بررسی خاصیت قارچ‌کشی اسانس گیاهان حاوی تیمول و کارواکرول در کنترل قارچ *Botrytis cinerea*، عامل پوسیدگی خاکستری انگور

مسعود ذاکر[۱*]، علیرضا بلندنظر[۲] و علیرضا محمدی[۳]

۱. بخش تحقیقات گیاه پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران. ۲. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی باریج، شرکت داروسازی باریج اسانس، کاشان، ایران. ۳. بخش تحقیقات اصلاح و تهیه نهال و بذر، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۵/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۵

چکیده

در طی چند دهه اخیر خاصیت قارچ‌کشی عصاره و اسانس بسیاری از گیاهان برای مبارزه با بیماری‌های گیاهی از جمله عوامل ایجاد لکه برگی و پوسیدگی در محصولات کشاورزی مورد توجه محققان بسیاری از کشورها قرار گرفته است. تحقیقات فراوان نشان داده است که اسانس برخی از گیاهان که حاوی ترکیبات تیمول و کارواکرول می‌باشند، دارای خاصیت قارچ‌کشی مناسبی علیه طیف وسیعی از قارچ‌های عامل بیماری‌های گیاهی از جمله پوسیدگی خاکستری انگور می‌باشند. عامل پوسیدگی خاکستری انگور (*Botrytis cinerea*) دارای دامنه میزبانی وسیعی بوده و قادر است که در مزرعه و انبار خسارت شدیدی به این محصول وارد نماید. در این تحقیق تاثیر ضد قارچی اسانس آویشن شیرازی، مرزه، رازیانه، درمنه و رزماری در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام بر رشد پرگنه، جوانه‌زنی و رشد لوله تندش اسپور قارچ *B. cinerea* در شرایط آزمایشگاه مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که اسانس‌های آویشن شیرازی، مرزه و رازیانه به ترتیب در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام در مقایسه با شاهد در سطح آماری ۱درصد به طور کامل (۱۰۰٪) از رشد پرگنه و جوانه‌زنی اسپور این قارچ جلوگیری نمودند در حالی که اسانس‌های درمنه و رزماری یا تاثیری جزیی داشتند یا بی‌تاثیر بودند. نتایج همچنین نشان داد که اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه که دارای ترکیبات تیمول و کارواکرول می‌باشند، خصوصا اسانس آویشن شیرازی که حاوی هر دو ترکیب ذکر شده می‌باشد، بهترین تاثیر بازدارندگی را در مقابل این قارچ از خود نشان دادند.

واژه‌های کلیدی: خاصیت قارچ‌کشی، اسانس، انگور، پوسیدگی خاکستری.

* **مسئول مکاتبات:** مسعود ذاکر، masoudzaker35@gmail.com

مقدمه

انگور یکی از محصولات مهم باغی استان سمنان می‌باشد که سطح زیرکشتی بالغ بر ۳۸۴۰ هکتار و میانگین محصولی در حدود ۲۶/۵ تن در هکتار را به خود اختصاص می‌دهد. از این میان بیشترین سطح کشت این محصول مربوط به شهرستان شاهرود و حومه می‌باشد (Ahmady *et al.*, 2015). رقم غالب این محصول در استان سمنان سرخ فخری می‌باشد که غالبا پس از برداشت به سردخانه منتقل گردیده و در اوایل بهار سال بعد به بازار عرضه می‌شود.

بیماری پوسیدگی خاکستری انگور با عامل *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های انگور در مزرعه و انبار در سراسر جهان به حساب می‌آید که قادر است حتی در دمای صفر درجه سانتی‌گراد رشد و گسترش یافته و با کاهش کیفیت بازارپسندی این محصول باعث ایجاد خسارت گردد (Elad *et al.*, 2007). در ایران قارچ *B. cinerea* مانند گونه‌های *Penicillium* spp. از عوامل مهم پوسیدگی انگور در دوران انبارداری می‌باشد (Ghafari *et al.*, 2011; Jalili-Marandi *et al.*, 2010).

عصاره و اسانس بسیاری از گیاهان حاوی موادی از قبیل آلکالوئیدها، تنین‌ها، کوئینون‌ها، ترکیبات فنولیک و فیتوآلکسین‌ها می‌باشند که خاصیت قارچ‌کشی آن‌ها به اثبات رسیده است (Fawcett and Spencer, 1966). بر اساس نتایج حاصل از یک تحقیق، از بین ۲۱ اسانس گیاهی اسانس آویشن (*Thymus capitatus*) به نسبت ۰/۱٪ قادر بود به طور کامل از رشد پرگنه و همچنین جوانه‌زنی اسپورهای *B. cinerea* در شرایط آزمایشگاهی جلوگیری نماید. در این تحقیق اسانس میخک (*Syzygium aromaticum*) بین ۶۷ تا ۹۳٪ و نوعی نعناع استرالیایی (*Prostanthera rotundifolia*) ۶۵٪ خاصیت بازدارندگی داشتند (Antonov *et al.*, 1997). در تحقیقی دیگر اسانس چهار گیاه دارویی میخک، دارچین، علف لیمو وزنجبیل برعلیه قارچ عامل پوسیدگی خاکستری چند میوه مورد آزمایش قرار گرفت و گزارش گردید که اسانس‌های میخک، دارچین و علف لیمو دارای خاصیت قارچ‌کشی مناسبی علیه *B. cinerea* بودند (Sirirat *et al.*, 2009). طی تحقیقی در ایران، تعداد ۱۳ اسانس از گیاهان دارویی در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰ و ۷۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر علیه قارچ *B. cinerea* عامل پوسیدگی خاکستری سیب مورد آزمایش قرار گرفت که از آن میان به ترتیب اسانس‌های رازیانه، زیره سبز وزیره سیاه در غلظت۲۵۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر و اسانس‌های نعناع فلفلی، آویشن و دارچین در غلظت ۵۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر به میزان ۱۰۰ درصد در شرایط محیط کشت از رشد این قارچ جلوگیری نمودند. ضمنا در روش استفاده از مواد فرار، اسانس‌های زیره سبز، نعناع، شوید، دارچین، رازیانه و زیره سیاه خاصیت قارچ‌کشی مناسبی علیه این قارچ از خود نشان دادند و مابقی تا حدودی خاصیت بازدارندگی (Fungistatic) داشتند (Behdani *et al.*, 2012). اسانس جوانه میخک و گیاه رزماری به دو صورت بخار و تماس مستقیم به‌ترتیب با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰، ۶۰۰ و ۱۵۰، ۳۰۰ ، ۴۵۰، ۶۰۰ پی‌پی‌ام بر علیه قارچ *B. cinerea* در حبه‌های انگور مورد آزمایش قرار گرفتند و گزارش گردیدکه در روش تماس مستقیم غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌امی اسانس جوانه میخک توانست به طور کامل از رشد آن جلوگیری نماید در حالیکه هیچکدام از غلظت‌های اسانس رزماری در این رابطه موثر نبودند. در روش استفاده از بخار این اسانس‌ها، نسبت ۴۵۰ پی‌پی‌امی اسانس جوانه میخک به طور کامل از رشد آن جلوگیری نموده و ایجاد هیچ‌گونه گیاه‌سوزی در حبه‌ها نکرد در حالیکه اسانس رزماری با همین نسبت

