بررسی تأثیر چند اسانس گیاهی بر رشد میسلیومی قارچ *Fusarium solani* عامل بیماری پوسیدگی خشک فوزاریومی سیب‌زمینی در انبار روی غده در شرایط آزمایشگاهی

In vitro of essential oils effects on mycellial growth of *Fusarium solani* the causal of storage disease Fusarium Dry Rot of potato on their tubers

رویا طاووسی[۱]، محمد ترابی[۲*] و حسین وفایی[۳]

دریافت: ۱۳۹۳/۶/۲۵ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۰/۲۰

چکیده

استفاده از ترکیبات ضدقارچی طبیعی مانند اسانس‌های گیاهی برای نگهداری میوه و غده در دوره انبارداری به طور چشمگیری در حال افزایش است. در این تحقیق از اسانس گیاهان مرزه، مرزنجوش و پونه برای کنترل عامل فساد غده سیب‌زمینی در دوره انبارداری استفاده شد. بیماری پوسیدگی سیب‌زمینی توسط قارچ *Fusarium solani* ایجاد می‌شود. برای این منظور اثر ضدقارچی اسانس‌ها، بر بازدارندگی از رشد قارچ بیماری‌زای گیاهی *Fusarium solani* روی محیط کشت PDA و بافت غده 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 غده، ابتدا ۳۰ میکرولیتر سوسپانسیون اسپور قارچ (۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر) به غده‌های سیب‌زمینی تزریق و پس از یک ساعت غده‌ها با غلظت‌های ۴ و ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر اسانس گیاهان مورد نظر اسپری‌پاشی شدند. هفت روز بعد از مایه‌زنی، غده‌ها از نظر درصد آلودگی مورد بررسی قرار گرفتند. برای محاسبه درصد آلودگی هر غده به هشت قسمت مساوی تقسیم شد و تعداد قسمت‌های آلوده در ۱۲/۵ ضرب و درصد آلودگی غده‌ها به قارچ بیمارگر محاسبه گردید. آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار مورد بررسی قرار گرفت. اسانس‌های مورد آزمایش تأثیر معنی‌داری در بازدارندگی از رشد قارچ نشان دادند. نتایج بدست آمده نشان داد که بیش‌ترین بازدارندگی برای قارچ *F. solani* در روش دیسک کاغذی مربوط به اسانس پونه با ۵۹/۴۱ درصد و در روش مواد فرار مربوط به اسانس مرزه خوزستانی با ۴۰/۱۲ درصد بود. نتایج آزمایش روی غده مایه‌زنی شده با سوسپانسیون اسپور نشان داد که غلظت ۲۰ میلی‌لیتر بر لیتر اسانس مرزنجوش روی *F. solani* (با ۲۷/۰۸ درصد بیماری) بیش‌ترین درصد مهار کنندگی علیه این عامل بیماری‌زا بود.

واژگان کلیدی: ترکیبات ضدقارچی، اسانس‌های گیاهی، بازدارندگی از رشد میسلیوم، *F. solani*، کنترل پوسیدگی روی غده سیب‌زمینی

۱ و ۲- به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی‌گیاهی و استادیار گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا، ورامین

