بررسی اثر ضدقارچی اسانس چهار گیاه دارویی، آنالیز و شناسایی ملکولی باکتری آنتاگونیست علیه قارچ عامل پوسیدگی بعد از برداشت پرتقال *Penicillium digitatum*

شروین‌هادیان[۱]، نادر حسن‌زاده[۲]*، محمدعلی آقاجانی[۳]، حمیدرضاپردلی[٤]، گابریلا سیرولری[٥]

[۱]دانشجوی دکتری، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذائی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۲]دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم کشاورزی و صنایع غذائی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

[۳]دانشیار، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، گرگان، ایران

[٤]استادیار،گروه میکروبیولوژی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی ، ایران

[٥]استاد، گروه علوم و فنون گیاه شناسی، بخش بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه کاتانیا، ایتالیا

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۹/۱۱

چکیده

کپک سبز مرکبات *Penicillium digitatum* ازمهم‌ترین بیماری‌های بعد از برداشت می‌باشد. به کارگیری مداوم سموم شیمیایی تاثیر ماندگار روی سلامتی انسان و آلودگی محیط زیست دارد و سبب بروز مقاومت در سویه‌های بیماری‌زا می‌گردد. در این تحقیق فعالیت ضدقارچی غلظت‌های مختلف (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ٤۰۰ پی‌پی‌ام) اسانس چهار گیاه دارویی آویشن شیرازی (*Thymus vulgaris*)، آلوورا (*Aloe vera*)، سیر (*Allium sativum*) و زیره سبز (*Cuminum cyminum*) جمع‌آوری شده از منطقه قرق استان گلستان مورد بررسی قرار گرفت. اسانس‌ها با استفاده از روش تقطیر؛ بخار آب و با استفاده از دستگاه کلونجر تهیه و سپس مهمترین مواد موثره اسانسی که بیشترین عملکرد آنتاگونیستی را داشتند توسط دستگاه GC/MS آنالیز گردید. همچنین فعالیت آنتاگونیستی باکتری‌های جداسازی شده از اپی‌فیت پرتقال شامل *Bacillus* sp.، *Pseudomonas* sp.، *Streptomycess* sp. علیه قارچ پنی سیلیوم در قالب طرح فاکتوریل مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین درصد ممانعت کنندگی (۹۹/۹۵ درصد)، توسط اسانس آویشن علیه پنی سیلیوم در غلظت ٤۰۰ پی‌پی‌ام مشاهده گردید. آنالیز رگرسیونی تاثیر اسانس‌ها نشان داد با افزایش غلظت اسانس درصد بازدارندگی آن روی قارچ افزایش می‌یابد. بر اساس نتایج به دست آمده، اسانس آویشن با داشتن مهمترین ترکیبات موثره در اسانس‌ها (کارواکرول – ٤۵/۵ درصد)، آلفا- ترپینئول (-۲۲/۹ درصد) و اندو- بورنئول (۱٤/۳ درصد) بیشترین فعالیت ممانعت کنندگی (۲۲/۳ میلی‌متر) را علیه پنی سیلیوم از خود نشان داد. در بین ۲۳ جدایه باکتریایی، یک جدایه به نام H7 بیشترین فعالیت ممانعت کنندگی را علیه قارچ داشت. با استفاده از PCR و تعیین توالی DNA ژنوم 16S rRNA، H7 به‌عنوان *Bacillus cereus* شناسایی گردید. بنابراین اسانس آویشن و جدایه (H7) *Bacillus cereus* جایگزین‌های مناسبی برای کنترل شیمیایی پوسیدگی بعد از برداشت پرتقال می باشند.

واژه‌های کلیدی: آوریشن، اسانس، باکتری‌های آنتاگونیست، کارواکرول، کپک سبز مرکبات، *Bacillus cereuse*، *Penicillium digitatum*

*نویسنده مسئول: hasanzadehr@yahoo.com

مقدمه

مرکبات گروهی از میوه‌های نیمه گرمسیری جهان بوده که دارای ارزش اقتصادی بسیار زیادی در کشورهایی مانند برزیل، آمریکا و چین می‌باشند. امروزه در دنیا مجموع فعالیت‌های کشاورزی و اقتصادی و صنعتی این گروه تحت عنوان صنعت مرکبات شناخته می‌شود (Bousbia et al., 2009). از مهم‌ترین بیماری بعد برداشت مرکبات کپک‌های سبز و آبی مرکبات می‌باشد که به‌ترتیب توسط قارچ‌های *Penicillium digitatum* و *P.italicum* ایجاد می‌گردند (Valero and Serrano, 2010).

کپک سبز مرکبات که به‌وسیله *P.digitatum* ایجاد می‌گردد سبب بیش از ۹۰ درصد خسارت در طول مراحل انبارداری و حمل‌ونقل در مرکبات می‌شود .میزان خسارت بیماری کپک سبز در شمال کشور ۱۰ تا ۱۵ درصد و در جنوب ۲ تا ۵ درصد گزارش شده است (Zamani et al., 2009). معمولا جهت کنترل کپک سبز مرکبات از سموم شیمیایی متداول ایمازالیل، تیابندازول و ترکیبات گوگردی آلی و معدنی و مواد اکسیدکننده استفاده می‌گردد (Swamy and Sinniah, 2015).

به‌کارگیری روش‌های متفاوت برای مقاوم نگه‌داشتن میوه‌ها در مقابل پوسیدگی‌های بعد از برداشت مانند استفاده از هورمون‌ها، هوای سرد اگرچه تا حدی این پوسیدگی‌ها را کنترل می‌کنند ولی به‌صورت کامل مانع ایجاد پوسیدگی نمی‌شوند. بنابراین نیاز به کاربرد سموم شیمیایی جهت کنترل بهتر آلودگی قارچ همچنان وجود دارد و متاسفانه تکرار در استفاده از سموم شیمیایی سبب ایجاد مقاومت به گونه‌های *P. digitatum* و *P. italicum* می‌گردد (Kinay et al., 2007). تاکنون تلاش‌های ابتدایی مختلفی برای کنترل بیماری‌ها بعد از برداشت انجام شده است که عبارتند از: شامل استفاده از *Bacillus subtilis* و *Pseudomonas cepacia* بوده است همه این آنتاگونیست‌ها می‌توانند محل زخم‌ها را کلونیزه کنند و مواد آنتی بیوتیک ترشح می‌کند نموده که و از گسترش پوسیدگی جلوگیری نمایند (Sharma et al., 2009).

تعدادی از محققان تأثیر مثبت باکتری *Pseudomonas syringae* در کنترل بیماری پوسیدگی بعد از برداشت مرکبات با تولید دو نوع فیتوتوکسین و همچنین تاثیر این دو فیتوتوکسین بر روی غشای سلول میزبان را گزارش نمودند. همچنین و توسط PCR ژن موثر در کنترل را ردیابی نمودند (Cirvilleri et al., 2005).