باعث توقف رشد آن گردید، لکن ایجاد گیاه‌سوزی در حبه‌ها کاملا مشهود بود. در مجموع این محققان ادعا نمودند که اسانس گل میخک به صورت بخار برای کنترل بیماری پوسیدگی خاکستری انگور در سردخانه بر اسانس رزماری ارجحیت دارد و می‌تواند به عنوان جایگزینی کم‌خطر برای گوگرد مورد استفاده قرار گیرد (Vesaltalab *et al.*, 2012). در یک تحقیق اثر ترکیبات تیمول و لینالول به صورت بخار بر رشد پرگنه و جوانه‌زنی اسپور قارچ *B. cinerea* عامل پوسیدگی خاکستری انگور مورد مطالعه قرار گرفت و محققان مربوطه گزارش کردندکه ترکیب تیمول به نسبت ۳۰ پی‌پی‌ام قادر به جلوگیری از رشد پرگنه و جوانه‌زنی اسپور این قارچ به طور کامل در ارقام Campbell early، Muscat، Bailey، Sheridan و Geobong بود، درحالی که این حالت با غلظت ۱۲۰ پی‌پی‌امی ترکیب لینالول به دست آمد ضمن این‌که ترکیب تیمول هیچگونه تاثیر منفی در میزان قند این ارقام نیز نداشت (Shin *et al*, 2014). در ترکیه محققان اسانس آویشن، رزماری، نعناع، ریحان، زیتون و مریم گلی را بر علیه قارچ *B. cinerea* مورد آزمایش قرار دادند و گزارش نمودند که از بین آن‌ها بهترین تاثیر به ترتیب مربوط به اسانس‌های آویشن، نعناع و رزماری بود (Mermer-Dogu and Zobar, 2014). تاثیر عصاره مرزه، نعناع، سیر، درمنه و رزماری در نسبت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد در کنترل کپک خاکستری انگور سیاه مورد آزمایش قرار گرفت و نتیجه‌گیری گردید که عصاره‌های مرزه، سیر و نعناع در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰٪ توانستند بین ۸۰ تا ۱۰۰ درصد از رشد این قارچ جلوگیری نمایند. این محققان همچنین به این نتیجه رسیدند که تعدادی از عصاره‌های مورد آزمایش از جمله درمنه و رزماری حتی با غلظت ۲۰ درصد هیچ‌گونه خاصیت بازدارندگی در مقابل این قارچ از خود نشان ندادند (Sesan *et al.*, 2015). در تحقیقی دیگر محققان اسانس سه گیاه مرزه (*Satureja hortensis*)، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) و زنیان (*Carum copticom*) را در نسبت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام برای جلوگیری ازرشد پرگنه *B. cinerea* عامل پوسیدگی خاکستری توت فرنگی آزمایش نمودند و نتیجه‌گیری کردند که نسبت ۲۰۰ پی‌پی‌ام هر سه اسانس به میزان موثری باعث جلوگیری از رشد کلنی این قارچ گردیدند (Etemadi *et al.*, 2012).

در تحقیق حاضر تاثیر اسانس پنج گیاه دارویی در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام جهت تعیین موثرترین اسانس (ها) و غلظت مربوطه در جلوگیری از رشد پرگنه، جوانه‌زنی اسپور و رشد طولی لوله تندش اسپور عامل بیماری پوسیدگی خاکستری انگور در شرایط آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

استخراج اسانس از گیاهان مورد آزمایش

ابتدا سرشاخه‌های جوان گیاهان مورد نظر موجود در شرکت داروسازی باریج اسانس کاشان، شناسایی شده توسط کارشناسان گیاه‌شناسی آن شرکت در دمای اتاق و شرایط سایه خشک گردیدند و پس از حذف مواد زائد، هریک از نمونه‌ها به وسیله آسیاب‌برقی پودر گردیده و مقدار ۱۰۰ گرم از آن‌ها به یک بالن تقطیر ۱ لیتری منتقل گردیدند. پس از اضافه نمودن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استخراج اسانس‌ها به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه کلونجر (Clevenger apparatus) به مدت ۵ ساعت صورت گرفت (British Pharmacopoeia, 2015) و اسانس‌های استخراج شده در درمای ۵ درجه سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شدند. برای تعیین ترکیبات موجود در اسانس‌ها از

دستگاه GC/MS (گازکروماتوگرافی همراه با طیف سنجی جرمی) استفاده گردید به این صورت که اسانس‌ها به دستگاه GC/MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیبات آن‌ها تعیین گردید. درصد هرترکیب با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC با روش نرمال کردن سطح منحنی بدون محاسبه عامل تصحیح صورت گرفت (Adams, 2007).

تهیه محیط کشت اختصاصی جهت جداسازی جدایه‌های *B. cinerea* از بافت آلوده انگور

مقدار ۱ گرم NaNO3، ۱/۲ گرم K2HPO4، ۰/۲ گرم MgSO4. 7H2O، ۰/۱۵ گرم KCl و ۲۵ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر حل و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتیگراد آتوکلاو گردید. پس از سرد شدن محیط کشت تا حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد در شرایط استریل، مقدار ۰/۰۱۵ گرم PCNB، ۰/۰۱ گرم Maneb، ۰/۰۵ گرم Chloramphenicol، ۲/۲ گرم CuSO4 و ۵ میلی‌لیتر Tannic acid به آن اضافه گردیده و pH محیط با افزودن NaOH به ۴/۵ رسانده شد (Kritzman and Netzer, 1978).

جداسازی قارچ عامل بیماری

نمونه‌های میوه انگور رقم سرخ فخری (شاهرودی) مشکوک به پوسیدگی خاکستری از مزارع و سردخانه‌های شاهرود و حومه جمع‌آوری شده و در درون کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل گردید. نمونه‌ها نخست با آب معمولی شسته شده و پس از خشک شدن از آن‌ها قطعات کوچکی از مرز بین بافت سالم و آلوده جدا گردیده و با محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ به مدت ۳۰ ثانیه ضد عفونی گردید و سپس سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند تا بقایای هیپوکلرید سدیم از آن‌ها زدوده شود. پس از خشک کردن قطعات آلوده در لابلای کاغذ صافی سترون در زیر هود استریل، تعدادی از این قطعات در داخل ظروف پتری حاوی محیط کشت اختصاصی بوتریتیس (Kritzman and Netzer, 1978) کشت داده شده و به مدت ۳ تا ۴ روز در درون انکوباتور در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. سپس با استفاده از روش نوک هیف از حاشیه رشد قارچ جوان جهت خالص‌سازی به محیط کشت اسیدی شده PDA اقدام گردید. ظروف پتری خالص‌سازی شده برای رشد قارچ عامل بیماری مجددا در درون انکوباتور در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و پس از یک هفته با انتقال به درون لوله‌های آزمایش برای آزمایشات بعدی در درون یخچال و دمای ۵ درجه سانتی‌گراد نگهداشته شد.