۳- مربی گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خرم‌آباد، خرم‌آباد

نویسنده مسئول مکاتبات: M_torabi28@yahoo.com

مقدمه

یکی از مهم‌ترین عوامل محدود کننده تولید محصولات کشاورزی، بیماری‌های گیاهی 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). در سال‌های گذشته، استفاده از خواص ضد میکروبی گیاهان در بخش کشاورزی چندان مورد توجه قرار نگرفته است. اما اخیراً، عوارض جانبی داروهای شیمیایی و گرانی آن‌ها و مشکلات و تهدیدهای ناشی از مصرف بی‌رویه سموم شیمیائی در سامانه‌های کشاورزی، سبب شده تا متخصصین بخش کشاورزی در صدد بهره‌گیری هر چه بیش‌تر از گیاهان دارویی برآیند (مجد و همکاران، ۱۳۸۷). با مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته است، به نظر می‌رسد که متابولیت‌های ثانویه، به عنوان موادی طبیعی، نقش اکولوژیکی مهمی در واکنش‌های دفاعی گیاهان دارند. بسیاری از متابولیت‌ها در دفاع گیاه در مقابل آفات وامراض مؤثر می‌باشند. شناخت و بررسی این متابولیت‌ها می‌تواند کمک مؤثری به کنترل آفات و امراض بنماید (Afzal *et al.,* 1979). در حال حاضر بیش از ۷۰۰۰۰ ترکیب شیمیائی در گیاهان شناخته شده است که ۳۰۰۰۰ نوع آن جزو متابولیت‌های ثانویه هستند (غلامی، ۱۳۸۲). تعداد اسانس‌ها یا روغن‌های گیاهی شناخته شده حدود ۳۰۰۰ اسانس می‌باشد که ۳۰۰ نوع آن دارای ارزش اقتصادی هستند (Burt, 2004). اسانس ها ترکیبات فراری هستند که چون از مواد چربی تشکیل نشده‌اند، قابلیت استفاده برای تولید صابون را ندارند. برخی از این مواد دارای خواص جلب کنندگی و بعضی دیگر خواص دورکنندگی دارند. ترپن‌ها با فرمول عمومی $(C_5H_8)n$ ترکیب غالب یا ماده موثره اکثر اسانس‌های گیاهی می‌باشند. امروزه استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در کنترل عوامل میکروبی پس از برداشت رو به افزایش است. این ترکیبات نه تنها فاقد اثر جانبی بوده بلکه به علت خواص آنتی‌اکسیدانی، کیفیت و طول دوره انبارداری میوه‌ها را افزایش می‌دهند (Plaza *et al.,* 2004; Rustaiyan *et al.,* 2000). گیاهان معطر متعلق به خانواده‌های نعناعیان و چتریان غنی از ترکیبات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی هستند (Hadian *et al.,* 2007; Ramezani *et al.,* 2004). 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. یکی از بیماری‌های مهم سیب‌زمینی در دنیا قارچ *Fusarium solani* عامل بیماری پوسیدگی انباری سیب‌زمینی است که معمولا در زمستان و بهار مشهود بوده و اغلب بیش از ۲۰ درصد محصول سیب زمینی که در بازار کشور به فروش می‌رسد، مبتلا به این بیماری می باشد. این بیماری در ۱۹۰۴ میلادی توسط پتی‌ویچ شناخته شده و به علت ورود بی‌رویه غده‌های سیب‌زمینی بیمار به ایران، هم اکنون در اکثر مناطق، به‌خصوص در آذربایجان، اصفهان، شهرکرد، کاشان، تهران و خراسان شایع است. این بیماری از مهم‌ترین و مخرب‌ترین بیمارگرهای سیب‌زمینی می‌باشد که بیش از ۶۰ درصد محصول انبار شده را در معرض خطر پوسیدگی قرار می‌دهد (بقایی راوری و همکاران، ۱۳۸۵). خسارت این بیماری مخصوصا در سال‌های اخیر که برداشت سیب‌زمینی با ماشین انجام می‌شود، به علت زخمی شدن غده‌ها و سهولت نفوذپذیری قارچ عامل بیماری به داخل غده بیش‌تر است. هدف این تحقیق بررسی تأثیر اسانس گیاهان مرزنجوش، مرزه خوزستانی و پونه بر رشد میسلیوم قارچ *Fusarium solani* عامل بیماری پوسیدگی انباری سیب‌زمینی بود.

مواد و روش‌ها

جداسازی، خالص‌سازی، شناسایی و اثبات بیماری‌زائی جدایه قارچ *Fusarium solani*

ابتدا نمونه‌های غده سیب‌زمینی 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 درصد انجام شد و روی محیط کشت معمولی سیب‌زمینی- دکستروز- آگار (PDA) کشت گردید. تشتک‌های

پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. پس از رشد قارچ‌ها روی محیط کشت، از روی خصوصیات ظاهری قارچ مورد نظر، با کلیدهای شناسایی معتبر مقایسه شده، سپس جداسازی و با روش تک اسپور روی محیط کشت آب-آگار (WA) خالص‌سازی شدند (آزادوار و همکاران، ۱۳۸۶؛ خسروفر و بنی‌هاشمی، ۱۳۸۳؛ بهروزیان و اسدی، ۱۳۷۳). برای خالص‌سازی از محیط کشت‌های PDA و WA استفاده شد (Stack and McMulen, 1991). شناسایی گونه‌های فوزاریوم با توجه به ویژگی‌های ماکروسکوپی نظیر رنگ و نحوه رشد پرگنه، وجود یا عدم وجود میسلیوم‌های هوایی روی محیط کشت، رنگ میسلیوم‌های هوایی، رنگ پرگنه از پشت ظروف پتری، وجود اسپوردوکیوم و ویژگی‌های میکروسکوپی مانند نوع فیالید (مونو فیالید یا پلی فیالید)، وجود یا عدم وجود سرهای دروغین، تولید کلامیدوسپور، شکل ماکروکنیدی و میکروکنیدی‌ها با استفاده از کلید معتبر Leslie and Summerell (2006) انجام شد.