در سال‌های اخیر تحقیقات گسترده‌ای آغازگردیده که نشان می‌دهد متابولیت‌های ثانویه برخی گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد قارچ‌ها مؤثر بوده و جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی هستند. تحقیقات نشان داده است که گیاهان معطر متعلق به تیره‌های نعناعیان، کاسنی و چتریان از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی برخوردار هستند. تعدادی از محققان تاثیر اسانس گیاهان دارویی آویشن (*Thymus vulgaris*)، آلوئه ورا (*Aloe vera*) و درخت چریش (*Azadirichta indica*) توانایی بازدارندگی از رشد میسلیومی و تولید اسپور توسط قارچ‌های بیمارگر *Aspergilius niger*، *P. expansum* و *Rhizopus stolonifer*، اسانس گیاهان دارویی آویشن، مرزه، آلوئه ورا و درخت چریش را گزارش نمودند (Charles et al., 2012).

تاثیر ضد قارچی گیاه سیر بر روی گونه‌های مختلف قارچ پنی سیلیوم گزارش گردیده است و در تحقیقات آزمایشگاهی تاثیر ممانعت رشدی آن بر روی قارچ پنی سیلیوم گزارش گردیده است (Bandalan and Lauzon, 2018). پذیرا در سال ۱۳۹۶ فعالیت ضدقارچی اسانس آویشن باغی

(*Thymus vulgairis*) بر روی قارچ‌های ساپروفیت *Aspergillus niger*، *A. fumigatus* و *A. flavus* گزارش نمود (Pazira, 2017).

تاثیر ضدقارچی مریم گلی *Salvia officinalis* و آوشن شیرازی *Thymus vulgaris* بر علیه فوزاریوم گندم *Fusarium graminearum* توسط تعدادی از محققان گزارش گردید (Alexa et al., 2018).

به‌دلیل حساسیت‌هایی که در استفاده از ترکیبات شیمیایی مصنوعی وجود دارد (به خاطر تهدید سلامتی انسان و محیط‌زیست) و همچنین افزایش تقاضای محصولات ارگانیک (تولیدشده بدون استفاده از نهاده‌های شیمیایی) و نیز به دلیل ایجاد نژادهای جدید و مقاوم پاتوژن در برابر قارچ‌کش‌های مورداستفاده، امروزه تلاش می‌شود تا از برخی مواد و فرآورده‌های طبیعی و فاقد اثرات جانبی زیان‌آور نظیر مانند اسانس‌های گیاهی و آنتاگونیست‌های موجود در طبیعت به‌عنوان جایگزین قارچ‌کش‌های شیمیایی در کنترل و یا کاهش بیماری‌ها و ضایعات انباری محصولات باغی استفاده گردد. هدف از این تحقیق بررسی تاثیر اسانس‌های چهار گیاه دارویی آویشن شیرازی (*Thymus vulgaris*)، آلوورا (*Aloe vera*)، سیر (*Allium sativum*) و زیره سبز (*Cuminum cyminum*) جمع‌آوری شده از منطقه قرق استان گلستان و باکتری‌های آنتاگونیست جداسازی شده از اپی فیت پرتقال بر روی ایجاد ممانعت رشدی در عامل بیماری کپک سبز پرتقال *P.digitatum* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری، و جداسازی و خالص‌سازی قارچ عامل کپک سبز مرکبات: میوه‌های پرتقال رقم تامسون ناول که علائم کپک سبز مرکبات را به‌وضوح نشان می‌دادند از چند میوه فروشی محلی جمع‌آوری شد و قطعات حاوی بافت سالم و آلوده از محل لکه‌ها نرم و لهیده شده میوه که حاوی میسلیوم‌های سفیدرنگ واسپورهای به رنگ سبز زیتونی قارچ عامل بیماری بود جداسازی و سپس خالص سازی شد و به روش نوک هیف و تک اسپور روی محیط کشت PDA کشت صورت گرفت (Timmer et al., 2000). با مقایسه استفاده از کلید شناسایی و مقایسه با استاندارد، قارچ *Penicillium digitatum* شناسایی و جداسازی گردید و ایزوله لازم از آن تهیه و بر روی محیط کشت PDA (Potato Dextrose Agar) کشت و نگهداری گردید.

تهیه سوسپانسیون قارچ: به پلیت ظرف حاوی محیط کشت ۷ الی ۹ روز قارچ، آب مقطر استریل به همراه یک قطره روغن توین ۲۰ اضافه شد و سپس با استفاده از لام گلبول شمار سوسپانسیون اسپور قارچ *Penicillium digitatum* با تعداد 10^4 اسپورتهیه گردید. برای مایه‌زنی مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از سوسپانسیون در داخل هر زخم ایجاد شده بر روی پوست پرتقال‌ها تزریق گردید (Timmer et al., 2000).

تهیه اسانس گیاهان دارویی: چهار گیاه دارویی آویشن شیرازی (*Thymus vulgaris*)، آلوورا (*Aloe vera*)، زیره سبز (*Cuminum cyminum*) و سیر (*Allium sativum*) از منطقه قرق استان گلستان تهیه گردید و در هرباریوم دانشگاه آزاد اسلامی مورد تایید قرار گرفتند. برگ گیاهان دارویی آویشن، و میوه زیره سبز و حبه سیر توسط دستگاه خردکن هرکدام را کامل خرد شدند نموده و از گیاه آلوورا ژل داخل برگ‌ها استخراج شد و سپس در داخل شیشه‌های تیره‌رنگ در داخل یخچال نگهداری شد.

اسانس آن‌ها با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب تهیه گردید، بدین‌منظور ۱۰۰ گرم از ماده بافت خشک خرد شده گیاهی را داخل ارلن ریخته و دوسوم آن را آب مقطر استریل ریخته و به

مدت سه ساعت عصاره گیری انجام شد و سپس دستگاه خاموش و اسانس در محل مدرج دستگاه جمع‌آوری شد ازآنجایی‌که اسانس سبک تراز آب است بنابراین روی آب قرار می‌گیرد سپس شیر خروج آب را بازنموده ابتدا آب و در ادامه مقداری اسانس با آب خارج شد راندمان اسانس‌گیری ۰/٦ درصد وزن گیاه بود (Bakkali et al., 2008).

تأثیر اسانس‌ها بر روی رشد عامل بیماری کپک سبز مرکبات: برای این منظور از روش اختلاط اسانس با محیط کشت PDA استفاده گردید و غلظت‌های ppm100، 200، 300، 400 اسانس در لیتر محیط کشت تهیه اضافه گردید و دیسک‌هایی از قارچ به قطر ۵ میلی متردر وسط محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های متفاوت قرداده شد و پتری‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری گردید شدند و پس از ٢٤ ساعت، رشد رویشی‌هاله قارچ به‌طور روزانه اندازه‌گیری شد تا هنگامی که پتری شاهد توسط قارچ پنی سیلیوم به صورت کامل اشغال شود. این آزمایش با چهار بار تکرار انجام شد. محیط کشت حاوی محلول توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد و درصد بازدارندگی رشد از فرمول زیر محاسبه شد (Udo et al., 2001).

