

بررسی تأثیر اسانس سه گونه گیاه دارویی آویشن دنايي، نعنای فلفلی و مرزه خوزستانی در کنترل *Penicillium expansum* عامل پوسیدگی کپک آبی سیب

نسیم صفری*^۱، رقیه همتی^۲، محسن فرزانه^۳ و ساناز چگینی^۴

^۱ دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه زنجان

^۲ استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

^۳ استادیار پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی، دانشگاه شهید بهشتی

^۴ دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه تهران

*مسئول مکاتبه: nassim.safari@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۴/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۲/۰۶/۲۰

چکیده

در این مطالعه اثر اسانس سه گونه گیاه دارویی آویشن دنايي (*Thymus daenensis*)، نعنای فلفلی (*Mentha piperita*) و مرزه خوزستانی (*Satureja khuseztanica*) در جلوگیری از رشد قارچ *Penicillium expansum* عامل کپک آبی سیب، در شرایط آزمایشگاه به روش اختلاط با محیط کشت PDA و کاربرد مخلوط اسانس‌ها در غلظت نهایی ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر بررسی و تأثیر آن در شرایط انبار روی میوه سیب ارزیابی شد. نتایج بررسی آزمایشگاهی نشان داد که هر سه اسانس تأثیر قابل توجهی در جلوگیری از رشد قارچ دارند به‌طوریکه اسانس‌های آویشن، مرزه و نعنای فلفلی در ترتیب به حداقل غلظت‌های ۶۰۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر بازدارندگی کامل از رشد قارچ نشان دادند. از طرفی کاربرد تلفیقی ترکیب یا مخلوط اسانس‌ها در برخی موارد باعث افزایش خاصیت ضد قارچی آن‌ها شد. نتایج بررسی‌ها در شرایط انبار روی میوه سیب نشان داد که غلظت شش در هزار هر سه اسانس باعث ایجاد سوختگی روی میوه سیب گردید اما غلظت چهار در هزار اسانس مرزه خوزستانی بهترین کنترل را داشت و اسانس‌های آویشن دنايي و نعنای فلفلی در غلظت ۴ در هزار به ترتیب در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند.

واژه‌های کلیدی: اسانس‌های گیاهی، بیماری‌های پس از برداشت، کپک آبی سیب.

مقدمه

دمای سرد یخچال تا زمان مصرف محصول به گسترش خود ادامه می‌دهند. قارچ‌های جنس‌های *Botrytis* و *Rhizopus Aspergillus* اغلب بیماری‌های پس از برداشت را ایجاد میکنند. قارچ‌هایی که بعد از برداشت به میوه‌ها خسارت می‌زنند حتی در مناطقی که انبارهای

بیماری‌های پس از برداشت محصول، بیماری‌هایی هستند که در طی دوره‌های برداشت، درجه‌بندی، بسته بندی، انبارداری و حمل‌ونقل محصول به بازار به وجود می‌آیند و این بیماری‌ها حتی در دمای معمولی اتاق و یا

در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای آغاز گردیده که نشان می‌دهد متابولیت‌های ثانویه برخی گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد قارچ‌ها مؤثر بوده و جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی هستند (آراس و اسای ۲۰۰۱). تحقیقات نشان داده است که گیاهان معطر متعلق به تیره‌های نعناعیان، کاسنی و چتریان از ترکیبات ضد- میکروبی و آنتی‌اکسیدانی برخوردار هستند (کارسون و همکاران ۲۰۰۴). خاصیت ضد قارچی برخی گیاهان دارویی از جمله دارچین، پونه کوهی، رزماری، مریم‌گلی، میخک، فلفل، ریحان، آویشن، مرزه، زیره، لیمو و نعناع در تحقیقات متعددی گزارش شده است (بهنام و همکاران ۲۰۰۶ و فرزانه و همکاران ۲۰۰۶). اسانس گیاهان آویشن، مرزه، آلتوورا و درخت چریش دارای توانایی بازدارندگی از رشد میسلیمی و تولید اسپور توسط قارچ‌های بیمارگر *A. flavus*، *Aspergillus niger* و *Penicillium expansum* می‌باشند (چارلز و همکاران ۲۰۱۲). هدف از این تحقیق تهیه اسانس‌های مختلف گیاهان آویشن دنایی (*Thymus daenensis*)، مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) و نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) و بررسی خاصیت ضد قارچی آن‌ها به تنهایی و یا در مخلوط با یکدیگر در کاهش رشد قارچ عامل بیماری کپک آبی سیب در شرایط آزمایشگاه و انبار می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه زادمایه بیمارگر

قارچ عامل پوسیدگی پس از برداشت میوه سیب یا همان کپک آبی سیب *P. expansum* از کلکسیون گروه کشاورزی پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی دریافت شد. برای تهیه زادمایه جدایه مورد نظر، از کشت یک هفته‌ای آن روی محیط PDA

پیشرفته با تکنولوژی بالا دارند، هم خسارت‌زا هستند. میوه سیب معمولاً شش تا ۱۰ ماه بعد از برداشت در سردخانه نگهداری می‌شود و در این مدت در معرض حمله بسیاری از عوامل بیماری‌زا قرار دارد. بیماری‌های قارچی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای بعد از برداشت سیب هستند. این عوامل گاهی اوقات تا ۵۰ درصد به میوه‌ها خسارت وارد میکنند (آراس و اسای ۲۰۰۱). سال‌ها تحقیق بر اهمیت رعایت دقیق عملیات برداشت و بسته‌بندی میوه سیب و تأثیر قارچکش‌ها در نابودی و کاهش پیشرفت فساد و پوسیدگی متمرکز شده است. اطلاعات به دست آمده کمک می‌کند تا شیوه‌های مؤثر کنترل این فساد و پوسیدگی قبل و بعد از برداشت بهتر و بیشتر توسعه داده شود. بیماری‌های اصلی پس از برداشت از زخم‌های روی میوه شروع می‌شوند و برخی از آن‌ها حتی در دمای پائین هم قادر به ایجاد خسارت هستند.