تهیه اسانس

قسمت‌های هوایی گیاهان مرزنجوش، مرزه خوزستانی و پونه از مرکز تحقیقات کشاورزی استان لرستان جمع‌آوری و با استفاده از دستگاه کلونجر اسانس‌گیری شد.

مواد گیاهی گونه‌های مورد آزمایش شامل مرزنجوش، مرزه خوزستانی و پونه از مناطق مختلف استان لرستان تهیه شدند. گیاهان جمع‌آوری شده در دمای اتاق و شرایط سایه خشک شدند و پس از حذف مواد زائد، هر یک از نمونه‌ها به وسیله آسیاب خرد شده و سپس اسانس آن‌ها به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر (Clevenger apparatus) به مدت ۳ ساعت استخراج گردید. استخراج اسانس برای هر نمونه در سه تکرار و برای هر تکرار ۱۰۰ گرم نمونه گیاهی استفاده شد. اسانس‌های به دست آمده به‌وسیله سولفات سدیم خشک، آب‌گیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد درون یخچال تا زمان انجام آزمایش نگه‌داری شد. اسانس‌های به دست آمده از نمونه‌های گیاهی با دستگاه‌های گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی همراه با طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) مورد شناسایی قرار گرفتند (Jannings and Shibamoto, 1980).

تهیه غده‌های مورد استفاده

غده‌های سیب‌زمینی که از نظر شکل، اندازه، رنگ و وزن یکسان بودند، از انبار و از یک جعبه تهیه شدند.

تهیه سوسپانسیون اسپور

به‌منظور تهیه زادمایه *Fusarium solani* مطابق روش بنی‌هاشمی (۱۳۸۹) ابتدا مقدار ۱۰ گرم کلش خرد شده گندم را در ۲۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر ریخته و دو بار متوالی و هر بار به مدت ۲۴ ساعت در ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد اتوکلاو شدند. یک قطعه ۵ میلی‌متری از کشت چهار روزه قارچ را به آن اضافه نموده و به مدت چهار روز روی دستگاه شیکر در ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شد تا به اندازه کافی تولید اسپور نماید. جمعیت اسپورها به‌وسیله لام هماسیتومتر ۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر تعیین گردید (درویش‌نیا، ۱۳۷۵؛ بنی‌هاشمی، ۱۳۸۹).

بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌ها بر رشد میسلیوم قارچ *Fusarium solani* به روش دیسک کاغذی

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 کناره 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 سترون قرار داده و تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد درون انکوباتور نگه‌داری شد. از دیسک فاقد اسانس به‌عنوان شاهد در

مقابل بلوک قارچ قرار داده شد. اندازه‌گیری به‌صورت روزانه انجام شد و نتایج ثبت گردید، بعد از کامل شدن رشد شاهد هر قارچ، آزمایش متوقف و نتایج ثبت گردید (Mehrabani *et al.,* 2004). نتایج به‌صورت میانگین قطر کلنی قارچ اندازه‌گیری گردید و میزان بازدارندگی بر اساس 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 (تیموری و راهنما، ۱۳۹۲؛ اصغری مرجانلو و همکاران، ۱۳۸۷).

بررسی اثر مواد فرار اسانس‌ها روی رشد میسلیوم قارچ *F. solani*

در این روش مطابق با روش بالا نمونه‌ها تهیه گردید. تفاوت این روش با روش قبلی قرار دادن دیسک حاوی اسانس روی درب تشتک پتری در مقابل بلوک قارچی است. این آزمون برای مشخص کردن وجود مواد فرار ضدقارچی درون هر نمونه اسانس استفاده شد. از دیسک کاغذی آغشته به آب مقطر سترون به‌عنوان شاهد استفاده شد (کهن‌مو و جمالی، ۱۳۹۲).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) اسانس‌ها به روش ماکرودیولیشن

برای تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌ها از روش ماکرودیولیشن (Vale-Silva *et al.,* 2012) استفاده شد. از کشت ۷ روزه قارچ‌ها روی محیط کشت PDA، سوسپانسیون ۱۰۶ CFU/ml اسپورهای قارچ تهیه گردید. سپس رقت‌های ۱، ۱/۳، ۱/۵، ۱/۷، ۲، ۲/۳، ۲/۵، ۳، ۳/۵، ۴، ۴/۵، ۵، ۵/۵، ۶، ۶/۵، ۷، ۷/۵، ۸، ۸/۵، ۹، ۹/۵، ۱۰، ۱۰/۵، ۱۱، ۱۱/۵، ۱۲، ۱۲/۵، ۱۵، ۲۰ و ۲۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر اسانس درون محیط کشت PD Broth تهیه شد. از سوسپانسیون اسپورهای قارچ میزان ۲۰ میکرولیتر به ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت PD Broth حاوی غلظت‌های بالا اضافه شد. لوله‌های مایه‌زنی شده روی شیکر انکوباتور با سرعت ۱۷۰ بار بر دقیقه به مدت ۵ روز نگه‌داری شد. بعد از انکوبه شدن، میزان ۵۰ میکرولیتر از هر رقت برداشته و بر روی محیط کشت PDA کشت گردید. بعد از دو روز تعداد اسپورهای جوانه‌زنی شده محاسبه و حداقل غلظت بازدارندگی ۹۰ درصدی از رشد قارچ تعیین گردید (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 از رشد کامل قارچ جلوگیری به‌عمل می‌آورد.