۱۰۰ × ۱۰۰ قطر کلنی شاهد / (قطر کلنی تیمارها- قطر کلنی شاهد): درصد بازدارندگی رشد

تجزیه اسانس با دستگاه (GC/MS) برای شناسایی ترکیبات مؤثرترین ترکیبات اسانس در بازدارندگی از رشد قارچ: از دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف نگار جرمی (GC/MS) برای بررسی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس گیاهی دارای بیشترین ممانعت رشدی استفاده شد.اسانس موردنظر به دستگاه تزریق و اجزای تشکیل دهنده اسانس تعیین گردید. طیف‌سنجی جرمی دستگاهی است که مولکول‌های گازی باردار را بر اساس جرم آن‌ها دسته‌بندی می‌کند و برحسب جرم آن‌ها را از یکدیگر جداسازی و ضمن شناسایی مقدار آن‌ها را در محلول اندازه‌گیری می‌کند. دستگاه گروماتوگراف گازی متصل به طیف‌سنج جرمی از نوع VARIAN مدل GC:CP-3800 با طیف‌سنج جرمی Saturn 2200 است.

جداسازی باکتری‌ها از پوست پرتقال: از پرتقال‌های تامسون ناول تهیه‌شده سالم که فاقد هرگونه زخم و عارضه بیولوژیک بوده و قبل از هرگونه اعمال شیمیایی به تعداد ٤ عدد به‌صورت تصادفی انتخاب نموده و سپس پوست پرتقال را به قطعات کوچک، یک تا دو سانتی‌متری برش داده شد. مقدار ۲۵ گرم از آن‌ها را در یک فلاسک نیم لیتری حاوی ۲۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و ۵۰ میکرولیتر توئین ۲۰ به‌مدت یک ساعت در شیکر دورانی قرار داده شد. سوسپانسیون‌های حاصله بر روی محیط کشت NA (Nutrient Agar) به‌صورت سفره‌ای کشت گردید و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری گردید. پس از ٢٤ و ٤٨ ساعت کلنی‌های میکروارگانیسم‌های رشد کرده روی محیط کشت مذکور بر اساس مرفولوژی و رنگ جداسازی شده و در محیط کشت جدید تجدید کشت شدند. خالص سازی ایزوله‌های باکتریایی رشد نموده در محیط کشت از روش مخطط صورت گرفت (Brenner-Don et al., 2005). سپس ایزوله‌های جداسازی شده را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار داده و ایزوله‌های دارای پتانسیل آنتاگونیستی، را پس از مشاهده‌هاله ممانعت رشدی قارچ پاتوژن شناسایی و جداسازی و شناسایی گردید.

شناسایی جدایه‌های باکتری: در مواردی که جدایه‌ها دارای حالت آنتاگونیستی نسبت به عامل کپک سبز مرکبات *Penicillium digitatum* بودند پس از ٤٨ تا ٧٢ ساعت اطراف آن‌ها یک‌هاله شفاف که نشانه عدم رشد پاتوژن است دیده شد. به‌این‌ترتیب جدایه‌های

آنتاگونیست از بقیه مجزا شدند. با استفاده از آزمون‌های میکروسکوپی، میکروسکوپی، واکنش گرم، و بررسی تحرک و آزمون‌های بیوشیمیایی شامل کاتالاز، ایندول، H2S، مصرف سیترات، هیدرولیز نشاسته، هیدرولیز، کازئین و ذوب ژلاتین و نیز اکسیداسیون و تخمیر قند (O/F) جهت تشخصی گونه باکتری آنتاگونیست انجام گرفت. در نهایت، مؤثرترین باکتری در ایجاد ممانعت رشدی با روش مولکولی و از طریق تکثیر قطعه ژنی SrRNA ١٦ و تعیین توالی آن‌ها شناسایی دقیق شدند (John et al., 1997)

استخراج DNA و تکثیر قطعه ژنی SrRNA ١٦با استفاده از PCR: استخراج DNA ژنومی ایزوله‌های موثر با استفاده از کیت، Extraction kit Cat.No.DN8115C شرکت سیناژن ایران انجام شد. در پایان ٦٠ میکرولیتر از محلول رویی حاوی DNA بدست آمده در فریزر ٢٠- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد تا برای انجام PCR مورد استفاده قرار گیرد. پرایمرهای مورد استفاده در انجام آزمایش برای شناسایی مولکولی موثرترین باکتری با خاصیت آنتاگونیستی از پرایمرهای یونیورسال:

Forward (27F) با توالی:

'5-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3 و

Reverse (1390R) با توالی:

'5-GACGGGCGGTGTGTACAA-3 استفاده گردید.

واکنش PCR با حجم نهایی ٢٥ میکرولیتر شامل: (٢/٥ میکرولیتر بافر 10X و ٥٠ میلی‌مول MgCl2، ٠/٥ میکرولیتر dNTPs، ٠/٣ میکرولیتر از Taq DNA Polymerase، یک میکرولیتر از هر آغازگر، دو میکرولیتر از نمونه DNA و ١٦/٧ میکرولیتر آب مقطر دی یونیزه) انجام گرفت. واکنش PCR با شرایط دمایی واسرشت شدن ابتدایی در دمای ٩٥ درجه سلیسیوس به مدت ٥ دقیقه و در ادامه ٣٠ چرخه شامل واسرشت در دمای ٩٥ درجه سیلیسیوس به مدت ٣٠ ثانیه، اتصال در دمای ٩٥ درجه سیلسیوس به‌مدت ٣٠ ثانیه، اتصال در دمای ٥٦ درجه سیلیسیوس به‌مدت ٣٠ ثانیه، طویل شدن در دمای ٧٢ درجه سیلسیوس به‌مدت ٩٠ ثانیه و طویل شدن نهایی در دمای ٧٢ درجه سیلیسیوس به‌مدت ١٠ دقیقه انجام شد. محصول PCR با استفاده از الکتروفورز در ژل آگاروز ٠/٨ درصد بررسی گردید. به‌منظور تایید شناسایی باکتری‌ها، توالی‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار بلاست با سایر توالی‌های نوکلئوتیدی نظیر از قبل موجود در بانک اطلاعات ژنی تطبیق داده شدند (Joo et al., 2007).

بررسی تأثیر باکتری بر روی عامل بیماری کپک سبز مرکبات در شرایط آزمایشگاه: از روش کشت متقابل استفاده گردید.سوسپانسیون (10^9 CFU/ ml^{-1}) ایزوله باکتریایی به‌صورت یک خط مستقیم در یک سمت پلیت ظرف حاوی PDA کشت داده شد و ٢٤ ساعت در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس یک دیسک دایره‌ای به قطر ٥ میلی‌متر از کلنی قارچ انتخاب و در فاصله ٥ میلی‌متری از خط کشت باکتری قرار داده شد. پلیت ظرف‌ها در دمای ٢٥ درجه سانتی‌گراد انکوبه و کاهش رشد میسیلیومی قارچ پنی سیلیوم در مقایسه با نمونه کنترل محاسبه گردید.