سمپاشی میوه‌ها پیش از برداشت با بنومیل^۱ و بلافاصله پس از برداشت با تیا بنداز (TBZ)، شستن میوه-ها با سدیم اورتوفنیل فئات (SOPP) و یا ایمازلیل^۲ به صورت محلول و یا تیمارهای واکسی در خطوط بسته بندی و جعبه‌زنی کارخانجات رایج‌ترین روش کنترل بیماری‌های پس از برداشت هستند. ولی موضوعی که باعث شده مصرف این سموم مسئله‌ساز شود، مصرف بی‌رویه و زیان‌های بهداشتی آن‌ها است. به طور کلی نمی‌توان از یک ترکیب سمی نام برد که تنها روی موجودات هدف مؤثر باشد. این ترکیب‌ها ممکن است از نظر بهداشتی زیان‌هایی چون مسمومیت حاد و یا مزمن برای موجودات غیر هدف از جمله انسان، خاصیت تجمعی در بدن موجودات زنده و یا خاصیت سرطان‌زایی داشته باشند.

¹Benlate

²Imazalil

میکرولیتر از آن به دستگاه GC تزریق شد و پس از یافتن برنامه ریزی مناسب حرارتی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس و تعیین درصد و زمان بازداری هر ترکیب، از هر گونه گیاهی یک میکرولیتر اسانس به دستگاه GC-MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها تعیین گردید. شناسایی ترکیب‌ها بر اساس 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.

بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌ها در آزمایشگاه

اثر ضد قارچی اسانس‌های استخراج شده روی قارچ عامل کپک آبی سیب با روش اختلاط اسانس با محیط کشت PDA بررسی شد. برای این منظور از اسانس‌های مورد نظر در محلول توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد)، امولسیون تهیه شد. همچنین محلول توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDA پس از اتوکلاو، در دمای اطاق قرار داده شد تا دمای آن‌ها به ۴۵-۴۲ درجه سانتیگراد تنزل یابد غلظت‌های ۰/۷۵، ۱/۵۰، ۳/۰۰، ۶/۰۰ و ۱۲/۰۰ میکرولیتر اسانس در لیتر محیط کشت، به فلاسک‌های حاوی محیط PDA ریخته شد و به هم زده شد تا امولسیون یکنواخت به وجود آید. محیط‌های حاصل بلافاصله درون ظروف پتری به قطر ۹ سانتی‌متری تقسیم و اجازه داده شد تا محیط جامد گردد. سپس دیسک‌های قارچی به قطر پنج میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ کن از کشت‌های جوان قارچ‌های مذکور تهیه شد و وسط هر پتری حاوی محیط کشت یک دیسک قرار داده شد. پتری‌های مایه‌زنی در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد

نگهداری شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و دوره نوری معمولی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) استفاده شد. به این ترتیب که به کشت‌های مورد نظر ۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد توئین ۸۰ افزوده شده و سطح تشتک‌های پتری به کمک یک لوله خمیده شیشه‌ای سترون تراشیده شده و سوسپانسیون حاصل جهت جدا کردن کیندیوفورها و میسلیم‌های همراه از پارچه ملل ۴ لایه عبور داده شد و سپس به کمک هماسیتومتر به غلظت 10^6 اسپور در هر میلی‌لیتر تعیین شد.

تهیه مواد گیاهی و استخراج اسانس

مواد گیاهی گونه‌های مورد آزمایش شامل پیکره رویشی آویشن دناپی، مرزه خوزستانی و نعنای فلفلی جمع‌آوری شده به ترتیب از مزارع و رویشگاه‌های صالح آباد ایلام، کشکان خرم‌آباد و پژوهشکده گیاهان و مواد اولیه دارویی دانشگاه شهید بهشتی تهیه گردید. هر یک از نمونه‌ها بوسیله آسیاب خرد شده و سپس اسانس آن‌ها به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر به مدت سه ساعت استخراج گردید. استخراج اسانس برای هر نمونه در سه تکرار و برای هر تکرار ۵۰ گرم نمونه گیاهی استفاده شد. اسانس بدست آمده بوسیله سولفات سدیم خشک‌آگیری و در شیشه‌های تیره رنگ در دمای چهار درجه سانتیگراد درون یخچال تا زمان آنالیز و آزمون ضد قارچی نگهداری شد.