آزمون بیماری‌زایی

آزمون بیماری‌زایی بدون ایجاد زخم

نخست با استفاده از اسکالپل سترون اسپورهای قارچ از روی محیط کشت ۱۰ تا ۱۲ روزه جمع آوری و در درون ارلن حاوی آب مقطر استریل قرار داده شد. جهت یکنواخت شدن محلول اسپوری ارلن به مدت ۱۵ دقیقه بر روی دستگاه شیکر قرار داده و پس از آن با استفاده از هموسایتومتر، غلظت محلول اسپوری قارچ عامل بیماری به 10^5 اسپور در میلی‌لیتر رسانده شد. پس از آن قطراتی از محلول اسپوری بر روی دانه‌های انگور رقم سرخ فخری که قبلا با الکل ۷۰ درصد ضدعفونی شده بودند و در درون دسیکاتور سترون قرار داشتند، قرار داده شد و تا ظهور علائم و در دمای اتاق روزانه مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون بیماری‌زایی با ایجاد زخم

در این رابطه تمامی مراحل مشابه بالا اعمال گردید با این تفاوت که قبل از قرار دادن قطراتی از محلول سوسپانسیون قارچ *B. cinerea* برروی دانه‌های انگور، با سوزن سترون خراش‌های کوچکی برروی

آن‌ها ایجاد شد. دانه‌های انگور مایه‌زنی شده تماما در شرایط رطوبتی در درون دسیکاتور سترون و در دمای اتاق قرار داده شده و جهت ظهور علائم بیماری روزانه مورد بررسی قرار گرفتند. پس از ظهور علائم پوسیدگی خاکستری نسبت به جداسازی مجدد قارچ عامل بیماری و شناسایی آن از روی کلیدهای شناسایی معتبر اقدام گردید (Beever and Weeds, 2004).

بررسی تاثیر اسانس‌های گیاهی بر رشد پرگنه قارچ *B. cinerea*

جهت ارزیابی میزان تاثیر غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌امی اسانس‌های مورد آزمایش در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ *B. cinerea* از روش اختلاط اسانس با محیط کشت (poisoned food technique) استفاده شد (Soylu *et al.*, 2010). در این ارتباط پس از رسیدن دمای محیط کشت سترون شده PDA به حدود ۵۰ درجه سانتی‌گراد، در زیر هود استریل مقدار مورد نیاز از محلول استاندارد اسانس‌ها برای تهیه غلظت مورد نظر به فلاسک‌های حاوی محیط کشت اضافه گردیده و به آرامی تکان داده شدند. برای اختلاط کامل اسانس‌های روغنی با محیط کشت، مقدار ۰/۵ ٪ از ماده Tween-80 نیز به فلاسک‌ها اضافه و به آرامی تکان داده شدند. سپس مقدار ۱۵ میلی‌لیتر از محیط کشت آماده شده درون ظروف پتری ریخته و پس از سرد شدن با استفاده از کورک بورر استریل از کناره-های کشت ۷ روزه قارچ قرص‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر جدا و در مرکز ظروف پتری قرار داده شدند. برای شاهد از محیط کشت حاوی Tween-80 بدون اسانس استفاده شد. برای هر تیمار تعداد ۳ ظرف پتری در نظر گرفته شده و ظروف مذکور در درون انکوباتور در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از ۶ روز که ظروف پتری شاهد از رشد قارچ کاملا پوشانیده شد، رشد پرگنه این قارچ در تیمارهای مختلف (کمترین و بیشترین قطر) اندازه گیری و یادداشت گردید.

بررسی تاثیر اسانس‌های گیاهی بر روی جوانه‌زنی و رشد لوله تندش اسپور *B. cinerea*

در این آزمایش از روش سنجش جوانه‌زنی اسپور (Spore germination assay) استفاده شد (Soylu *et al.*, 2010)، بدین صورت که لایه نازکی از محیط کشت حاوی نسبت‌های مورد نظر از اسانس‌ها و Tween-80 (۰/۵ ٪) در شرایط سترون درون ظروف پتری ریخته شد و پس از سرد شدن با استفاده از میکروپیپت مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محلول اسپوری *B. cinerea* به غلظت 10^4 اسپور در میلی‌لیتر به هر کدام از ظروف پتری اضافه شد. پس از آن ظروف پتری در درون انکوباتور در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و پس از ۱۲ ساعت برای متوقف نمودن جوانه‌زنی و رشد لوله تندش اسپورها و اندازه‌گیری دقیق، ۳ قطره از محلول لاکتوفنل به ظروف پتری اضافه گردید. پس از آن جهت تعیین درصد جوانه‌زنی به صورت تصادفی از هر کدام از ظروف پتری تعداد ۱۰۰ اسپور در زیر میکروسکوپ مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین درصد میزان رشد لوله تندش اسپورها با استفاده از لام مدرج در زیر میکروسکوپ با بزرگنمایی 10X به صورت تصادفی لوله تندش ۲۰ اسپور اندازه‌گیری و یادداشت گردید. برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و به محیط کشت شاهد تنها ماده Tween-80 اضافه گردید.

تجزیه داده‌های حاصل از آزمایشات:

آزمایشات در قالب طرح کاملا تصادفی با ۱۶ تیمار و سه تکرار انجام شد (جدول ۱). داده‌ها با استفاده از برنامه آماری Mstat-C تجزیه واریانس گردیده و میانگین تیمارها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۱ و ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند.

جدول ۱ – تیمارهای استفاده شده به همراه شماره و غلظت مربوطه به تفکیک.

Table 1. Treatments along with their code number and their applied concentrations.

Treatment code No.	Essential oil	Concentration (ppm)	Treatment code No.	Essential oil	Concentration (ppm)
1	Wild marjoram	200	9	Fennel	600
2	Wild marjoram	400	10	Wormwood	200
3	Wild marjoram	600	11	Wormwood	400
4	Savory	200	12	Wormwood	600
5	Savory	400	13	Rosemary	200
6	Savory	600	14	Rosemary	400
7	Fennel	200	15	Rosemary	600
8	Fennel	400	16	Control	------

نتایج:

استخراج ترکیبات اصلی موجود در اسانس‌ها

برای انجام آزمایشات از اسانس‌های خالص آویشن شیرازی، مرزه، رازیانه، درمنه و رزماری که توسط شرکت داروسازی باریج اسانس (کاشان) ارسال گردیده بود به عنوان محلول ۱۰۰٪ استفاده شد. درصد ترکیبات اصلی موجود در آن‌ها پس از استخراج توسط بخش تحقیقات گیاهان دارویی شرکت مذکور به تفکیک تعیین گردید (جدول ۲).