آنالیز داده‌ها

در این بررسی نتایج به‌دست آمده در قالب طرح فاکتوریل و با استفاده از نرم‌افزار SAS و Status Graphics از روش آماری General linear models استفاده شد صورت پذیرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون LSD در رگرسیون ساده مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

کلنی‌های ایزوله قارچ *Penicillium digitatum* سفید مایل به سبز تیره رنگ بوده کنیدیفورها به‌صورت پایه‌هایی کشیده، ساده تا منشعب و شفاف می باشند و روی انشعابات کنیدیفور لایه ای از فیالید قرار دارد. کنیدیوم‌ها کم‌وبیش بیضوی تا استوانه‌ای شکل، تک‌سلولی و شفاف بودند.

نتایج در محیط کشت PDA بعد از هفت روز در شرایط آزمایشگاه بیانگر آن بود که بین تاثیر کلیه اسانس‌های گیاهان مورد استفاده در ایجاد درصد بازدارندگی در قارچ عامل کپک سبز *P.digitatum* در سطح ۰/۰۱ اختلاف معنی‌داری وجود داشته است. جدول آنالیز واریانس تأثیر اسانس‌ها در ایجاد درصد ممانعت رشدی بیانگر آن است که تیمارها در سطح (P=0.01) دارای اختلاف معنی داری می‌باشند (جدول ۱). اسانس گیاه دارویی آویشن شیراز *Thymus vulgaris* بیشترین تأثیر ممانعت رشدی را بر روی قارچ پنی سیلیوم ایجاد نمود و با افزایش غلظت اسانس‌ها در محیط کشت درصد ایجاد ممانعت رشدی آن‌ها افزایش یافت. بین غلظت‌های متفاوت آویشن شیراز در ایجاد ممانعت رشدی از قارچ پنی سیلیوم در سطح ۰/۰۵ اختلاف معنی‌داری وجود داشت و اسانس آویشن در دو غلظت ۳۰۰ و ٤۰۰ پی‌پی‌ام قادر بود به‌ترتیب ۹۸/۵ و ۹۹/۹ درصد ممانعت رشدی ایجاد نماید. در غلظت ٤۰۰ پی‌پی‌ام بین اسانس آویشن و آلوورا اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و زیره سبز کمترین درصد بازدارندگی رشد را نشان داد در حالی که در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ پی‌پی‌ام بین آویشن و آلوورا در درصد بازدارندگی از رشد قارچ *P. digitatum* اختلاف معنی‌داری وجود داشت و تاثیر اسانس آویشن از آلوورا بیشتر بود. به عبارتی بین نوع اسانس و دوز مصرفی آن اثر متقابل معنی دار وجود داشت و با توجه به اینکه ازنظر درصد بازدارندگی غلظت‌های متفاوت روند افزایشی داشتند برای بررسی دقیق این روند، رگراسیون انجام داده شد.

بررسی رگرسیونی رابطه بین غلظت و درصد بازدارندگی اسانس گیاهان، روند افزایش درصد بازدارندگی قارچ *P. digitatum* نشان داد با افزایش غلظت اسانس‌های گیاهان آویشن، آلوورا، سیر و زیره سبز در نمودارهای ۱ و۲ قابل مشاهده می باشد و اسانس حاصل از سه گیاه آلوورا، سیر و زیره سبز روند افزایش خطی داشتند در حالی که روند افزایشی گیاه دارویی آویشن به‌صورت منحنی بود به عبارتی در بررسی تاثیر گیاه دارویی آویشن تا غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام افزایش درصد بازدارندگی با شیب تندی با افزایش غلظت اسانس افزایش یافت و بعد از غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام شیب افزایش با سرعت کمتری صورت پذیرفت. در نمودا رگرسیون مشخص گردید که اسانس‌های آلوورا و سیر شیب افزایشی یکسانی داشته و با سرعت یکسانی با افزایش غلظت اسانس درصد بازدارندگی افزایش یافتند در حالی که اسانس زیره شیب تغییرات بیشتری داشته است و به ازای افزایش هر واحد غلظت اسانس تغییرات زیادی در درصد بازدارندگی رشد قارچ پنی سیلیوم ایجاد گردید.

طی آزمایشات صورت گرفته مشخص گردید اسانس آویشن شیرازی، موثرترین اسانس در ایجاد ممانعت رشدی قارچ پنی سیلیوم می‌باشد و پس از آب‌گیری توسط دستگاه GC/MS آنالیز گردید (جدول ۲). حدود ۱۷ ترکیب متفاوت شناسایی و جداسازی شد که بیشترین درصد مربوط به کارواکرول ٤۵/۵ درصد بود. پس‌ازآن به‌ترتیب و آلفا ترپینئول ۲۲/۹درصد و اندو بورنئول ۱٤/۳ درصد بیشترین درصد ترکیبات را داشتند. ترکیبات فوق از ترکیبات شناخته‌شده در اسانس گیاه دارویی آویشن با خاصیت ضد قارچی می‌باشند. در نمودار کروماتوگرام اسانس

آویشن مشخص گردید پیک اول ترکیب انـدوبورنئول (۱٤/۳درصد)، پیک دوم ترکیـب آلفـا ترپنئـول (۲۲/۹ درصد)، پیک سوم ترکیب کـارواکرول (٤٥/٥ درصـد) نشان داده شد (شکل ۳) در این تحقیق نشان داده شـد که این ترکیبات مؤثرترین ترکیبات برای کنترل بیماری کپک سبز مرکبات نیز می‌باشند.

حدود ۲۳ ایزوله باکتریایی از پوست پرتقـال جـدا گردید که از بین آن‌ها مهم‌ترین ایزوله‌هایی کـه دارای خاصیت آنتاگونیستی بودند مورد بررسی قرار گرفتنـد. ایزوله‌های مربوطه پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی شناسایی شدند و مشـخص شـد کـه مربـوط بـه سـه جـنس *Pseudomonas*، *Bacillus* و *Stereptomyces* می‌باشند. از ٥ ایزوله استرپتومایسـس ۳ ایزولـه (H6, H16, H10)، از ٦ ایزوله باسیلوس ٤ ایزوله (H2, H7, H11, H1) و از ٦ ایزوله سودوموناس ۳ ایزولـه (H3, H7, H8) واجد خاصیت آنتاگونیستی بودند.

بررسی ایزوله‌های دارای خاصیت آنتاگونیسـتی در شرایط آزمایشگاه بر روی قارچ پنی سیلیوم نشان دارد از بـــین ســـه ایزولـــه *Streptomyces*، ایزولـــه *Streptomyces* sp. H16 بیشـــترین خاصـــیت آنتاگونیسـتی را داشـته و نسـبت بـه دو ایزولـه دیگـر منطقه ممانعت رشدی بانـدازه ۲۲/۳ میلـی‌متـر ایجـاد نمـوده اسـت و ایـن ایزولـه جهـت مقایسـه بـا سـایر باکتری‌ها مدنظر قرار گرفت و از بـین ٤ ایزولـه دارای خاطیت آنتاگونیستی *Bacillus* ایزوله H7 بـا بیشـترین توان ممانعت رشدی، منطقه ممانعت رشدی به انـدازه ۲٤ میلـــی‌متـــر ایجـــاد نمـــود. از بـــین ٤ ایزولـــه *Pseudomonas* مـوثرترین ایزولـه H3 بانـدازه ۱۹/۳ میلی‌متـر منطقـه ممانعـت رشـدی بـود. مقایسـه بـین موثرترین ایزوله‌های سـه بـاکتری *Streptomyces* sp. H16 و *Pseudomonas* sp. H3 و *Bacillus* sp. H7 در ایجاد ممانعـت رشـدی روی قـارچ *P. digitatum* عامل کپـک سـبز مرکبـات از لحـاظ آمـاری اخـتلاف معنی‌داری را نشان داد (جدول ۳) و بیشترین ممانعت رشـدی توسـط *Bacillus* sp. H7 صـورت گرفـت و جهت شناسایی تحت آنالیز مولکولی قرار گرفت.