آنالیز و شناسایی ترکیب‌های اسانس

اسانس‌های بدست آمده از هر سه گونه گیاهی با دستگاه‌های کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی گازی همراه با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) مورد شناسایی قرار گرفتند. در ابتدا اسانس استخراج شده از هر سه تکرار برای هر گونه گیاهی مخلوط شد و یک

بررسی اثر اسانس‌ها و مخلوط آن‌ها در کنترل بیماری

کپک آبی سیب در انبار

برای این منظور از میوه‌های سیب که همگی سالم و فاقد هر گونه تیمار شیمیایی و عارضه فیزیولوژیک بودند استفاده گردید. میوه‌ها از نظر اندازه و شاخص رسیدگی یکسان بودند. برای ضدعفونی سطحی، میوه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۰/۱ درصد غوطه‌ور شده و سپس دوبار با آب سترون شستشو داده شدند و در نهایت به مدت یک دقیقه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند، پس از خشک شدن در شرایط سترون روی هر میوه سیب در دو طرف میوه، زخمی به قطر دو میلی‌متر و عمق دو میلی‌متر ایجاد شد. پس از گذشت یک ساعت و خشک شدن زخم‌ها، محل زخم با ۲۵ میکرولیتر سوسپانسیون 10^6 اسپور بیمارگر در میلی‌لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵٪ توئین ۸۰ مایه‌زنی شد. پس از خشک شدن زخم‌ها، میوه‌ها بوسیله محلول‌های تهیه شده از اسانس‌ها با غلظت‌های یک، دو، چهار و شش در هزار محلول پاشی و در ظروف یکبار مصرف بسته‌بندی شده و به مدت یک هفته در اتاق کشت با دمای ۲۴ درجه سانتیگراد و رطوبت نسبی 80 ± 5 درصد در شرایط سترون نگهداری شد. بعد از طی دوره نگهداری زخم‌ها از نظر ایجاد پوسیدگی دو بار یکی در روز دهم و دیگری در روز بیستم انبارداری بررسی شده و قطر لکه‌ها با استفاده از کولیس اندازه‌گیری شد. در این آزمایش برای هر تیمار شش تکرار در نظر گرفته شد که هر تکرار شامل سه میوه و هر میوه دارای دو زخم بود. همچنین از قارچ‌کش تیا بندازول با غلظت یک، دو و چهار در هزار نیز به عنوان یک تیمار جهت مقایسه استفاده گردید. سیب‌های محلول پاشی شده با توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) و سوسپانسیون اسپور قارچ به عنوان شاهد آلوده و سیب‌های محلول پاشی شده با توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) بدون سوسپانسیون اسپور قارچ نیز به عنوان شاهد سالم در نظر گرفته شد.

قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ 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 چهار تکرار در نظر گرفته شد. درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها با بهره‌گیری از فرمول ابوت (۱۹۲۵) به شرح زیر

$$IP = C - T / C \times 100 \text{ که در آن:}$$

IP: درصد بازدارندگی

C: میانگین قطر هاله قارچ در تیمار شاهد

T: میانگین قطر هاله قارچ در تیمار مورد نظر تعیین گردید و حداقل غلظت بازدارندگی کامل اسانس‌ها در جلوگیری از رشد قارچ‌ها محاسبه گردید.

به منظور بررسی قارچ‌کشی^۱ یا قارچ ایستایی^۲ بودن اسانس، تیمارهایی که رشد قارچی در آن‌ها مشاهده نگردید روی محیط کشت PDA واکشت شد و رشد یا عدم رشد قارچ بر روی محیط کشت پس از یک هفته بررسی گردید.

بررسی اثر ضد قارچی مخلوط اسانس‌ها در آزمایشگاه

غلظت ۶۰۰ نانولیترا از اسانس‌ها و مخلوط آن‌ها بطور جداگانه در میلی‌لیتر محیط کشت مایع PDB^۳ تهیه شده و به درون چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای ریخته شد. سپس تعداد 10^4 عدد اسپور قارچ به هر چاهک اضافه گردید. میکروپلیت‌های مایه زنی شده در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت روی شیکر-انکوباتور قرار گرفتند. تاثیر ۱۰ تیمار ترکیبی از سه اسانس مورد استفاده با غلظت نهایی ۶۰۰ پی پی ام در محیط کشت PDB مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱).

^۱ - Fungicide

^۲ - Fungistate

^۳ - Potato Dextrose Broth

جدول ۱- تیمارهای مربوط به اختلاط اسانسها

شماره تیمار	۲۰۰ میکرولیتر در لیتر (۱)*	۲۰۰ میکرولیتر در لیتر (۲)*	۲۰۰ میکرولیتر در لیتر (۳)*
۱	آویشن دنايي	آویشن دنايي	آویشن دنايي
۲	آویشن دنايي	آویشن دنايي	نعناع فلفلی
۳	آویشن دنايي	آویشن دنايي	مرزه خوزستانی
۴	آویشن دنايي	نعناع فلفلی	نعناع فلفلی
۵	آویشن دنايي	نعناع فلفلی	مرزه خوزستانی
۶	آویشن دنايي	مرزه خوزستانی	مرزه خوزستانی
۷	نعناع فلفلی	نعناع فلفلی	مرزه خوزستانی
۸	نعناع فلفلی	مرزه خوزستانی	مرزه خوزستانی
۹	نعناع فلفلی	نعناع فلفلی	نعناع فلفلی
۱۰	مرزه خوزستانی	مرزه خوزستانی	مرزه خوزستانی

*مقدار اسانسها در لیتر هر تیمار را بیان می کند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده ها در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگینها با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال یک و پنج درصد به کمک نرم افزار آنالیز SAS انجام شد.