جدول ۲- لیست اسانس‌های مورد استفاده در آزمایشات و درصد ترکیبات اصلی آن‌ها.

Table 2.List of essential oils tested and the percentage of their main corresponding compounds.

Name of the essential oil	Scientific name	Compound (%)
Wild marjoram	*Zataria multifolia*	Thymol: 31.10, Thymol + Carvacrol: 58.59
Savory	*Satureja hortensis*	Carvacrol: 50.46
Fennel	*Foeniculum vulgare*	Anethole: 71.02
Wormwood	*Artemisia sieberi*	α-Thujon: 41.02, β-Thujon: 11.24
Rosemary	*Rosmarinus officinalis*	α-Pinene: 20.80, β-Pinene: 6.06, Limonene: 4.68, Cineole: 20.77

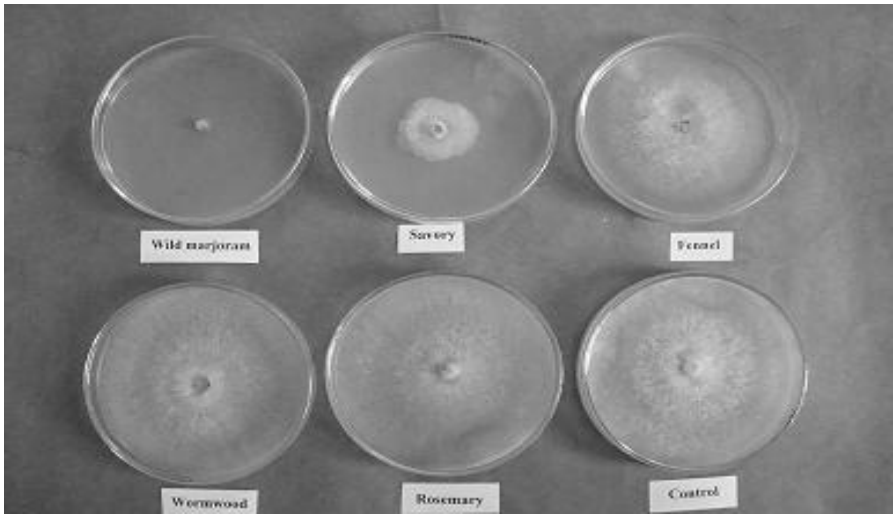
تهیه قارچ عامل بیماری و آزمون بیماری‌زایی

از آن جهت که غالبا قارچ عامل پوسیدگی خاکستری انگور برای ورود به میزبان و ایجاد پوسیدگی نیاز به مدخل ورود و یا زخم دارد بنابراین در آزمایش بیماری‌زایی بدون ایجاد زخم هیچ‌گونه آلودگی ایجاد نشد لکن تمامی حبه‌های انگور که با سوزن سترون قبل از تلقیح با جدایه‌های بیماری‌زای قارچ عامل بیماری زخمی شده بودند علائم پوسیدگی را از خود با تغییر رنگ بافت میزبان به قهوه‌ای کمرنگ در روزهای نخست و با ایجاد انبوه اسپور به رنگ خاکستری پس از چند روز نشان دادند (شکل ۱). پس از کشت نمونه‌های واجد علائم بیماری بر روی محیط کشت اسیدی شده PDA و خالص‌سازی به روش نوک هیف در درون لوله‌های آزمایش در دمای یخچال برای مطالعات بعد نگهداشته شدند.

شکل ۱- رشد قارچ *B. cinerea* روی حبه‌های انگور رقم عسکری بعد از آزمایش بیماری‌زایی.
Fig 1. Growth of *B. cinerea* on grape berries (Var. Askari) after pathogenicity test.

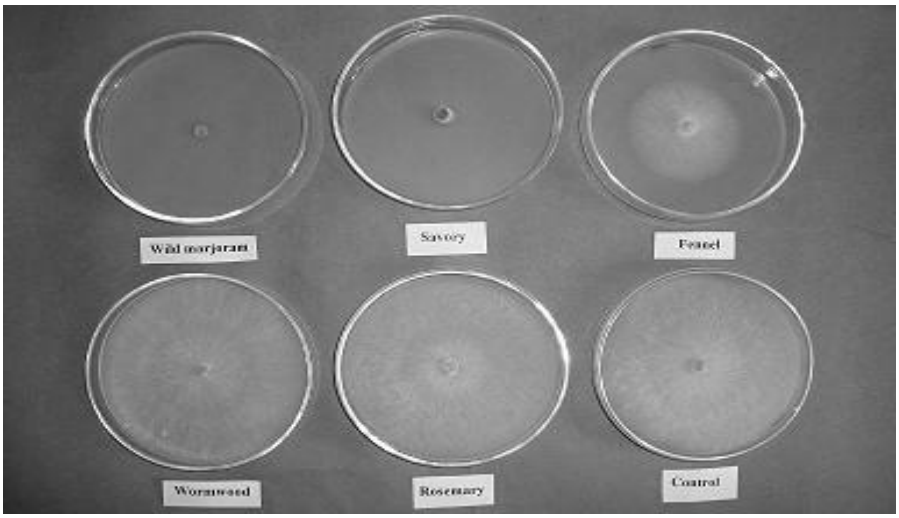
بررسی تاثیر اسانس‌های گیاهی بر روی رشد پرگنه قارچ *B. cinerea*

در آزمایش تاثیر غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌امی اسانس‌ها در جلوگیری از رشد پرگنه قارچ عامل کپک خاکستری انگور، اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با شاهد به طور کامل (۱۰۰٪) از رشد آن جلوگیری نمود. پس از آن تیمار مرزه قرار گرفت که در آن قدری رشد پرگنه‌ای ایجاد شده بود (شکل ۲، جدول ۴). شکل ۳ و جدول ۴ به‌خوبی نشان می‌دهد که غلظت ۴۰۰ پی-پی‌امی مرزه نیز تا ۱۰۰٪ در مقایسه با شاهد از رشد قارچ عامل بیماری جلوگیری نمود. در این مرحله اسانس رازیانه نیز با رشد پرگنه ۵/۵ سانتی‌متری از رشد قارچ مذکور کاست و با شاهد (۹ سانتی‌متر) دارای اختلاف معنی‌دار در سطح آماری ۱٪ بود. در غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌امی، هر سه اسانس آویشن شیرازی، مرزه و رازیانه در مقایسه با شاهد به طور کامل از رشد پرگنه این قارچ جلوگیری نمودند. میزان رشد پرگنه این قارچ در غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌امی اسانس درمنه ۶/۲۰ سانتی‌متر بود که با شاهد در سطح احتمال ۱ درصد دارای اختلاف معنی‌دار بود لکن اسانس رزماری حتی در بیشترین میزان غلظت (۶۰۰ پی‌پی‌ام) با رشد پرگنه ۸/۹ سانتی‌متر خاصیت ضدقارچی نداشت و با شاهد در یک گروه آماری قرار گرفت.



