمده روی قارچ *B. cinerea* در محیط کشت نشان داد که از میان سه اسانس مورد مطالعه بیشترین بازدارندگی از رشد پرگنه در هر دو روش دیسک کاغذی و مواد فرار مربوط به اسانس مرزه خوزستانی به ترتیب با ۵۶/۵۴ و ۵۵/۹۷ درصد می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از این پژوهش روی بافت میوه آلوده شده با سوسپانسیون اسپور *B. cinerea* نشان داد که کم‌ترین درصد بیماری مربوط به تیمار ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر مرزنجوش با ۳۵/۴۲ در صد بوده است. در بررسی میزان بازدارندگی از رشد قارچ‌ها مشخص شد که مقادیر به دست آمده در محیط کشت و بافت میوه یکسان نیست. این تفاوت در میزان بازدارندگی احتمالاً به دلیل تفاوت در ساختار و قارچ‌شناسی گونه‌های مختلف قارچ، تفاوت در میزان حساسیت قارچ‌ها به اسانس‌های گیاهی، تفاوت در میزان تأثیر اسانس‌های گیاهی بر قارچ‌های بیماری‌زا می‌باشد. تفاوت در اسانس‌های گیاهی را احتمالاً می‌توان به تفاوت در منشأ اسانس‌های گیاهی و در نتیجه تفاوت در نوع و ترکیب مواد تشکیل دهنده اسانس‌های گیاهی ارتباط داد (Charles *et al.*, 2012). همچنین با افزایش غلظت اسانس گیاهی تأثیر قارچ‌کشی در همه اسانس‌های مورد استفاده در جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ‌ها افزایش یافته است، این نتایج با نتایج به‌دست آمده توسط (Mason *et al.*, 2006) مطابقت دارد. Farzaneh *et al.* (2006) اثر اسانس گل‌های اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia*)، بذور رازیانه (*Foeniculum vulgare*)، زیره سبز (*Cuminum cyminum*) و پیکره رویشی نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) روی قارچ‌های عامل پوسیدگی و کپک‌زدگی پس ازبرداشت توت‌فرنگی شامل *Aspergillus niger*، *Botrytis cinerea* و *Rhizopus stolinifer* در محیط کشت PDA و بافت میوه مورد بررسی قراردادند که نتایج حاصل از آن پژوهش نشان داد که درصد بازدارندگی از رشد قارچ‌های مورد مطالعه متفاوت بود و میزان بازدارندگی روی محیط کشت و بافت میوه نیز با هم تفاوت دارد. همچنین Behnam *et al.* (2006) طی پژوهشی به این نتیجه رسیدن که اثرات قارچ‌کشی اسانس مرزه از اثرات ضدباکتریایی آن بیشتر است نتایج حاصل از مطالعه Satari *et al.* (2006) روی قارچ *Fusarium oxysporum* نشان داد که اسانس گیاهان آویشن ، زنیان و پونه باعث مهار رشد قارچ شدند. بین غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام اسانس‌های آویشن و پونه اگر چه اختلاف معنی‌داری در سطح ۵ در صد مشاهد نشد ولی در غلظت ۴۰۰ppm کنترل رشد قارچ را مهار کردند. Shimoni *et al.* (1993) اثر پنج گونه گیاهی شامل مورد، پونه، پنج انگشت، آویشن و درمنه کوهی بر رشد میسلیومی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی رایزوکتونیا، ژئومانومیست، فوزاریوم و پیتیوم را مورد مطالعه قرار دادند. نتایج نشان داد که اسانس گیاهان پونه و آویشن باعث مهار ۱۰۰ درصد رشد میسلیومی قارچهای مورد مطالعه شده‌اند. پژوهش‌های Hadian *et al.* (2007) بروی اسانس‌های گیاهان درمنه شرقی، درمنه دشتی، درمنه

خرا سانی و درمنه کوهی ن شان داد که این ا سانس‌ها از ر شد برخی قارچ‌های خاکزی در شرایط آزمای شگاه جلوگیری می‌کنند. در بررسی‌های به عمل آمده در این تحقیق مشخص شد که ترکیبات اصلی اسانس مرزه خوزستانی کارواکرول (۸۸/۶۵ درصد)، پی-سیمن (۳/۴۲ در صد)، آلفا-بیسابولن (۱/۲۵ در صد)، آلفا-پینن (۱/۲ در صد) همچنین ا سانس مرزنجوش حاوی تیمول (۱۹/۴۶ درصد)، ترپنن-۴-ال (۱۶/۱ درصد)، پی-سیمن (۸/۹۱ درصد)، سیس-سابینن هیدرات (۵/۵۶ درصد)، سابینن (۴/۷۲ درصد)، آلفا-ترپینن (۴/۵۳ درصد)، آلفا-ترپینولن (۳/۵۲) و ا سانس پونه حاوی پولگون (۴۷/۶۶ درصد)، ا،۸-سینئول (۲۵/۷۹ درصد)، منتون (۱۰/۴۳ درصد)، آلفا-ترپینه ال (۴/۰۱ درصد) می‌با شد. این تحقیقات نشان داد تفاوت در فعالیت ضد قارچی ا سانس‌های گیاهی به اجزای ت شکیل‌دهنده آن‌ها ب ستگی دارد به‌طوری‌که یک ترکیب ممکن ا ست به تنهایی یا به صورت ت شدیدکنندگی با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضد قارچی ا سانس را باعث شود تا در غلظت معینی تاثیر قابل قبولی دا شته با شد و از طرفی دیگر نوع ا سانس و غلظت‌های مختلف آن در میزان بازدارندگی از ر شد میسلیومی قارچ و خا صیت قارچ‌ک شی آن نقش کلیدی دارا می‌با شد پی شنهاد می شود کارایی محصولات بیولوژیک به جای برر سی در دامنه دمایی محدود و کنترل شده در دامنه دمایی و سیع‌تری مورد برر سی قرار گیرد. نتایج این تحقیق در راستای ساخت قارچ‌کش‌های ارگانیک و سازگار با محیط زیست امیدبخش بوده و می‌تواند گامی بزرگ در راستای سلامت و ایمنی محصولات غذایی، افزایش صادرات محصولات کشاورزی و افزایش زمان انبارداری میوه‌ها باشد.