شناسایی دقیق ایزولـه *Bacillus* sp. H7 در سـطح جنس و گونه با ردیف سازی توالی‌های به‌دست آمـده با توالی‌های موجود در بانک ژنی NCBI انجـام شـد. بلاست تـوالی 16SRNA ایزولـه *Bacillus* sp. H7 بـا توالی‌های ثبت شده در بانک ژنی NCBI بیانگر میـزان ۹٦ درصد شباهت ایزوله منتخب بـا بـاکتری *Bacillus cereus* بود. توسـط PCR قطعـه DNA مـورد انتظـار به‌طول ۱٥۰۰ جفت بـاز بـرای تـوالی ژنتیکـی جدابـه مورد نظر تکثیر گردید (شکل ٤).

بحث

در این تحقیق مشخص گردید گیاه دارویی آویشن در غلظـت ٤۰۰ppm قـادر اسـت ۹٥/۹۹ درصـد در شرایط آزمایشگاه و ۱۰۰ درصد روی میوه بازدارندگی در رشد قارچ *P.digitatum* ایجاد نمایـد (جـدول ۱). گزارشات متعددی مبنی بر خاصیت ضدقارچی اسانس گیاهان دارویی متفـاوت و همچنـین گـزارش نمودنـد افزایش درصد بازدارندگی گیاهان دارویی بـا افـزایش غلظت اسانس افزایش می‌یابد (Ibetesam Badawy et al., 2011). نتایج پژوهش‌های پیشین نشـان داده بـود که عصاره و اسانس گیاه آویشن بـا حضـور ترکیبـات ثانویه تیمول و کارواکرول می‌تواند در غلظت یـک در هزار در کپک سبز مرکبات میزان ۱۰۰ درصد ممانعـت رشدی ایجاد نماید (Gholchinno et al., 2018). پـس مـی‌تـوان گفـت غلظـت نقـش مهمـی در خاصـیت بازدازندگی اسانس‌ها دارد.

اسانس گیاه آلوئه ورا بعد از آویشن بیشترین تأثیر را در کـاهش بیمـاری کپـک سـبز مرکبـات ناشـی از *Penicillium digitatum* داشته است ولی بـه صـورت کامل قادر به کنترل بیماری نمی‌باشد. تأثیر مثبت آلوئه

ورا در زمان استفاده به صورت واکس در کاهش بیماری کپک سبز مرکبات گزارش گردید و دلیل آن را نقش آلوئه ورا در ممانعت از دست دادن رطوبت میوه بیان نمونـد (Marpudi et al., 2011) با توجه به مقایسه نتایج می‌توان گفت کاربرد آلوئه‌ورا به‌صورت واکس تاثیر بیشتری دارد.

بررسی تأثیر اسانس سیر بر روی پوسیدگی بعد برداشت مرکبات ناشی از قارچ *Penicillium digitatum* نشان داد سیر دارای خاصیت ضد قارچی بوده و در کاهش این بیماری نقش دارد و سبب ایجاد ممانعت رشدی این قارچ در شرایط آزمایشگاه و محیط زنده می‌گردد. مقایسه اثر عصاره سیر بر روی کپک‌های آبی و سبز مرکبات نشان داده است که درصد ممانعت رشدی ایجادشده روی کپک آبی بسیار بیشتر است (Obagwu and Korsten, 2003) پس می‌توان گفت گونه قارچ در درصد بازدارندگی عصاره نقش دارد. خاصیت ضدقارچی اسانس گیاه دارویی سیر بر روی قارچ‌های متفاوتی گزارش گردیده است (Kutawa et al., 2018).

نتایج این تحقیق نشان داد که اسانس زیره کمترین تاثیر را در ایجاد ممانعت رشدی دارد همچنین نمودار رگرسیون نشان داد تغییر غلظت نقش بسیار مهمی در افزایش تاثیر این عصاره دارد (شکل ۱ و ۲). در تحقیقات گذشته مشخص شد غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر زیره ۱۰۰٪ ممانعت رشدی بر روی قارچ *Botrytis cinerea* توت فرنگی دارد اگر از روش paper disk استفاده شود. از مقایسه نتایج می توان گفت نوع میزبان قارچی و روش آزمایشگاهی مورد استفاده در تاثیر ضد قارچی عصاره نقش دارد.

در این تحقیق مشخص گردید بیشترین درصد مربوط به کارواکرول ٤٥/٥ درصد و پس‌ازآن به ترتیب و آلفاترپنئول ۲۲/۹درصد و اندوبورنئول ١٤/٣ درصد بیشترین درصد ترکیبات را داشتند (جدول ۲)، وجود درصد زیاد کارواکول و تیمول دراسانس آویشن سبب خاصیت ضد قارچی این اسانس بر علیه *Botrytis cinerea* می‌شود (Bourchra et al, 2003). با توجه به تاثیر مثبت این گیاه روی *P.digitatum* و وجود ترکیبات موثره مشابه پس می‌توان گفت خاصیت ضد قارچی اسانس آویشن مربوط به ترکیبات مذکور می‌باشد. اسانس آویشن به اسانس تم مشهور است و حاوی بیش از ٤٠ درصد ترکیبات فنلی (تیمول و کارواکرول) است که اثر ضدعفونی‌کننده قوی دارند. علاوه بر این کافئیک اسید و تانن موجود در این اسانس نقش مؤثری در کاهش رشد قارچ‌ها و باکتری‌ها دارد. مطابق آنالیزهای GC کارواکول موجود در آویشن نقش مؤثری در خاصیت ضدقارچی این گیاه دارد (Karimi et al., 2008). تعدادی از دانشمندان در کشور رومانی با مطالعه روی گونه‌های متفاوت آویشن *Thymus vulgaris*، *Thymus serpyllum*، *Thymus pulegioides* و *Thymus glabrescens* سه ترکیب تیمول و کرواکرول و ترپینئول را به عنوان ترکیبات اصلی تشکیل دهنده گونه‌های آویشن معرفی نمودند (Varga et al., 2015). مقایسه نتایج بیانگرآن است که ترکیب کرواکرول به‌عنوان مهم‌ترین ترکیب با بیشترین خاصیت ضدقارچی در اکثر گونه‌های آویشن وجود دارد و با توجه به منطقه کشت شده میزان آن متفاوت می‌باشد.