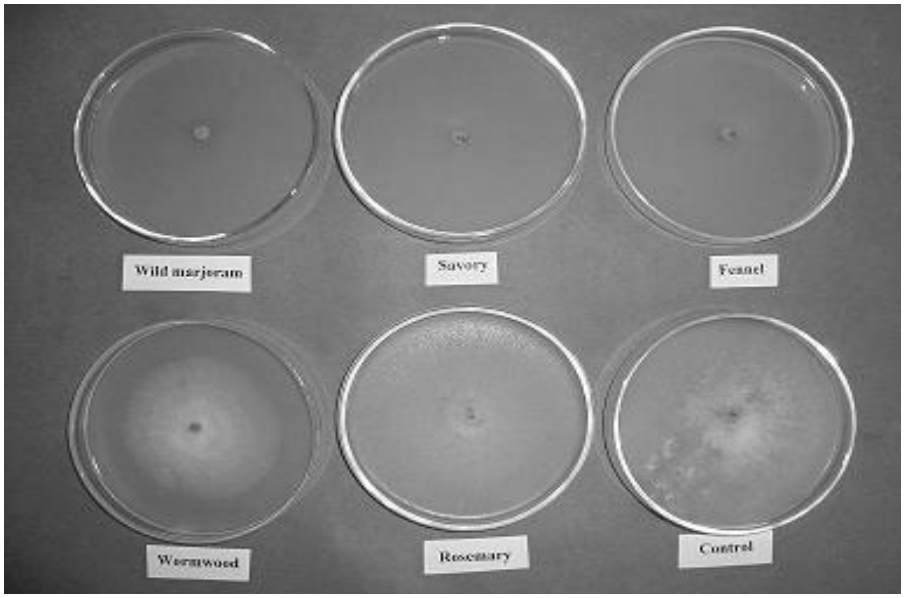
شکل ۲- مقایسه تاثیر اسانس‌ها (۲۰۰ پی‌پی‌ام) بر رشد پرگنه قارچ *B. cinerea* در محیط کشت PDA.

Fig 2. Comparison of the effect of essential oils (200 ppm) on mycelial growth of *B. cinerea* on PDA.



شکل ۳- مقایسه تاثیر اسانس‌ها (۴۰۰ پی‌پی‌ام) بر رشد پرگنه قارچ *B. cinerea* در محیط کشت PDA.

Fig 3. Comparison of the effect of essential oils (400 ppm) on mycelial growth of *B. cinerea* on PDA.

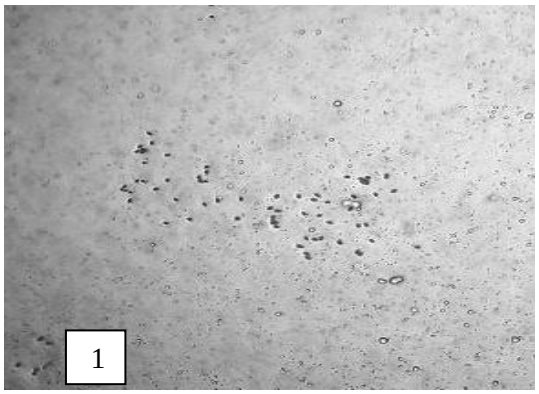


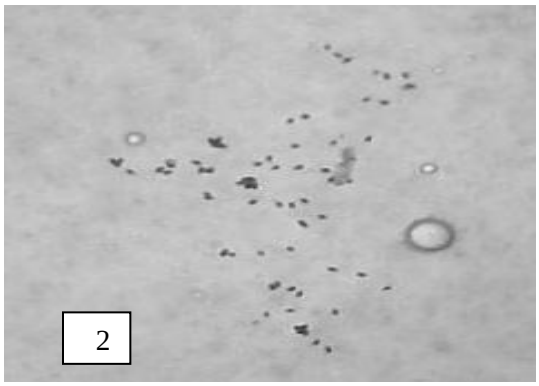
شکل ۴- مقایسه تاثیر اسانس‌ها (۶۰۰ پی‌پی‌ام) بر رشد پرگنه قارچ *B. cinerea* در محیط کشت PDA.

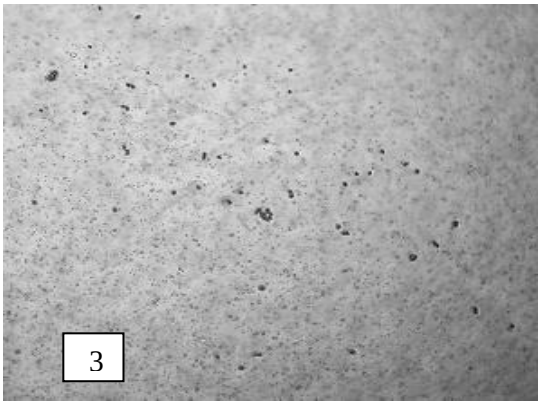
Fig 4. Comparison of the effect of essential oils (600 ppm) on mycelial growth of *B. cinerea* on PDA.

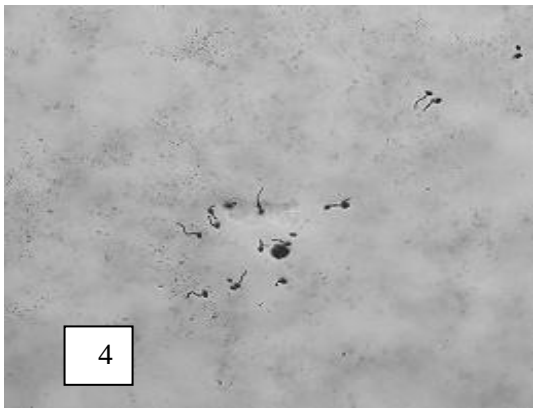
بررسی تاثیر اسانس‌های گیاهی بر جوانه‌زنی و رشد لوله تندش اسپور *B. cinerea*

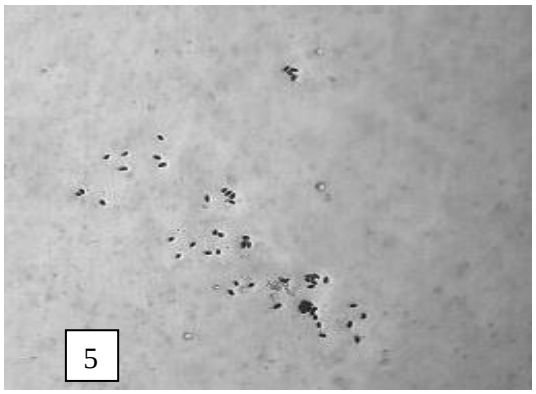
بر اساس نتایج حاصل از این آزمایش، به‌ترتیب اسانس‌های آویشن شیرازیی، مرزه و رازیانه در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام به طور کامل (۱۰۰٪) باعث توقف جوانه‌زنی اسپور و رشد لوله تندش قارچ *B. cinerea* گردیدند. (شکل ۵ و جدول ۴). در این آزمایش اگرچه اسانس‌های درمنه و رزماری در غلظت ۶۰۰ پی‌پی‌ام در سطح آماری ۱درصد با شاهد دارای اختلاف معنی‌دار بودند لکن در مقایسه با سه اسانس ذکر شده فوق خاصیت بازدارندگی قابل قبولی نداشته زیرا که با هیچ‌کدام از آن‌ها در یک گروه آماری مشترک قرار نگرفتند.