بررسی اثر اسانس‌ها در جلوگیری از بروز بیماری روی غده

به‌منظور مایه‌زنی غده‌ها ابتدا با استفاده از هیپوکلرید سدیم یک درصد تجاری به مدت دو دقیقه، غده‌ها استریل شدند. سپس با استفاده از آب مقطر استریل شست‌وشو شدند. برای مایه‌زنی غده‌ها ابتدا توسط لانس استریل، زخمی به ابعاد ۲×۲ میلی‌متر ایجاد و سپس ۳۰ میکرولیتر از سوسپانسیون 10^6 CFU/ml اسپور قارچ‌ها به درون زخم هر غده و به عمق دو میلی‌متر تزریق شد. غلظت‌های ۴ و ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر هرکدام از اسانس‌های پونه، مرزه خوزستانی و مرزنجوش جداگانه روی غده‌ها اسپری شد. در تیمار شاهد آلوده پس از تزریق عامل بیماری جهت اسپری‌پاشی به جای اسانس از آب مقطر سترون استفاده شد و همچنین در شاهد سالم ابتدا ۳۰ میکرولیتر آب مقطر سترون به درون زخم تزریق شده جهت اسپری‌پاشی از آب مقطر سترون استفاده شد. به‌منظور تأمین نمودن رطوبت جعبه‌های حاوی سیب‌زمینی از پنبه‌های سترون خیس استفاده شد. این آزمون در سه تکرار و به‌صورت طرح کاملاً تصادفی درون آزمایشگاه انجام شد. سپس بعد از هفت روز میانگین درصد خسارت غده‌ها (قطر ناحیه آلودگی) در هر جعبه محاسبه و

تجزیه و تحلیل آماری گردید. پس از اینکه علائم آلودگی در غده‌های شاهد آلوده به‌صورت کامل ظاهر گردید یادداشت‌برداری از نمونه‌ها به عمل آمد. به این صورت که هر غده 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 غده‌ها شمارش و یادداشت شدند. جهت محاسبه درصد آلودگی، تعداد قطعات آلوده در ۱۲/۵ ضرب و درصد آلودگی تعیین شد (رنجبر و همکاران، ۱۳۸۷؛ اصغری مرجانلو و همکاران، ۱۳۸۷).

تجزیه اسانس‌ها با استفاده از دستگاه GC/MS

اسانس‌های مورد استفاده در این پژوهش با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی همراه با طیف‌سنجی جرمی (GC/MS) در دانشگاه فردوسی مشهد مورد شناسایی قرار گرفتند. به‌طوری‌که در ابتدا اسانس‌ها به دستگاه تزریق شده و پس از یافتن برنامه‌ریزی مناسب دمایی ستون برای جداسازی کامل ترکیب‌های اسانس و تعیین درصد و زمان بازداری هر ترکیب، اسانس‌ها 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.

تجزیه آماری داده‌ها

داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و مقایسه میانگین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد به کمک نرم‌افزار آنالیز SAS انجام شد.