نتایج

ترکیبات عمده اسانسهای مورد آزمایش

ترکیبهای اصلی در اسانس آویشن دنايي، تیمول ۶۴/۸ درصد، آلفاتریپنین ۱۱/۳ درصد و پی سیمن ۷/۹ درصد بود (جدول ۲).

ترکیبهای اصلی در اسانس گونه *S. khuzistanica*

شامل کارواکرول ۵۷/۴ درصد، پی سیمن ۱۱ درصد و گاما ترپینن ۱۸/۵ درصد بود (جدول ۳). منتانول ۳۶/۲ درصد و منتون ۳۲/۴ درصد، مهمترین ترکیبات موجود در اسانس نعنای فلفلی بودند (جدول ۴).

جدول ۲- نوع و درصد ترکیب‌های عمده شناسایی شده در اسانس آویشن دنايي (*Thymus daenensis*)

درصد ترکیب موجود	ترکیب	شاخص بازدارندگی * (RI)	ردیف
۰/۸	۹۲۵	alpha-thujene	۱
۱/۱	۹۳۳	alpha-pinene	۲
۰/۱	۹۴۷	Camphene	۳
۰/۷	۹۷۴	beta-pinene	۴
۱/۲	۹۸۱	Myrcene	۵
۰/۲	۹۹۹	alpha-phelandrene	۶
۷/۹	۱۰۱۴	p-cymene	۷
۰/۳	۱۰۵۶	cis-sabinene hydrate	۸
۱۱/۳	۱۰۸۰	alpha-terpinene	۹
۰/۱	۱۰۵۵	t-sabinene hydrate	۱۰
۰/۱	۱۱۵۱	4.5-epoxy-carane	۱۱
۰/۳	۱۱۶۳	terpin-4-ol	۱۲
۰/۱	۱۱۷۵	alpha-terpineol	۱۳
۰/۱	۱۲۲۵	thymyl methyl ether	۱۴
۶۴/۸	۱۲۶۶	Thymol	۱۵
۰/۹	۱۲۸۲	Carvacrol	۱۶
۰/۲	۱۲۹۶	4-terpinyl acetate	۱۷
۲/۸	۱۳۴۵	carvacryl acetate	۱۸
۳/۵	۱۴۲۴	beta-caryophyllene	۱۹
۰/۱	۱۴۲۷	alpha-humulene	۲۰
۱/۲	۱۵۰۱	beta-bisabolene	۲۱
۰/۱	۱۵۷۶	Spathulenol	۲۲
۹۸/۱	-	Total	

* (Retention indices) شاخص بازدارندگی به نسبت خروج آلکان‌های (C24 n-C6) روی ستون 1-DB برآورد شده است.

جدول ۳- نوع و درصد ترکیب‌های عمده شناسایی شده در اسانس مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*)

درصد ترکیب موجود	شاخص بازدارندگی * (RI)	ترکیب	ردیف
۱/۲	۹۲۵	alpha-thujene	۱
۱/۶	۹۳۳	alpha-pinene	۲
۰/۱	۹۴۷	Camphene	۳
۱/۲	۹۷۴	beta-pinene	۴
۱/۷	۹۸۱	Myrcene	۵
۰/۲	۹۹۹	alpha-phelandrene	۶
۱۱/۰	۱۰۱۴	p-cymene	۷
۰/۷	۱۰۲۳	1.8-cineole	۸
۱۸/۵	۱۰۵۳	gama-terpinene	۹
۰/۲	۱۰۵۶	cis-sabinene hydrate	۱۰
۰/۲	۱۰۸۵	Linalool	۱۱
۰/۲	۱۰۵۵	t-sabinene hydrate	۱۲
۰/۱	۱۱۴۵	trans-2-carene-4-ol	۱۳
۰/۵	۱۱۶۳	terpin-4-ol	۱۴
۰/۲	۱۱۷۵	alpha-terpineol	۱۵
۰/۳	۱۲۶۶	Thymol	۱۶
۵۷/۴	۱۲۸۲	Carvacrol	۱۷
۲/۱	۱۳۴۵	carvacryl acetate	۱۸
۰/۴	۱۴۲۴	beta-caryophyllene	۱۹
۰/۷	۱۵۰۱	beta-bisabolene	۲۰
۰/۱	۱۵۷۶	Spathulenol	۲۱
۰/۳	۱۹۶۰	caryophyllene oxide	۲۲
۹۸/۸	-	Total	

* (Retention indices) شاخص بازدارندگی به نسبت خروج آلکان‌های (C24 n-C6) روی ستون 1-DB برآورد شده است

جدول ۴- نوع و درصد ترکیب‌های عمده شناسایی شده در اسانس نعناع فلفلی (*Mentha piperita*)

ردیف	ترکیب	شاخص بازدارندگی * (RI)	درصد ترکیب
۱	Cineol-1,8	۱۰۲۸	۱۰
۲	linalool	۱۰۸۹	۰/۴
۳	menthone	۱۱۵۲	۳۲/۴
۴	borneol	۱۱۵۵	۱/۲
۵	isoimenthone	۱۱۵۸	۴/۱
۶	menthofuran	۱۱۶۲	۳/۶
۷	menthol	۱۱۸۰	۳۶/۲
۸	pulegone	۱۲۲۶	-
۹	Lavandulyl acetate	۱۲۷۲	-
۱۰	Phellanderal	۱۲۶۷	-
۱۱	menthyl acetate	۱۲۸۲	۱/۵
۱۲	β -Caryophyllene	۱۴۲۶	-
۱۳	E-caryophyllene	۱۴۲۷	۲/۵
۱۴	Germacrene D	۱۴۴۷	۲/۵
	Total	-	۹۴/۴

* (Retention indices) شاخص بازدارندگی به نسبت خروج آلکان‌های (C24 n-C6) روی ستون DB-1 برآورد شده است.