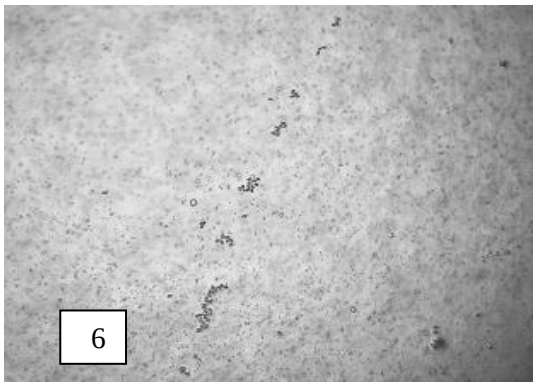

1

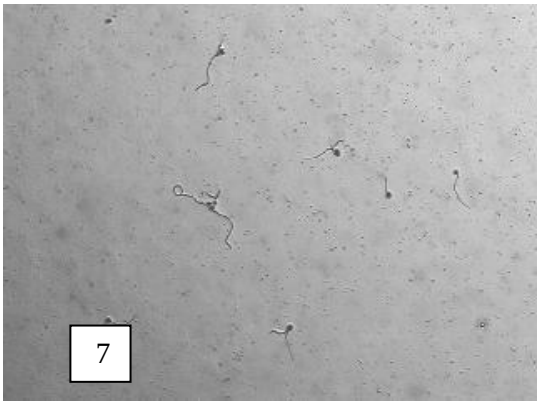

2

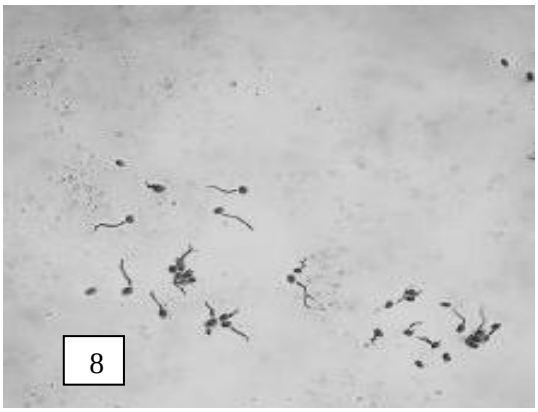

3

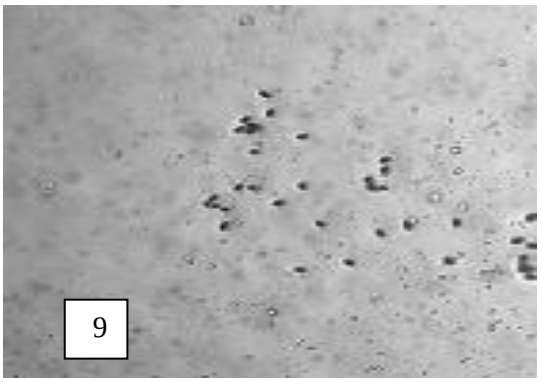

4

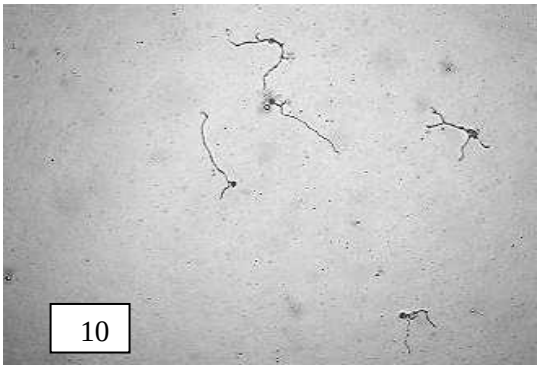

5

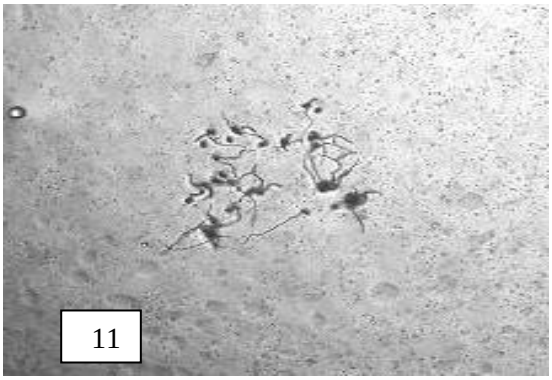

6

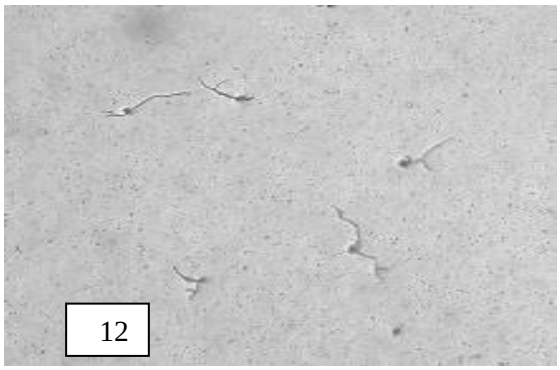

7

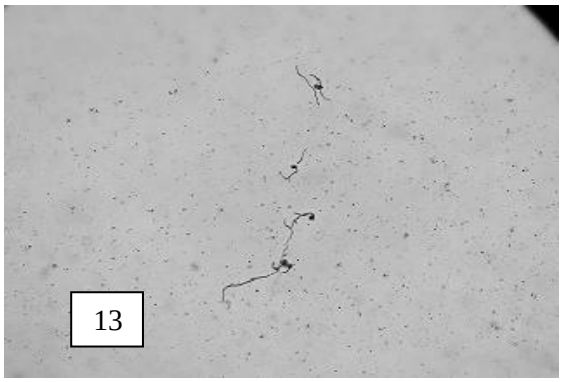

8

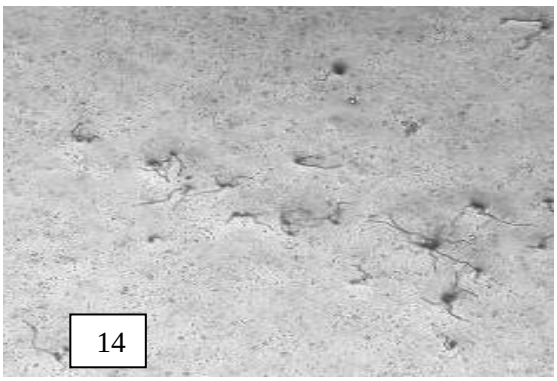

9

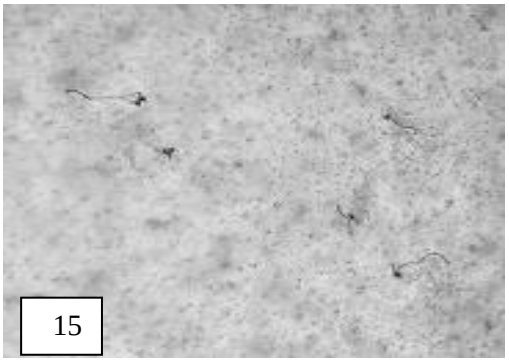

10

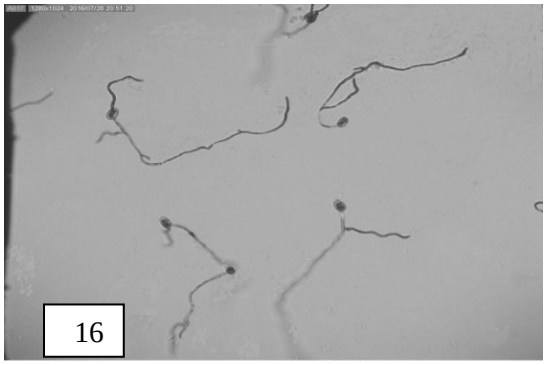

11


12


13


14





شکل ۵- تاثیر تیمارها به‌ترتیب در غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ پی‌پی‌ام بر رشد لوله تندش قارچ *B. cinerea*، در محیط کشت PDA: ۱، ۲ و ۳ (آویشن شیرازی)، ۴، ۵ و۶ (مرزه)، ۷، ۸ و۹ (رازیانه)، ۱۰، ۱۱ و ۱۲(درمنه)، ۱۳، ۱۴ و ۱۵ (رزماری) و ۱۶ (شاهد).

Fig 5. Effect of treatments at 200, 400 and 600 ppm concentrations on germ tube elongation of *B. cinerea* on PDA: 1, 2 and 3 (Wild marjoram), 4, 5 and 6 (Savory), 7, 8 and 9 (fennel), 10, 11 and 12 (wormwood), 13, 14 and 15 (rosemary) and 16 (control) respectively.

جدول ۳ – تجزیه واریانس داده‌های حاصل از تاثیر تیمارها بر رشد پرگنه، درصد جوانه‌زنی و رشد لوله تندش اسپور قارچ *B. cinerea*.

Table 3. Analysis of variance of the data on the effect of treatments on mycelial growth, spore germination and germ tube elongation of *B. cinerea*.

Source	df	Mean square		
		Mycelial growth (cm)	Spore germination (%)	Germ tube length (µ)
Treatment	15	49.968✷✷	5899.443 ✷✷	6907.378 ✷✷
Error	30	0.049	4.022	71.128
Total	47	------	-----	-----
CV	-------	4.68%	3.96%	18.74%

✷✷= معنی دار در سطح آماری ۱٪

✷✷= Significantly different at 1% level

جدول ۴- مقایسه میانگین تاثیر تیمارها بر رشد پرگنه، جوانه‌زنی و رشد لوله تندش قارچ *B. cinerea* در محیط کشت PDA .

Table 4. Comparison of means of the effect of treatments on mycelia growth, spore germination and germ tube elongation of *B. cinerea* on PDA.

Treatment (ppm)	Mean mycelial growth (cm)	Mean spore germination (%)	Mean germ tube length (µ)
Control	9.00 a	100 a	134.33 a
Rosemary-200	9.00 a	100 a	120.00 b
Rosemary- 400	8.96 a	100 a	87.67 d
Wormwood -200	8.90 a	97.00 a	98.67 c
Wormwood- 400	8.90 a	90.00 b	53.33 f
Rosemary -600	8.90 a	90.67 b	73.33 e
Fennel- 200	7.26 b	73.33 c	85.67 d
Wormwood- 600	6.20 c	77.67 c	28.67 g

Fennel- 400	5.50 d	47.33 d	26. 33 g
Savory- 200	3.03 e	35.00 e	13.00 h
Savory- 400	0.00 f	0.00 f	0.00 i
Savory- 600	0.00 f	0.00 f	0.00 i
Fennel- 600	0.00 f	0.00 f	0.00 i
Wild marjoram- 200	0.00 f	0.00 f	0.00 i