نتایج این تحقیق تایید نمود که می توان از خود میزبان (میوه پوست پرتقال) باکتری های آنتاگونیست مؤثر جداسازی کرد. سه باکتری *Bacillus*، *Pseudomonas* و *Streptomyces* آنتاگونیست منتخب این تحقیق بودند (جدول ۳). بیشترین ایزوله‌های آنتاگونیست جداسازی شده از جنس باسیلوس بودند. برای کنترل کپک سبز مرکبات ۹۲ ایزوله باسیلوس از پوست میوه های مرکبات از باغ های مختلف جنوب

آفریقا جداسازی گردید که از این تعداد ۱۰ ایزوله دارای خاصیت آنتاگونیستی بودند و سبب کاهش رشد چشمگیری در کپک سبز مرکبات *P. digitatum* شدند. در گذشته تاثیر مثبت *B.subtilis* را بر روی کپک سبز مرکبات *P. digitatum* موثر گزارش نمودند شده است (Abraham et al., 2010). از مقایسه نتایج می‌توان به تاثیر مثبت باکتری دو گونه باکتری باسیلوس به نام های *B.subtilis* و *B.cereuse* روی کپک سبز مرکبات اشاره نمود.

گزارشات متعددی از نقش موثر باکتری های گونه باسیلوس خصوصا گونه‌های *B. subtilis*, *B. cereus* و *B. amyloliquefaciens* وجود دارد که به‌صورت موفقیت آمیزی در کنترل آفات و بیماری به کارگیری شده است. باکتری گونه‌های جنس‌های باکتریایی باسیلوس قدرت بسیار زیادی در کنترل بیولوژیک دارند زیرا آنها قادر هستند حیات خود را تا مدت طولانی حفظ نمایند (Nagorska et al., 2007). با مقایسه با نتایج این تحقیق می‌توان از باکتری باسیلوس به عنوان جایگزین مناسب کنترل شیمیایی نام برد.

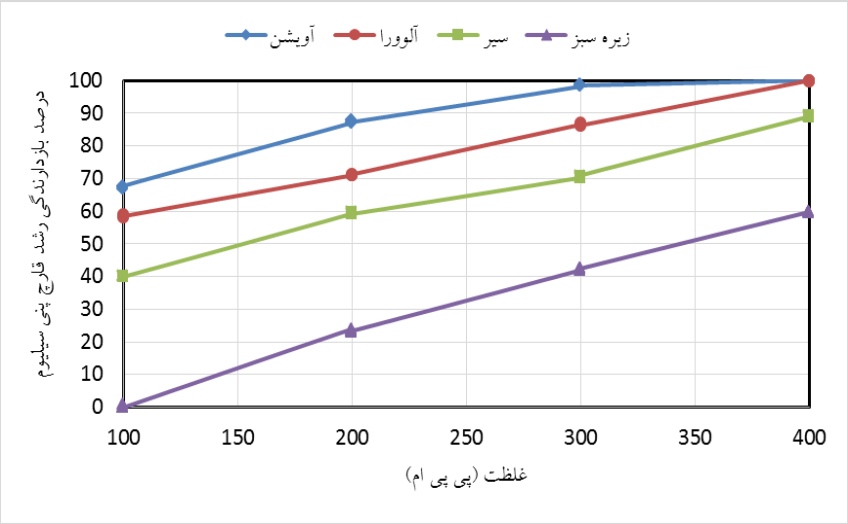
نتیجه‌گیری کلی

از میان چهار اسانس گیاهان دارویی، اسانس گیاه دارویی آویشن و در بین ۲۳ ایزوله باکتری جداسازی شده از پرتقال (H7) *Bacillus cereuse* بیشترین ممانعت رشدی روی قارچ پنی سیلیوم ایجاد نمودند در مقایسه تأثیر بین عصاره آویشن شیراز و باکتری باسیلوس، اسانس آویشن از تأثیر بیشتری برخوردار بود. اسانس گیاه آویشن علاوه بر اینکه از ماهیت طبیعی برخوردار بوده و فاقد هرگونه تأثیرات سوء زیست‌محیطی بر روی سلامتی انسان و محیط‌زیست می‌باشد و تهیه آن نسبت به سموم شیمیایی از نظر اقتصادی بسیار مقرون به‌صرفه بوده و قادر است به‌صورت معنی‌داری کپک سبز مرکبات ناشی از قارچ *Penicilluim digitatum* را کاهش داده و ماندگاری میوه را در شرایط انبارداری افزایش دهد. بنابراین می‌توان با مطالعات بیشتر از آنها به‌عنوان جایگزین مناسب سموم شیمیایی در کنترل بیماری بعد برداشت پرتقال استفاده نمود.

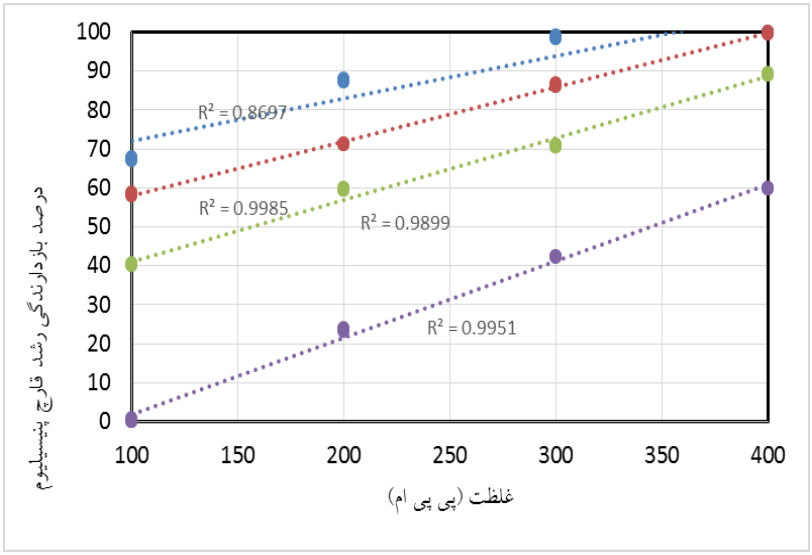
جدول ۱: تاثیر چهار گیاه دارویی آویشن شیرازی، زیره سبز،سیر، آلووررا در چهار غلظت (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ppm٤۰۰) بر روی درصد ممانعت رشدی قارچ پنی سیلیوم.

گروه‌ها	میانگین درصد بازدارندگی	غلظت (ppm)	اسانس
G	٦٧/٣٥٢٥	١٠٠	آویشن
D	٨٧/٥٥	٢٠٠	آویشن
B	٩٨/٥٥	٣٠٠	آویشن
A	٩٩/٩٥	٤٠٠	آویشن
I	٥٨/٤	١٠٠	آلوورا
F	٧١/١	٢٠٠	آلوورا
E	٨٦/٤٢٥	٣٠٠	آلوورا
A	٩٩/٨٢٥	٤٠٠	آلوورا
K	٤٠/١٧٥	١٠٠	سیر
H	٥٩/٥٧٥	٢٠٠	سیر
F	٧٠/٦٧٥	٣٠٠	سیر
C	٨٩/١٥	٤٠٠	سیر
M	٠/٢٥	١٠٠	زیره سبز
L	٢٣/٥٥	٢٠٠	زیره سبز
J	٤٢/٣٧٥	٣٠٠	زیره سبز
H	٥٩/٧٥	٤٠٠	زیره سبز
	٠/٦٣٣٤٣٦	LSD	

*داده‌های جدول بر اساس چهار تکرار بوده و وجود حروف نامشابه بیانگر اختلاف معناداری بین تیمارها است.