بررسی اثر ضدقارچی اسانس‌ها

مخلوط با محیط کشت PDA

نتایج بدست آمده از بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌ها در محیط جامد PDA نشان می‌دهد که به طور کلی با افزایش غلظت اسانس، میزان فعالیت ضد قارچی افزایش یافته به طوریکه میزان شدت افزایش خاصیت

بازدارندگی روی قارچ *P. expansum* در مورد اسانس مرزه خوزستانی مشهودتر بود (جدول ۵). با توجه به نتایج، اسانس مرزه خوزستانی با حداقل غلظت بازدارندگی کامل برابر ۳۰۰ میکرولیتر در لیتر محیط کشت (MIC=۳۰۰ μ L/L) بیشترین فعالیت ضد قارچی را نشان داد در حالی‌که اسانس آویشن دناپی و نعناع فلفلی در غلظت ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر محیط کشت، بازدارندگی

کامل نشان دادند (جدول ۶). نتایج بدست آمده از واگشت دیسک‌های قارچی در تیمارهایی که رشد قارچی در آنها مشاهده نشد به منظور بررسی قارچ‌کش یا قارچ‌ایستا بودن غلظت اسانس، نشان داد اسانس آویشن دناپی و

مرزه خوزستانی در غلظت ۶۰۰ و اسانس نعناع فلفلی در غلظت بیش از ۱۲۰۰ میکرولیتر در لیتر محیط کشت فعالیت قارچ‌کشی دارند (جدول ۶).

جدول ۵- درصد بازدارندگی (IP) غلظت‌های مختلف اسانس‌های سه گونه گیاه دارویی در جلوگیری از رشد قارچ عامل کپک آبی سیب در شرایط آزمایشگاه به روش مخلوط با محیط کشت PDA

اسانس	غلظت (میکرولیتر در لیتر)	درصد بازدارندگی اسانس‌ها
<i>Thymus daenensis</i> (آویشن دناپی)	۷۵	**h* .
	۱۵۰	^e ۶۵/۲۵
	۳۰۰	^b ۹۰.
	۶۰۰	^a ۱۰۰.
	۱۲۰۰	^a ۱۰۰.
<i>Satureja khuseztanica</i> (مرزه خوزستانی)	۷۵	^g ۱۸/۷۵
	۱۵۰	^d ۶۲/۵۰
	۳۰۰	^a ۱۰۰.
	۶۰۰	^a ۱۰۰.
	۱۲۰۰	^a ۱۰۰.
<i>Mentha piperita</i> (نعناع فلفلی)	۷۵	^h .
	۱۵۰	^f ۵۰.
	۳۰۰	^c ۸۱/۲۵
	۶۰۰	^a ۱۰۰.
	۱۲۰۰	^a ۱۰۰.

* درصد بازدارندگی در هر تیمار مربوط به چهار تکرار (چهار تشتک پتری به قطر هشت سانتیمتر) است.

**حروف غیر متشابه بیانگر اختلاف معنی دار در سطح ۵ % $p \leq$ می‌باشد.

فلفلی در غلظتی کمتر از ۱۲۰۰ میکرولیتر حداقل غلظت قارچکشی را از خود نشان دادند.

بررسی اثر ضد قارچی مخلوط اسانس‌ها در آزمایشگاه بررسی نتایج حاصل از ۱۰ تیمار تلفیقی از سه اسانس در غلظت نهایی ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر نشان داد کاربرد مخلوط اسانس‌ها در برخی موارد باعث افزایش خاصیت ضد قارچی آن‌ها می‌شود (جدول ۶). از ۱۰ تیمار تلفیقی مورد مطالعه، پنج تیمار تلفیقی ذکر شده در جدول (۶)، در غلظت نهایی ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر علاوه بر خاصیت قارچ ایستایی، دارای فعالیت قارچکشی علیه قارچ مورد آزمایش نیز بودند.

در بررسی حداقل غلظت بازدارندگی کامل (MIC) و حداقل غلظت قارچکشی (MFC) اسانس‌های سه گونه گیاه دارویی در جلوگیری از رشد قارچ *Penicillium expansum* در شرایط آزمایشگاه به روش مخلوط با محیط کشت PDA مشاهده شد که در مورد اسانس آویشن دنایی و نعنای فلفلی غلظت ۶۰۰ میکرولیتر و مرزه خوزستانی غلظت ۳۰۰ میکرولیتر دار، حداقل غلظت بازدارندگی کامل را از خود نشان دادند. همچنین اسانس آویشن دنایی و مرزه خوزستانی هر دو در غلظت ۶۰۰ ماکرولیتر و نعنای

جدول ۶- بررسی تلفیق نوع و مقدار اسانس‌های سه گونه گیاه دارویی در شرایط آزمایشگاه (غلظت نهایی ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر) به روش