Wild marjoram- 400	0.00 f	0.00 f	0.00 i
Wild marjoram- 600	0.00 f	0.00 f	0.00 i

اعداد موجود در هر ستون با حروف متفاوت در سطح احتمال ۱٪ با آزمون LSD دارای اختلاف معنی‌دار می باشند.

Numbers in the same columns followed by different words are significantly different with LSD test (p=0.01)

بحث

تحقیقات فراوان نشان داده است که تیمول (Thymol) و کارواکرول (Carvacrol) جزء موثرترین ترکیبات گیاهی هستند که خاصیت قارچ‌کشی آن‌ها به اثبات رسیده است و آن دسته از گیاهانی که حاوی این مواد هستند خاصیت ضد قارچی مناسبی در مقابل طیف وسیعی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی و آلوده کننده‌های مواد غذایی از خود نشان می‌دهند (Lee *et al*., 2007; Numpaque *et al*., 2011; Shin *et al*., 2014; Villanueva Bermejo *et al*., 2015; Gavaric *et al*., 2015). مکانیزم عمل این ترکیبات به طور کامل مشخص نگردیده است لکن اعتقاد بر این است که آن‌ها قادرند در اعمال حیاتی دیواره سلولی قارچ‌ها اختلال ایجاد کرده و یا باعث از بین رفتن دیواره سلولی آن‌ها شوند (Isman and Machial, 2006).

در این تحقیق اسانس‌های آویشن و مرزه که حاوی ترکیبات فوق الذکر می‌باشند خصوصا اسانس آویشن شیرازی که حاوی هر دو ترکیب می‌باشد خاصیت قارچ‌کشی بسیار مناسبی در کنترل رشد پرگنه، جوانه‌زنی اسپور و همچنین رشد لوله تندش اسپور قارچ *B. cinerea* در محیط کشت PDA از خود نشان دادند، اسانس آویشن شیرازی در کمترین نسبت (۲۰۰ پی‌پی‌ام) به میزان ۱۰۰٪ در این موارد موثر بود. نتایج حاصل از تحقیقات صورت گرفته توسط بسیاری از محققان موید نتایج حاصل از تحقیق حاضر می‌باشد، برای مثال در تحقیقی که با ۲۱ اسانس گیاهی جهت بررسی تاثیر آن‌ها بر جوانه‌زنی اسپورهای *B. cinerea* صورت گرفت، اسانس آویشن (*Thymus capitatus*) با نسبت ۱درصد توانست به طور کامل (۱۰۰٪) از جوانه‌زنی اسپورهای آن جلوگیری نماید، در حالی که اسانس میخک (*Syzygium aromaticum*) بین ۶۷ تا ۹۳٪ و نوعی نعناع استرالیایی (*Prostanthera rotundifolia*) حدود ۶۵ درصد کنترل داشتند (Antonov *et al*., 1997). همچنین از آن‌جا که گروهی دیگر از محققان گزارش کردند که به‌ترتیب غلظت‌های ۳۰ و ۱۲۰ میکروگرم در میلی‌لیتری از ترکیبات تیمول و لینالول به صورت بخار به یک اندازه قادر به جلوگیری از رشد پرگنه و جوانه‌زنی اسپور قارچ *B. cinerea* عامل پوسیدگی خاکستری در ۴ رقم انگور بودند، نسبت یک به چهار برابری ترکیب تیمول به لینالول در این رابطه خود نشانگر خاصیت قارچ‌کشی بهتر ترکیب تیمول می‌باشد (Shin *et al*, 2014). همچنین در تحقیقی که در ارتباط با تاثیر اسانس‌های مرزه، آویشن شیرازی و زنیان در سه غلظت بر رشد کلنی *B. cinerea* عامل پوسیدگی خاکستری توت فرنگی مورد بررسی قرار گرفت این نتیجه حاصل گردید غلظت ۲۰۰ پی‌پی‌امی هر سه اسانس به میزان قابل قبولی در این رابطه موثر بودند (Etemadi *et al*., 2012).