شکل ۱: نمودار بررسی روند افزایش درصد بازدارندگی قارچ کپک سبز با افزایش غلظت اسانس گیاهان دارویی با افزایش غلظت درصد بازدارندگی افزایش می‌یابد.



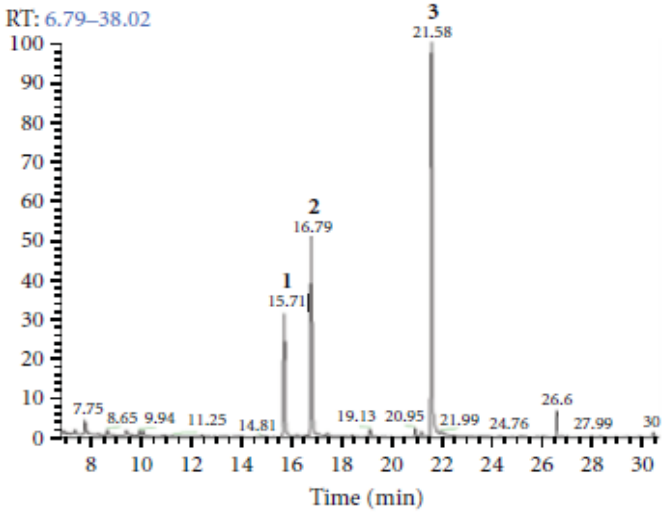
شکل ۲: نمودار رگرسیون رابطه بین غلظت و درصد بازدارندگی اسانس گیاهان دارویی

*به ازای افزایش هر واحد غلظت اسانس تغییرات زیادی در درصد بازدارندگی رشد قارچ پنی‌سیلیوم ایجاد می‌نماید.

جدول ۲: معرفی مهم‌ترین مواد موثره اسانس گیاه دارویی آویشن

ردیف	ترکیبات	زمان بازداری (RT)	درصد
۱	Solvent	٦/٨	-
۲	α-Pinene	۷/۸	۱/۹
۳	ρ-Cymen	۸/۷	۰/٦
٤	Limonene	۹/۹	۰/٦
٥	γ-Terpinene	۱۰/۱	۱/۱
٦	Linalool	۱۱/۳	۰/۲
۷	Camphor	۱٤/۸	۰/۱

۸	*endo*-Borneol	۱۵/۷	۱٤/۳
۹	4-Terpineol	۱٦/۲	۰/۷
۱۰	*α*-Terpineol	۱٦/۸	۲۲/۹
۱۱	Carvacrol methyl ether	۱۹/۱	۳/۱
۱۲	Thymol	۲۱/۰	۰/۹
۱۳	Carvacrol	۲۱/٦	٤٥/٥
۱٤	Geranyl acetate	۲٤/۸	۰/۳
۱٥	Caryophyllene	۲٦/٦	۳/۲
۱٦	Unknown	۳۰/۸	۰/۸
۱۷	Caryophyllene oxide	۳۳/۲	۲/۹
۱۸	Germacrene-D	۳٥/۳	۱/۸
۱۹	Unknown	۳۸/۰	۰/۱
مجموع			۹۹/۲

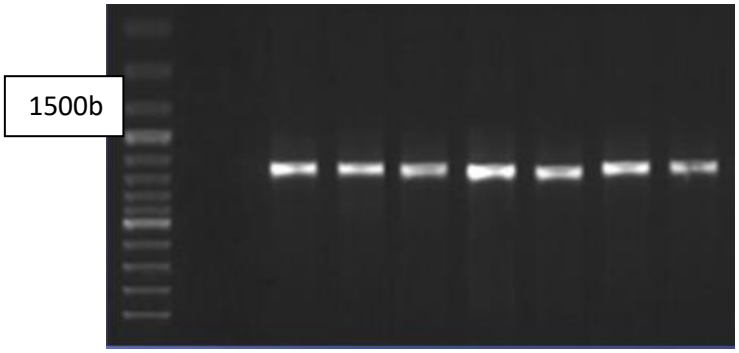


شکل۳: نمودار کروماتوگرام اسانس آویشن، پیک (۱): *endo*-Borneol (۱٤/۳٪)، پیک (۲): *α*-Terpineol (۲۲/۹)، پیک (۳): Carvacrol (٤٥/٥٪)

جدول ۳: بررسی تاثیر سه باکتری آنتاگونیست جداسازی شده از پرتقال بر روی ممانعت رشدی قارچ پنی‌سیلیوم

باکتری	میانگین هاله ممانعت رشدی (میلی‌متر)	گروه
Pseudomonas	۱۹/٦۷	c
Streptomyces	۲۲/۳۳	b
Bacillus	۲٤/۰۰	a

*داده‌های جدول بر اساس چهار تکرار بوده و وجود حروف نامشابه بیانگر اختلاف معناداری بین تیمارها است.



شکل ٤: الگوی قطعه DNA۱۵۰۰ حاصل از تکثیر PCR به اندازه ۱۵۰۰ جفت باز روی ژل آگارز ۰/۸٪، ایزوله ۱۵۰۰ جفت باند باز تشکیل داد.

References

1. Abraham, A., Laing, M. and Bower, J. 2010. Isolation and in vivo screening of yeast and *Bacillus* antagonists for the control of *Penicillium digitatum* of citrus fruit. Biological Control, 53: 32–38.
2. Alexa, E., Sumalan, R.M., Danciu, C., Obistioiu, D., Negrea, M., Poiana, M.A., Rus, C., Radulov, I., Pop G. and Dehelean C. 2018. Synergistic antifungal, allelopathic and antiproliferative potential of *Salvia officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. Essential oils. Molecules, 23(185):1-15.
3. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils-A review. Foodand Chemical Toxicology, 46: 446-475.
4. Bandalan, M.B. and Lauzon, R.D. 2018. Inhibitory effect of *Garlic* L. against bread mold and its influence on the quality of Yeast-Leavened Bread. Food Engineering, 4(4): 256-262.
5. Boubaker, H., Saadi, B., Boudyach, E.H. and Benaoumar, A.A. 2009. Sensitivity of *Penicillium digitatum* and *P. italicum* to Imazalil and Thiabendazole in Morocco. Plant Pathology, 8(4): 152-158.
6. Bouchra C., Achouri M., Idrissi Hassani L.M. and Hmamouchi M. 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven *Moroccan Labiatae* against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. Ethnopharmacology, 89: 165–169.
7. Brenner-Don, J., Krieg Noel, R. and Staley James, T. 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Springer US., pp. 1136.
8. Charles, A., Onyeani, S.O., Osunlaja, O.O. and Oworu, A.O. 2012. Evaluation of effect of aqueous plant extract in the control of storage fungi, Sciences & Technology, 1(6): 72-82.
9. Cirvilleri, G., Bonaccorsi, A., Scuderi, G. and Scortichini, M. 2005. Potential biological control activity and genetic diversity of Pseudomonas syringae pv. syringae strains. Phytopathology, 153: 654-666.
10. Gholchinno, S., Pouzeshimiyab, B. and Nematollahi, S. 2018. Antifungal effects of some herbal extracts on Penicillium mould of citrus in laboratory conditions. Agroecology, 14(2):1-7.
11. Ibtesam Badawy, F.M., Nashwa Sallam, M.A., Ibrahim, A.R. and Asran, M.R. 2011. Efficacy of some essential oils on controlling green mold of orange and their effects on postharvest quality parameters. Plant Pathology, 10: 168-174.
12. John, G.H., Noel, R.K., Peter, H., James, T.S. and Stanley, T.W. 1997. Bergey´s manual of determinative bacteriology, Moscow: Mir Publishers 2, 9th Ed., (In Russian).
13. Joo, M., Hur, S., Han, Y. and Kim, J. 2007. Isolation, identification and characterization of *Bacillus subtilis*