میکروتیتر پلیت ۹۶ خانه‌ای

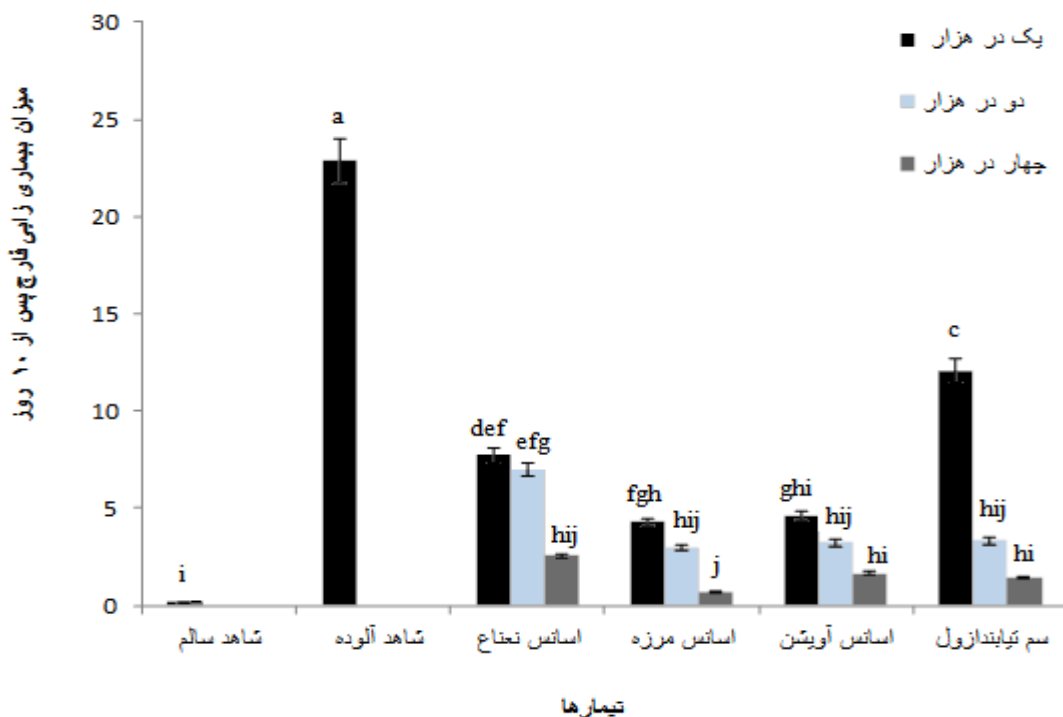
نوع فعالیت در ۶۰۰ میکرولیتر	۲۰۰	۲۰۰	۲۰۰	تیمار
	میکرولیتر (۳)	میکرولیتر (۲)	میکرولیتر (۱)	
قارچ کشی	آویشن دنایی	آویشن دنایی	آویشن دنایی	۱
قارچ ایستایی	نعناع فلفلی	آویشن دنایی	آویشن دنایی	۲
قارچ کشی	مرزه خوزستانی	آویشن دنایی	آویشن دنایی	۳
قارچ ایستایی	نعناع فلفلی	نعناع فلفلی	آویشن دنایی	۴
قارچ کشی	مرزه خوزستانی	نعناع فلفلی	آویشن دنایی	۵
قارچ کشی	مرزه خوزستانی	مرزه خوزستانی	آویشن دنایی	۶
قارچ ایستایی	مرزه خوزستانی	نعناع فلفلی	نعناع فلفلی	۷
قارچ ایستایی	مرزه خوزستانی	مرزه خوزستانی	نعناع فلفلی	۸
قارچ ایستایی	نعناع فلفلی	نعناع فلفلی	نعناع فلفلی	۹
قارچ کشی	مرزه خوزستانی	مرزه خوزستانی	مرزه خوزستانی	۱۰

بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌ها در شرایط انبار

۱- بررسی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها در جلوگیری از میزان پوسیدگی پس از ۱۰ روز نگهداری در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد

با توجه به نتایج بدست آمده پس از دوره نگهداری، از نظر پوسیدگی میوه، بین اسانس‌های مختلف و غلظت‌های مختلف اسانس، اختلاف معنی‌داری وجود داشت (شکل ۱). بطور کلی با افزایش غلظت اسانس تا غلظت چهار در هزار، فعالیت ضد قارچی افزایش یافت ولی غلظت شش در هزار تمامی اسانس‌ها موجب ایجاد سوختگی‌هایی بر روی میوه گردید که این سوختگی‌ها خود باعث گسترش بیشتر