نتایج

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی جدایه قارچی

در مرحله جداسازی قارچ عامل بیماری، از میوه‌های آلوده و مشکوک به بیماری که از سردخانه و انبار میوه جمع‌آوری شده بودند استفاده شد. جداسازی و سپس خالص‌سازی و تک اسپور انجام گرفت. قارچ خالص‌سازی شده که از نظر مشخصات ظاهری با قارچ مورد نظر شباهت داشت با استفاده از کلیدهای معتبر قارچ شناسی شناسایی شد. عامل بیماری پوسیدگی خشک سیب‌زمینی قارچ *Fusarium solani* می‌باشد. علائم به صورت لکه‌های قهوه‌ای بر روی غده‌ها به ویژه در محل زخم‌ها دیده می‌شود. ابتدا لکه‌های قهوه‌ای ریزی پدید می‌آید و به کندی پیشرفت می‌نماید و به تدریج پوست روی لکه فرورفته و چروکیده شده و غده‌ها به حالت مومیایی در می‌آیند. پرگنه قارچ دارای رشد سریع در محیط PDA، رنگ پرگنه ابتدا سفید بوده و سپس کرمی رنگ می‌شود. رنگ سطح زیرین پرگنه قهوه‌ای مایل به زرد، ماکروکنیدی بدون خمیدگی مشخص، دارای دیواره ضخیم، دارای ۶-۳ جداره، میکرو کنیدی‌ها فراوان، یک تا دو سلولی، تخم مرغی، بیضوی یا قلوه‌ای شکل، با دیواره ضخیم، تشکیل میکروکنیدی‌ها بر روی فیالید به صورت سر دروغین، کنیدیوفورها مونوفیالید ساده یا منشعب و فیالیدها دراز، کلامیدوسپورها به صورت انفرادی و جفتی تشکیل شدند.

آزمون اثبات بیماری‌زایی

قارچ عامل بیماری جدا شده از میوه‌ها با روش ذکر شد در قسمت 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.

اثر بازدارندگی اسانس‌ها روی قارچ *Fusarium solani*

مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در روش دیسک کاغذی هر سه اسانس باعث بازدارندگی از رشد قطر پرگنه قارچ *F. solani* شده و اختلاف معنی‌داری بین اسانس‌ها در بازدارندگی از رشد این قارچ وجود نداشت ولی اختلاف بین قطر پرگنه در تیمارهای تمام اسانس‌ها با شاهد معنی‌دار بود (جدول۱). مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که در روش مواد فرار هر سه اسانس باعث بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ *F. solani* شده و اختلاف معنـی‌داری بین اسانس‌ها در بازدارندگی از رشـد این قارچ وجود نداشت ولی اختلاف آن‌ها با شاهد معنی‌دار بود (جدول ۱، شکل ۱ و شکل ۲).

جدول ۱- مقایسه میانگین قطر پرگنه و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ *Fusarium solani* روی محیط کشت PDA توسط اسانس‌های مرزه خوزستانی، مرزنجوش و پونه در روش ارزیابی

Table 1. Mean comparison of colony diameter and inhibitory growth percentage of *Fusarium solani* by essential oil of Summer savory, wild minl and Majorom in two methods of assessment

Essential oils	اسانس‌ها	روش مواد فرار Volatile essential oil method		روش دیسک کاغذی Disk diffusion method	
		قطر پرگنه Colony diameter	درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم نسبت به شاهد Perecentage of growth inhibition	قطر پرگنه Colony diameter	درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم نسبت به شاهد Perecentage of growth inhibition
Summer savory	مرزه خوزستانی	2.7	40.12a	2.13	52.64a
ajorom	مرزنجوش	3.03	32.98a	1.93	57.22a
Wild minl	پونه	2.87	36.55a	1.83	59.41a
contorol	شاهد	5.53	0.00b	4.53	0.00b

* میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد هستند.

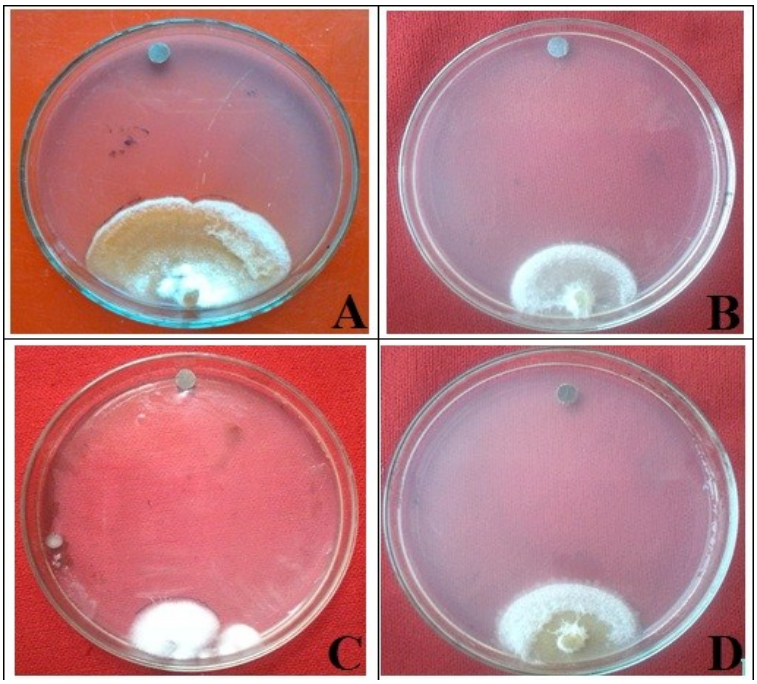
*Means with similar letters in each column are not significantly different at 5% level of probability.