منابع

Abdolmaleki, M., Bahraminejad, S., Salari, M., Abbasi, S. & Panjeke, N. 2011. Antifungal activity of peppermint (*mentha piperita* 1.) on phytopathogenic fungi. *Journal of Medicinal Plant*, 10(38): 26-34.

Al-Mughrabi, K.I. 2004. Sensitivity of Jordanian isolates of *Alternaria solani* to mancothane. *Phytopathology Mediterranea* 43: 14–19.

Anthony, S., Abeywickrama, K., Dayananda, R., Wijeratnam, S.W. & Arambewela, L. 2004. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka and their treatment with essential oils. *Mycopathologia,* 157: 91-97.

Behnam, S., Farzaneh, M., Ahmadzadeh, M. & Tehrani A.S. 2006. Composition and antifungal activity of essential oils of *Mentha piperita* and *Lavendula angustifolia* on post-harvest phytopathogenes. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 71:1321-1326.

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

Brook, P.J. 1990. Diseases of kiwifruit. Warrington IJW, GC, editor. *Kiwifruit*: science and Management. Auckland: Ray Richards: 420-428.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications infoods. *International Journal of Food Microbiology,* Vol.94, pp. 223-253.

Charles, A., Onyeani, S.O., Osunlaja, O.O. & Oworu AO, 2012. Evaluation of effect of aqueous plant extract in the control of storage fungi. *International Journal of Sciences & Technology,* (6): 72-82.

Farzaneh, M., Ahmadzadeh, M., Hadian, J. & Sharifi-Tehrani A, 2006. Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of Artemisia on some soil-borne phytopathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology,* 71: 1327-1333.

Feng, W., Chen, J., Zheng, X. & Liu, Q. 2011. Thyme oil to control *Alternaria alternata* in vitro and in vivo as fumigant and contact treatments. *Food Control,* 22: 78-81

Ghosta, Y., Ershad, D., Zare, R. & Mohammadi Goltape, E. 2003. Taxonomic study on Botrytis species in Iran (2). *Rostaniha,* 4(3-4): 105-121.(in persian).

Giordani, R., Hadef, Y. & Kaloustian, J. 2008. Compositions and antifungal activities of essential oils of some algerian aromatic plants. *Fitoterapia*, 79:199-203

Hadian, J., Farzaneh, M., Ghorbani, M. & Mirjalili, M.H. 2007. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia khorasanica* on soil-borne phytopathogens. *Journal of Essential Oil Research,* 10(1):53-58.

Jafari, A., Fattahi, A. & Zarrin Far, H. 2006. Survey of traditional medical herb in Yazd city to aflatoxin producer fungi. In: Abstracts book of 9th Iranian Nutrition Congress. *Tabriz: Tabriz Medical Sciences and Health Service University,* 245-246.

Jannings, W. & Shibamoto, J. 1980. Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance by Capillary Gas Chromatography. *New York, Academic Press,* 375p.

Kordali, S., Kotan, R., Mavi, A., Cakir, A., Ala, A. & Yildirim A. 2005. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* and of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *Artemisia santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* 53: 9452–9458.

Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Prasad, C.S. & Dubey, N.K. 2008. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservation against post harvest fungal infestation of food commodities. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 575-580.

Manning, M.A. & Lallu, N. 1995. Fungal diseases of kiwifruit stored in controlled atmosphere conditions in New Zealand. *In III International Symposium on Kiwifruit,* 444: 725-732.

Mason, T.G., Wilking, J.N, Meleson, K., Chang, C.B. & Graves S. 2006. Nanoemulsions: formation, ucture and physical properties. *Journal of Physics: Condensed matter,* 18: 35-66.

Mironescu, M. & Georgescu, C. 2008. Preliminary researches on the effect of essential oil on mouldsi solated from surfaces. *Journal of Agro-alimentary Processes and Technologies,* 14: 30-330.