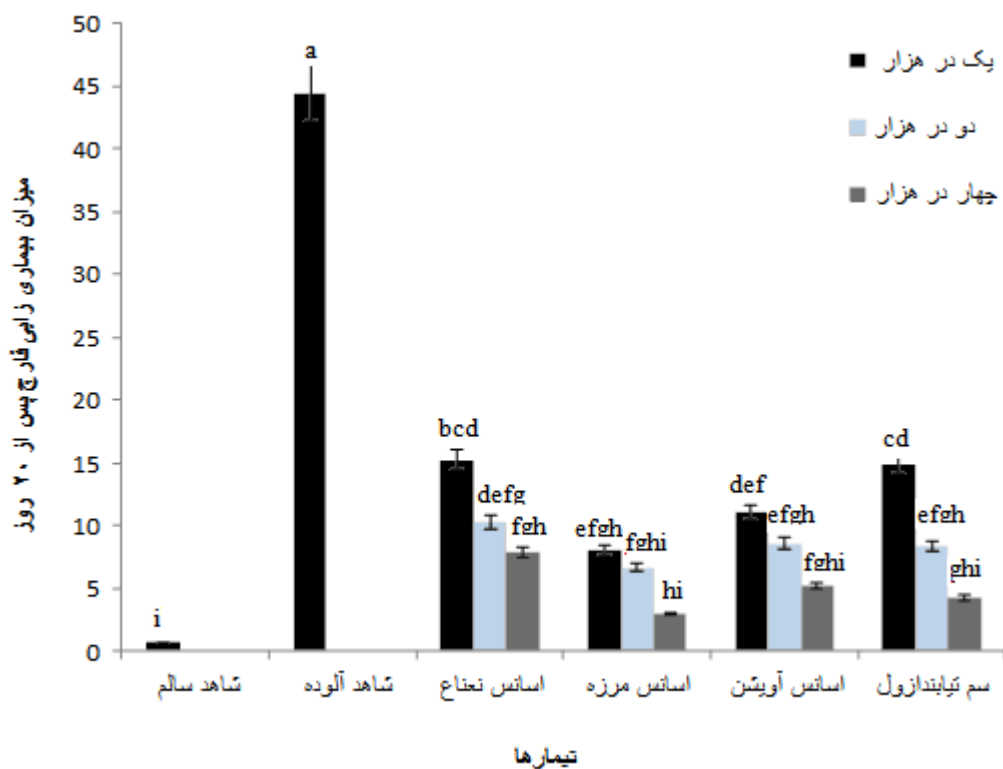
پوسیدگی شد. نتایج حاصل از بررسی سایر غلظت‌های اسانس‌ها در کاهش پوسیدگی ناشی از *P. expansum* در روز دهم پس از انبارداری نشان داد، بطور کلی با افزایش غلظت اسانس فعالیت ضد قارچی افزایش یافته و اسانس مرزه خوزستانی در مقایسه با سایر اسانس‌ها از قدرت بازدارندگی بیشتری برخوردار بودند و در کل تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۴ در هزار اسانس مرزه خوزستانی با سایر اسانس‌ها و سم تیابندازول وجود داشت.



شکل ۱- مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌های سه گونه گیاهی در جلوگیری از میزان بیماری پوسیدگی میوه سیب ناشی از *Penicillium expansum* پس از ۱۰ روز نگهداری در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد.

خوزستانی در غلظت ۴ در هزار در مقایسه با سایر اسانس‌ها از قدرت بازدارندگی بیشتری برخوردار بود و در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌داری با سایر اسانس‌ها و سم تیابندازول، تیابندازول داشت و پس از آن به ترتیب، سم تیابندازول، اسانس آویشن دنیایی و اسانس نعناع فلفلی در غلظت ۴ در هزار بهترین کنترل را داشتند (شکل ۲).

۲- بررسی غلظت‌های مختلف اسانس‌های گیاهی در جلوگیری از میزان بیماری زایی پس از ۲۰ روز نگهداری در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد نتایج حاصل از بررسی اسانس‌ها در کاهش پوسیدگی ناشی از *P. expansum* در روز بیستم پس از انبارداری نشان داد که بطور کلی با افزایش غلظت اسانس فعالیت ضد قارچی افزایش می‌یابد. اسانس مرزه



شکل ۲- مقایسه میانگین تاثیر غلظت‌های مختلف اسانس‌های سه گونه گیاهی در جلوگیری از میزان بیماری پوسیدگی میوه سیب ناشی از

Penicillium expansum پس از ۲۰ روز نگهداری در تاریکی و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد

بحث

کوهی نشان داد که این اسانس‌ها از رشد برخی قارچ‌های خاکزی در شرایط آزمایشگاه جلوگیری می‌کنند. نتایج این تحقیق همچنین حاکی از این است که از بین سه اسانس استفاده شده در شرایط آزمایشگاه و انبار، عملکرد اسانس مرزه خوزستانی از سایر اسانس‌ها بهتر بود. همچنین در بررسی‌های به عمل آمده مشخص شد که ترکیب اصلی اسانس آویشن دناپی: تیمول ۶۴/۸ درصد، آلفاترپینن ۱۱/۳ درصد و پی‌سیمن ۷/۹ درصد، مرزه خوزستانی: کارواکرول ۵۷/۴ درصد، پی‌سیمن ۱۸/۵ درصد و گاما ترپینن ۱۱ درصد و نعنای فلفلی: منتانول ۳۶/۲ درصد و منتون ۳۲/۴ درصد می‌باشد. این تحقیقات نشان داد تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی به اجزاء تشکیل دهنده آن‌ها بستگی دارد بطوریکه یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت تشدیدکنندگی با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضد قارچی اسانس را باعث شود تا در غلظت معینی تأثیر قابل قبولی داشته باشد و از طرفی دیگر نوع اسانس و غلظت‌های مختلف آن در میزان بازدارندگی از رشد میسلیمی قارچ و خاصیت قارچ‌کشی آن نقش کلیدی دارا می‌باشد. پیشنهاد می‌شود کارایی محصولات بیولوژیک به جای بررسی در دامنه دمایی محدود و کنترل شده در دامنه دمایی وسیع‌تری مورد بررسی 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 و افزایش صادرات محصولات کشاورزی باشد.