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌ها (MIC) به روش ماکرودیولیشن

نتایج اثر اسانس‌ها روی قارچ *F. solani* نشان داد که غلظت‌های ۲ میکرولیتر در میلی‌لیتر مرزه خوزستانی، ۱/۷ میکرولیتر در میلی‌لیتر مرزنجوش و ۱/۷ میکرولیتر در میلی‌لیتر پونه به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی و غلظت‌های ۸/۵ میکرولیتر در میلی‌لیتر مرزه خوزستانی، ۸ میکرولیتر در میلی‌لیتر مرزنجوش و ۸ میکرولیتر در میلی‌لیتر پونه به عنوان حداقل غلظت کشندگی روی این قارچ بودند (جدول ۲).

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

Fig.1. Effect of different essential oils on colony growth of *Fusarium oxysporum*: (A) Control, (B) Majorom essential oil (c) Wild minl essential oil (D) Summer savory essential oil.



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

Fig.1. Effect of essential oils on colony growth of *Fusarium solani* by disck diffusion method: (A) Control, (B) Majorom essential oil (c) Wild minl essential oil (D) Summer savory essential oil.

جدول ۲- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) اسانس‌های مرزه‌خوزستانی، مرزنجوش و پونه روی قارچ *Fusarium solani*

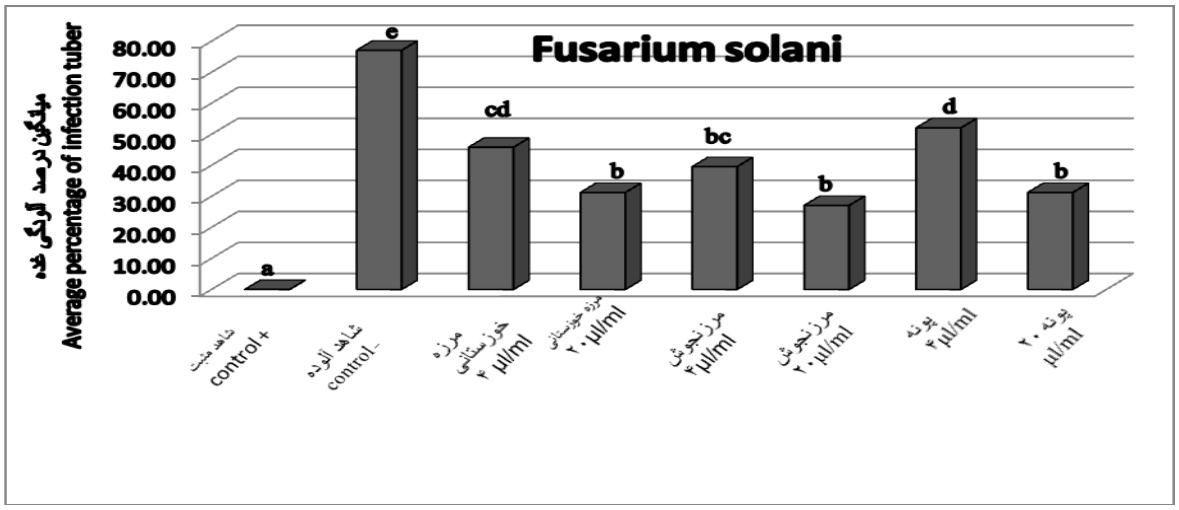
Table 2. Inhibitory the minimum concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) essential oil of Summer savory, marjoram and wild mint on the fungus *Fusarium solani*

تیمار Treatment	درصد جوانه‌زنی اسپور نسبت به شاهد Percentage of germinated spore to control	تعداد اسپور جوانه زده Namber of germinated spore	غلظت اسانس (میکرولیتر در میلی‌لیتر) Concentration of essential oil (µl/ml)
شاهد *F. solani*	100	57	0
مرزه خوزستانی + *F. solani*	56.14	32	1.3
	10.53	6	2
	7.02	4	5.5
	0	0	8.5
مرزنجوش + *F. solani*	49.12	28	1.3
	10.53	6	1.7
	3.51	2	5.5
	0	0	8
پونه + *F. solani*	50.88	29	1.3
	10.53	6	1.7
	5.26	3	5.5
	0	0	8

اثر اسانس‌ها در جلوگیری از بروز بیماری روی میوه

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

مقایسه میانگین اثر اسانس‌ها روی قارچ *F. solani* عامل پوسیدگی خشک سیب‌زمینی نشان داد که کم‌ترین درصد آلودگی غده به قارچ بیمارگر پس از شاهد مثبت (عاری از آلودگی) مربوط به غلظت ۲۰ میکرولیتر بر میلی‌لیتر از اسانس‌های مرزنجوش و مرزه خوزستانی (b) بوده است ولی این دو تیمار نتوانستند به طور صد درصد بیماری را کنترل کنند. مقایسه میانگین درصد بیماری نشان داد که از بین تیمارها بیش‌ترین درصد آلودگی غده به قارچ بیمارگر بعد از شاهد منفی مربوط به تیمار ۴ میکرولیتر بر میلی‌لیتر پونه (d) بوده که این تیمار آلودگی غده را نسبت به شاهد منفی (e) کنترل نمود (شکل ۳).