strains from the traditional korean soybean-fermentedfood, Chungkookjang. Applied Biology & Biotechnology, 50 (4): 202-210

14. Karimi, Z., Rahemi, M., Karimi Z. and Rahemi M. 2008. Comparison of essential oils of clove, thyme and imazalil fungicide on blue mold (*Penicillium italicum* Wehemer) of citrus fruits in storage. Journal of Water and Soil Science, 12(45): 231-237
15. Kinay, P., Mansour, M.F., Mlikota, F., Margosan, D.A. and Smilanick, J.L. 2007. Cha racterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. Crop Protection, 26: 647-656.
16. Kutawa, A.B., Danladi, M.D. and Haruna, A. 2018. Antifungal activity of garlic (*Allium sativum*) extract on some selected fungi. Medicinal Herbs and Ethnomedicine, 4:12-14.
17. Marpudi, S.L., Abirami, L.S.S., Pushkala, R. and Srividya, N. 2011. Enhancement of storage life and quality maintenance of papaya fruits using aloe vera based antimicrobial coating. Indian Journal of Biotechnology, 10: 83-89.
18. Nagorska, K., Bikowski, M. and Obuchowskji, M. 2007. Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. Acta Biochimica Polonica, 54: 495-508.
19. Obagwu, J. and Korsten, L. 2003. Integrated of citrus green and blue molds using *Bacillus subtilis* in combination with sodium bicarbonate or hot water. Postharvest Biology and Technology, 28: 187-194.
20. Pazira A. 2017. Antifungal Effect of *Thymus Vulgaris* Essence on the separated fungal from Koi Fish's Skin (Cyprinus Carpio Var. Koi), in vitro. Aquaculture development journal, 11 (2):13-22.
21. Sharma, R.R., Singh, D. and Singh, R. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. Biological Control, 50: 205-221.
22. Swamy, M.K. and Sinniah, U.R. 2015. A comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth. An Aromatic Medicinal Plant of Industrial Importance. Molecules, 20(5): 8521-8547.
23. Timmer, L.W., Garnsey, S.M. and Graham, J.H. 2000. Compendium of postharvest diseases, *American Phytopathological Society*, St. Paul Minnesota, pp.92.
24. Udo, S.E., Madunagu, B.E. and Isemin, C.D. 2001. Inhibition of growth and sporulation of fungal pathogens on sweet potato and yam by garlic extract, Nigeria Journal of Botany, 14: 35-39.
25. Valero, D. and Serrano, M. 2010. Postharvest biology and technology for preserving fruit quality, CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, USA, pp. 288.
26. Varga, E., Bardocz, A., Belák, A., Maráz, A., Boros, B., Felinger, A., Böszörményi, A. and Horváth, G. 2015. Antimicrobial activity and chemical composition of thyme essential oils and the polyphenolic content of different thymus extracts. Farmacia, 63(3): 357-361.
27. Zamani, M., Tehrani, A.S., Ahmadzadeh, M., Hosseininaveh, V. and Mostofy, Y. 2009. Control of *Penicillium digitatumon* orange fruit combing *Pantoea agglomerans* with hot sodium bicarbonate dipping. Plant Pathology, 91: 437-442.

Evaluation and comparison of the antifungal effect of essential oil of four medicinal plants and molecular identification antagonistic bacteria against fungi decay cause of orange post-harvest by *Penicillium digitatum*

Hadian, Sh.[1], Hasanzadeh, N.[2*], Aghajani, M.A.[3], Pordeli, H.R.[4], Cirvilleri, G.[5]

[1]Ph.D. Student., Dept. of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industrial, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[2]Associate professor, Dept. of Plant Protection, Faculty of Agricultural Sciences and Food Industrial, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[3]Associate Professor, Dept. of Plant Protection, Agricultural and Natural Resources Research Center of Golestan Province, Gorgan, Iran

[4]Assistant Professor, Dept. of Microbiology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran

[5]Professor, Dipartimento di Scienze e Tecnologie Fitosanitarie, Sez. Patologia Vegetale Università degli Studi di Catania, Catania, Italy

Received: 2019-12-15 ; Accepted: 2019-12-2

Abstract

Citrus green mold, *Penicillium digitatum* is one of the most important postharvest diseases. Continuous application of chemical pesticides has serious long term effects on human health and environmental pollution that may result in emergence of resistance in pathogenic strains. In this study, antifungal activity of different concentrations (100, 200, 300, 400ppm) of four medicine plants essences including *Thymus vulgaris*, *Cuminum cyminum*, *Allium sativum* and *Aloe vera* collected from Ghorogh area of Golestan provience was evaluated. Essences were prepared by the steam distillation water using Clevenger apparatus. The main constituents' essences having the most antagonistic activity were analyzed by GC / MS. Antagonistic activity of bacteria isolated from orange epithelium including *Bacillus*, *Pseudomonas* sp., and *Streptomyces* sp. against *Penicillium digitatum* was also investigated in a completely randomized factorial model. The maximum percent inhibition (99.95%) was observed by the thyme plant essence at 400 ppm concentration. Regression analysis of the effects of essences showed that by increasing the essences concentration, its inhibitory effect on fungi increased. Based on the results, thyme essence with having the important constituents of essences (carvacrol - 45.5%), (alpha-terpineol - 22.9%) and (endo - borneol 14.3%) had the highest inhibitory effect (22.3 mmol) against penicillium. Among 23 bacterial isolates, one of them, H7, had the highest inhibitory effect on penicillium. Using PCR amplification and DNA sequencing of 16S rRNA gene, it was identified as *Bacillus cereus*. Thus, thyme essence and *Bacillus cereus* (H7) are an appropriate substitutions to chemical control of orange postharvest diseases caused by *Penicillium digitatum*.

Keywords: Citrus green mold, *Penicillium digitatum*, Bacterial antagonists, *Thymus vulgaris*, *Bacillus cereuse*

*Corresponding author; hasanzadehr@yahoo.com