قابلیت تجزیه‌پذیری اسانس‌های گیاهی در طبیعت و سمیت پایین آن‌ها برای انسان و سایر پستانداران و اثرات مخرب کمتر آن‌ها در محیط زیست، این ترکیبات را به جایگزین و یا مکمل سموم شیمیایی جهت حفاظت محصولات کشاورزی و انباری تبدیل کرده است (ماسون و همکاران، ۲۰۰۶). اسانس‌های گیاهی با داشتن ریز مغذی‌ها در افزایش رشد گیاه نیز مفید بوده و برای انسان و محیط زیست بی‌خطرند. تأثیر اسانس‌های آویشن و زنیان را در کنترل رشد قارچ *Aspergillus parasiticus* روی گلابی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصله نشان داد که مشتقات آویشن دارای اثر قارچ‌کشی شدید بوده و می‌تواند به عنوان یک قارچ‌کش طبیعی علیه قارچ *A. parasiticus* مورد استفاده قرار گیرد. همچنین تحقیقات آراس و اسای (۲۰۰۱) نشان داده است که اسانس ترخون به علت دارا بودن ترکیب متیل اوژنول از رشد قارچ *Botrytis cinerea* جلوگیری می‌نماید. خاصیت ضد قارچی برخی گیاهان دارویی از جمله رزماری، مریم‌گلی، میخک، آویشن، مرزه، زیره و نعنای در تحقیقات متعددی گزارش شده است (فرزانه و همکاران ۲۰۰۶ و بهنام و همکاران ۲۰۰۶). بنابر تحقیقات چارلز و همکاران (۲۰۱۲) نیز مشاهده می‌شود که اسانس‌های گیاهان آویشن، مرزه، آلوورا و درخت چریش دارای توانایی بازدارندگی از رشد میسلیمی و تولید اسپور توسط قارچ‌های بیمارگر *Rhizopus stolonifer* و *P. expansum*، *A. flavus* و *A. niger* می‌باشد. تحقیقات فرزانه و همکاران (۲۰۰۶) و همچنین هادیان و همکاران (۲۰۰۷) بر روی اسانس‌های گیاهان درمنه شرقی، درمنه دشتی، درمنه خراسانی و درمنه

منابع

- Arras G and Usai M, 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: Chemical analysis of *Thymus capitatus* oil and its effect in sub-atmospheric pressure conditions. *Journal of Food Protection* 64(7):1025-1029.
- Behnam S, Farzaneh M, Ahmadzadeh M and Tehrani AS, 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.
- Carson CF, Hammer KA and Riley TV, 2006. *Melaleuca lternifolia* (Tea Tree) oil: Review antimicrobial and other medicinal properties. *Journal of Microbiology* 19: 50-62.
- Charles A, Onyeani SO, Osunlaja OO and Oworu AO, 2012. Evaluation of effect of aqueous plant extract in the control of storage fungi. *International Journal of Sciences & Technology* (6): 72-82.
- Eckert JW and Ogawa JM, 1988. The chemical control of postharvest diseases: Deciduous fruits, berries, vegetables and root/tuber crops. *Annual Review of Phytopathology* 26:433-69.
- Farzaneh M, Ahmadzadeh M, Hadian J and 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.
- Etebarian HR, Sholberg PI, Eastwell KC and Saylor RJ, 2005. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Microbiology* 51: 591-598.
- Hadian J, Farzaneh M, Ghorbani M and Mirjalili MH, 2007. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Artemisia khorasanica* on soil-born phytopathogens. *Journal of Essential Oil Research* 10: 3-58.
- Mason TG, Wilking JN, Meleson K, Chang C B and Graves S. 2006. Nanoemulsions: formation, structure and physical properties, *J. Physics: condensed matter*, 18: 35-66.

Study on three essential oils from *Mentha piperita*, *Thymus daenensis* and *Satureja khuzistanica* for controlling *Penicillium expansum* against of Apple Blue Mould

N Safari^{1*}, R Hemmati², M Farzane³ and S Chegini⁴

¹ Graduate Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

² Assistant Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Zanjan

³ Assistant Professor, Medicinal Plants and Drugs Research Institute, University of Shahid Beheshti

⁴ Graduate Student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Tehran

* Corresponding author: nassim.safari@gmail.com

Received: 11 Sep 2013

Accepted: 9 Jul 2014

ABSTRACT

Fungi that cause decay on postharvest products produce extracellular hydrolases and cause damage on extent range of products. Some of the secondary metabolites in medicinal herbs are useful against fungi which may provide potential alternative for chemical compounds. In the present study, antifungal activity of some essential oils that extracted from *Thymus daenensis*, *Mentha piperita* and *Satureja khuzestanica*, on prevention of fungal growth, *Penicillium expansum* decays on blue mold apple, was investigated. For this purpose, mixing method with PDA medium and applying the essential oil mixture in a final concentration of 600 microliters per liter was used in-vitro. The effect of storage conditions on apple fruit was assessed. Results showed that all three essential oils have a significant impact in preventing fungal growth, so that the essential oils of *Thymus*, *Satureja* and *Mentha*, respectively, at concentrations of 600, 300 and 600 microliters per liter showed prevention of fungal growth. On the other hand in some cases, consolidated application of the oils increased its antifungal properties. Generally with increasing concentrations of essential oils, activity of antifungal increased. *Satureja khuzestanica* essential oil had the best control and respectively *Thymus daenensis*, *Mentha piperita*, were next in the rankings.

Key words: Blue mold of apple, Plant essential oil, Post harvest storage.