شکل ۳- مقایسه میانگین تأثیر اسانس‌های مرزه خوزستانی، مرزنجوش و پونه در کاهش آلودگی بافت غده سیب‌زمینی آلوده شده با قارچ *Fusarium solani* (ستون‌ها با حرف مشابه فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ هستند)

Fig 3. Compare the average effect of essential oil of Summer savory, marjoram and wild mint in reducing infection in potato tubers infected with the fungus *Fusarium solani* (columns with same letter are not significantly different at the 5% level)

تعیین درصد ترکیبات اسانس‌ها با استفاده از GS-MS

نتایج حاصل از تجزیه اسانس مرزه‌خوزستانی با دستگاه GC/MS 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. نتایج حاصل از آنالیز اسانس مرزنجوش با دستگاه GC/MS 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. نتایج حاصل از آنالیز اسانس پونه با دستگاه GC/MS 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.

بحث

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 می‌شود. 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 (Giordani *et al.,* 2008; Kumar *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 تشکیل‌دهنده آن‌ها بستگی دارد و نوع و درصد 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 *Fusarium solani* در محیط کشت و غده 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 غده هم درصد بیماری مورد بررسی قرار گرفت، بدین صورت که هر غده به هشت قسمت تقسیم و هر قسمت معادل ۱۲/۵ درصد در نظر گرفته شد. در این پژوهش نتایج به دست آمده روی قارچ *F. solani* در محیط کشت نشان داد که از میان سه اسانس مورد مطالعه بیش‌ترین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه در روش دیسک کاغذی مربوط به اسانس پونه با ۵۹/۴۱ درصد و در روش مواد فرار مربوط به مرزه خوزستانی با ۴۰/۱۲ درصد بود. همچنین نتایج حاصل از این پژوهش روی بافت میوه آلوده شده با سوسپانسیون اسپور *F. solani* نشان داد که کم‌ترین درصد بیماری مربوط به تیمار ۲۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر مرزنجوش با ۲۷/۰۸ درصد 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 تشکیل‌دهنده اسانس‌های گیاهی ارتباط داد. 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 سایر محققین مطابقت دارد. نتایج حاصل از مطالعه لطفی و همکاران (۱۳۸۹) روی قارچ *Fusarium oxysporum* نشان داد که اسانس گیاهان آویشن، زنیار 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 درصد مشاهد نشد ولی در غلظت ۴۰۰ppm کنترل رشد قارچ را مهار کردند. شاکرمی و همکاران (۱۳۸۵) 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. سپهوند و همکاران در سال ۱۳۸۴ در پژوهشی اثرات ضد قارچی اسانس‌های مرزه خوزستانی و مرزنجوش را بر روی ده قارچ کپکی و مخمر مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه مشخص شد که اسانس مرزه خوزستانی حتی در غلظت‌های پایین قادر به کنترل کامل بسیاری از قارچ‌های مورد بررسی است. در اسانس مرزه خوزستانی کارواکرول و در اسانس مرزنجوش تیمول نقش مهمی در خاصیت ضد میکروبی دارند.

با توجه به نتایجی که از این پژوهش به دست آمد می‌توان گفت که اسانس‌های گیاهی می‌توانند جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌ها و سموم شیمیایی در کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در محیط‌های بسته مانند انبار نگهداری میوه‌ها و فروشگاه‌های میوه باشند.

منابع References

آزادوار، م. نجفی‌نیا، م. ارشاد، ج. ۱۳۸۶. بررسی عوامل پوسیدگی غده سیب‌زمینی در انبارها و سردخانه‌های منطقه جیرفت. پژوهش و سازندگی در زراعت و باغبانی، ۷۸۵: ۱۰۱-۹۷.

اصغری مرجانلو، ا. مستوفی، ی. شعیبی، ش. مقومی، م. ۱۳۸۷. تأثیر اسانس ریحان بر کنترل پوسیدگی خاکستری و کیفیت پس از برداشت توت‌فرنگی (سلوا). گیاهان دارویی ۸ (۱): ۱۳۹-۱۳۱.

بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۸۹. واکنش ارقام *Cucumis melo* به نژادهای *Fusarium oxysporum* f.sp. *melonis* عامل پژمردگی فوزاریومی. بیماری‌های گیاهی، ۴۶: ۲۲-۱۱.

بهروزیان، م. اسدی، پ. ۱۳۷۳. معرفی سه گونه فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه و طبق پیاز خوراکی و تعیین فراوانی آن‌ها در آذربایجان شرقی. بیماری‌های گیاهی، ۳۰: ۴۹-۴۱.

تیموری، س. راهنما، ک. ۱۳۹۲. بررسی اثرات ضد قارچی چند اسانس گیاهی در رشد قارچ عامل پوسیدگی سفید ساقه کلزا (*Sclerotinia sclerotiorum*) در شرایط آزمایشگاه. تحقیقات بیماری‌های گیاهی. ۲ (۱): ۳۰-۲۳.

خسروفر، ف. بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۸۳. نقش علف‌های هرز و نباتات زراعی در پایداری قارچ *Phytophthora drechsleri* عامل بوته میری کدوییان در استان فارس. بیماری‌های گیاهی، ۴۰: ۱۱۲-۱۰۵.

درویش‌نیا، م. ۱۳۷۵. مطالعات اتیولوژیکی پوسیدگی ریشه و طوقه گندم در استان لرستان. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، تهران.

رنجبر، ح. فرزانه، م. هادیان، ج، میرجلیلی، م. شریفی، ر. ۱۳۸۷. اثر ضد قارچی چند اسانس گیاهی بر بیماری‌های پس از برداشت میوه توت‌فرنگی. پژوهش سازندگی در زراعت و باغبانی، ۸۱: ۶۱-۵۴.

سپهوند، ا. کردبچه، پ. دلفان، ب. زینی، ف. هاشمی، س. محمودی، م. ۱۳۸۴. اثرات ضد قارچی اسانس ساتوریا خوزستانیکا منطقه لرستان به روش *in vitro*. فصلنامه علمی-پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی لرستان، ۲: ۴۳-۳۷.

شاکرمی، ج. بازگیر، ع. فیضیان، م. ۱۳۸۵. بررسی اثر پنج گونه گیاه بر رشد میسلیومی چهار گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی در شرایط آزمایشگاهی، علوم و فنون کشاورزی، ۱۰ (۳): ۵۰۳-۴۹۷.

غلامی، ب. ۱۳۸۲. متابولیت‌های ثانویه گیاهان و امکان کاربرد بیولوژیک آن‌ها در اکوسیستم‌های کشاورزی. سومین همایش ملی توسعه‌ی کاربرد مواد بیولوژیک و استفاده بهینه از کود و سم در کشاورزی. موسسه تحقیقات اصلاح نهال و بذر،کرج .صفحه۵۱۲.

کهن‌مو، م. ا. جمالی، ف. ۱۳۹۲. فعالیت قارچ‌کشی اسانس چند گیاه دارویی علیه قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی. نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی، ۳۳ (۲): ۲۷-۱.

لطفی، ا. جعفرپور، م. اعتمادی، ن. طهمورث‌پور، آ. ۱۳۸۹. بررسی تأثیر اسانس گیاهان آویشن، زنیار و پونه بر روی قارچ *Fusarium oxysporum*. پنجمین همایش ملی ایده‌های نو در کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان (اصفهان)، دانشکده کشاورزی: ۴ص.

مجد، ا.، نژاد ستاری، ط. خاوری‌نژاد، ر. و دوستی، ب. ۱۳۸۷. بررسی تغییرات کمی و کیفی ترکیبات سازنده اسانس گونه دارویی مرزه خوزستانی (*Satureja Khuzistanica J.*) در طول تکوین گیاه و خواص ضد میکروبی اسانس آن در شرایط in vitro. علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی، ۱۸ (۷۰/۱): ۶۰- ۵۲.

Afzal, M., Cheema, R. A., Chaudhary, R. A. 1979. Incidence of aflatoxins and aflatoxin producing fungi in animal feedstuffs. Mycopathologia 69(3): 149-151.

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

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

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. J. Esse. Oil Res. 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.

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.

Leslie, J. F., Summerell, B. A. 2006. The Fusarium Laboratory Manual. Blackwell Publishing Professional, Ames, USA: 388p.

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

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 Hort: 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.

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.

Stack, R. W., McMulen, M. P. 1991. Effect of fungicidal seed treatments on common root rot of spring wheat and barley. North Dakota Farm Research 49: 13-16.

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.