Mehrabani, M., Asadipour, A. & Amoli, S.S. 2004. Chemical constituents .of the essential oil of *Nepeta depauperata* benth. from Iran. *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 12(3): 98–100.

Moghtader M. & Afzali D. 2009: Study of the antimicrobial properties of essential oil of rosemary. *American Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences,* 5: 393–397.

Mohammadi, S. & Piri, K.h. 2014. Antifungal effects of two medicinal plant native to Iran. *International Journal of Advanced Biological Research,* 2322-4827.

Neslihan, D., Recep, k., Fatih, D. & Fikrettin, S. 2008. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis* . *International Journal of food microbiology,* 124: 179-182

Plaza, P., Torres, R., Usall, J., Lamarca, N. & Vinasa, I. 2004. Evaluation of the potential of commercial post-harvest application of essential oils to control citrus decay. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology,* 79(6): 935-940.

Plotto, A., Roberts, R.G. & Roberts, D.D. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicun esculentum* L.), *Acta Horticutural Science and Biotechnology,* 45- 737.

Ramezani, M., Behravan, J. & Yazdinejad, A. 2004. Composition and antimicrobial activity of the volatile oil of *Artemisia khorassanica* Podl. from Iran. *Journal of Pharmaceutical Biology,* 42(8):1-4.

Risser, G., Banihashemi, Z. & Davis, D.W. 1976. A proposed nomenclature of *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* races and resistance genes in *Cucumis melo*. *Journl of Phytopathology,* 66: 1105-1106.

Rustaiyan, A., Masoudi, S., Yari, M., Rabbani, M., Motiefar, H.R. & Larijani, K. 2000. Essential oil of *Salvia lereifolia* Benth. *Journal of Essential Oil Research,* 12(5): 601-602.

Satari, M., Natanzian, G., Yadgari, M.H., Goudarzi, G.R. & Saharkhiz, M.J. 2008. Antifungal activity of essential oil and alcoholic extract of Carum copticum against fluconazole resistant and susceptible *Candida albicans* isolated. *Modares Journal of Medical sciences (Pahtobiology),* 11(1-2):91-97

Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, C. & Catalan, C. 2005. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potential of essential oil and acetone extract of Nigella sativa seeds. *Journal Science of Food and Agriculture,* 85: 2297 - 306.

Shimoni, M., Puteviesk,E., Ravid, V. & Revin, R. 1993. Antifungal activity of volatile fraction of essential oils from four aromatic wild plants in Israel. *Journal Chemichal Ecology,* 19: 1129-1133.

Vale-Silva, L., Silva, M.J., Oliveira, D., Goncalves, M.J., Cavaleiro, C. & salgueiro, L. 2012. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. *Journal of Medical Microbiology,* 61: 252-260.

Journal of Novel Researches on Plant Protection
(Islamic Azad University, Shiraz Branch)
2021 – 10 (1): 21-38

Effects of Marjoram, wild mint and Summer savory essential oils on mycellial growth of *Botrytis cinerea*

Ehsan Hasanvand[1], Sedighe Mohammadi[2*],Tahereh Basirnia

1. PhD. Student, Department of Plant Protection, Lorestan University, Khoram Abad, Iran

2. Department of Plant Pathology, Shiraz Branch, Islamic Azad University, Shiraz, Iran و (*) Mohammadi.pp@gmail.com

3. Department of Plant Pathology, Marvdasht Branch, Islamic Azad University, Marvdasht, Iran

Abstract

The use of antifungal compounds such as essential oils for the preservation of natural fruits during the storage period has dramatically been rising. In this study, the individual essential oils of Marjoram (*Origamum marjorana*), wild mint (*Mentha longifolia*) and Summer savory (*Satureja khuzistanica*) were employed for the control of corruption of fruits during the storage period. In this study, the antifungal activity of essential oils was investigated on growth a specie of plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea* on PDA medium and fruit tissues. Antifungal activities on PDA medium were measured by disk diffusion and volatile essential oil methods. To evaluate the effects of the essential oils on fungal growth in fruit tissue, the Kiwi were inoculated with 30 µl of spore suspension (10^6 spore/ml), and then fruits were sprayed with 4 and 20 µl/ml of the essential oils. Seven days after inoculation, fruits were evaluated in terms of pollution. To calculate the percentage of infected fruit was divided into eight parts and the number of infected fruit fungus pathogen contamination in 12.5% multiplication and percentages were calculated. Data were analyzed as a completely randomized design with three replications. Essential oils have showed significant inhibitory effect on fungus growth. The results showed that most inhibition of growth in a paper disk method was in order for fungus *B. cinerea* related to the essential oil of Summer savory 56.54 percent respectively and volatile essential oil methods was related to the essential oil of Summer savory was 55.97 percent respectively. The results inoculated of the fruit tissue with a spore suspension *B. cinerea* showed that respectively treatment (20µl/ml) of Marjoram (with 35.42% of disease) had the inhibitoriest effect against the pathogen.

Keywords: Essential Oils, Fungal Storage Inhibition of Mycelia Growth, B. cinerea, Kiwi.