از سوی دیگر نتایج حاصل از تحقیقات ما نشان دهنده کم اثر بودن و یا بی اثر بودن اسانس‌های رزماری و

درمنه در جلوگیری از رشد کلنی و همچنین جوانه زنی اسپور عامل پوسیدگی انگور بود. این نتایج نیز با یافته های برخی از محققان مطابقت دارد زیرا در یکی از این تحقیقات، زمانی‌که تعدادی از عصاره‌های گیاهی از جمله مرزه ، نعناع، سیر، درمنه و رزماری را در غلظت های ۵، ۱۰ و ۲۰٪ در کنترل *B. cinerea* عامل پوسیدگی انگور سیاه مورد آزمایش قرار گرفتند این نتیجه حاصل گردید که عصاره‌های مرزه، سیر و نعناع در غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ درصد توانستند بین ۸۰ تا ۱۰۰درصد از رشد این قارچ جلوگیری نمایند در حالی که عصاره‌های درمنه و رزماری حتی در غلظت ۲۰ درصد نیز هیچ‌گونه قابلیت بازدارندگی این قارچ را نداشتند (Sesan *et al*., 2015). همچنین در ایران گروهی از محققان ادعا نمودند که اسانس جوانه میخک به صورت بخار برای کنترل قارچ *B. cinerea* در سردخانه بر اسانس رزماری ارجحیت داشته و هیچ-گونه گیاه‌سوزی در حبه‌های انگور ایجاد نمی‌کند (Vesaltalab *et al*., 2012). تنها در یک مورد از منابع یافت شده، گزارش گردیده است که اسانس‌های آویشن و رزماری در کنترل رشد قارچ *B. cinerea* به یک اندازه موثر بوده‌اند (Mermer-Dogu and Zobar, 2014)، که این نتیجه با یافته‌های ما مطابقت ندارد.

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق از میان ۵ اسانس مورد آزمایش، اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه خاصیت ضد قارچی قابل قبولی در کنترل قارچ *B. cinerea* از خود نشان دادند. در حال حاضر برای کنترل بیماری پوسیدگی خاکستری انگور که قادر است حتی در دمای نزدیک به صفر درجه سانتی‌گراد نیز رشد نماید در سردخانه‌ها از مقادیر بسیار زیاد گوگرد به صورت دود استفاده می‌شود که علاوه بر مضرات زیست محیطی برای مصرف‌کننده نیز خالی از خطر نیست. با توجه به اینکه براساس نتایج حاصل از این تحقیق اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه خاصیت کنترل کنندگی مناسبی علیه این قارچ از خود نشان دادند، بنابراین می‌توان با تهیه فرمولاسیون‌های مناسب آن‌ها، از آن‌ها به عنوان جایگزینی بی‌خطر برای گوگرد درکاهش ضایعات ناشی از این بیماری در سردخانه‌ها و همچنین تولید محصولات سالم‌تر در خصوص انگور استفاده نمود.

References:

Ahmady, K., Gholizadeh, H., Ebadzadeh, H. R., Hosseinpour, R., Hatami, F., Abdeshah, H., Rezaee, M. M., Kazemifard, R. and Fazli-Estabragh, M. 2015. Agricultural statistics. Jihad-e-Keshavarzi publication. Center of collection of communications and Informations. Horticultural products for 2014. 147 pp. [In Persian with English Abstract].

Adams, R. P. 2007. Identification of essential oil components by gas chromatography /mass spectroscopy. Allured Publishing. Carol Stream. USA. 804 pp.

Antonov, A. Stewart, A. and Walter, M. 1998. Inhibition of conidium germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by natural products. Journal of Food Microbiology. 23: 13-33.

Beever, R. E. and Weeds, P. L. 2004. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. pp. 9-52. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. (eds.), Botrytis, Biology, Pathology and Controls. Kluwer Academic Publisher. The Netherlands.

Behdani, M., Pooyan, M. and Abbasi, S. 2012. Evaluation of antifungal activity of some medicinal plant essential oils against *Botrytis cinerea*, causal agent of postharvest apple rot, *in vitro*. International Journal of Agriculture and Crop Sciences. 4(14): 1012-1016.

Aronson, J. K., Ahmed, M., Granell-Villen, M. B., Moss, G. P. and Thorpe, R. 2015. British Pharmacopoeia. Commission Secretariat of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency. Official collection of standards for UK medicinal

products and pharmaceutical substances. UK. [Accessed on *https://www. Pharma copoeia.com/ the- bp-Commission]*

Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N. 2007. *Botrytis*: Biology, Pathology and Control. Springer, The Netherlands. pp. 393.

Etemadi, N. A., Behdad, M. and Zeinali, H. 2012. Antifungal effects of three plant essential oils against *Botrytis cinerea*: The cause of gray mold on strawberry. Journal of Research in Agricultural Science. 8(2): 165-170.

Fawcett, C. H. and Spencer, D. M. 1966. Antifungal phenolic acids in apple fruits after infection with *Sclerotinia fructigena*. Annals of Applied Biology. 60: 87-96.

Gavaric, N., Mozina, S. S., Kladar, N. and Bozin, B. 2015. Chemical profile, antioxidant and antibacterial activity of Thyme and Oregano essential oils, Thymol and Carvacrol and their possible synergism. Journal of Essential Oil Bearing Plants. 18(4): 1013-1021.

Ghafari, Z., Kazemi Ghahfarokhi, N. and Rahimi, E. 2011. Presence of ochratoxin a in red and white grape juice commercialized in Iran. American-Eurasian Journal of Toxicological Sciences. 3(4): 228-230.

Isman, M. B. and Machial, C. M. 2006. Pesticides based on plant essential oils: From traditional practice to commercialization. pp. 29-44. In: Rai, M. and Carpinella, M.C. (eds.), naturally occurring bioactive compounds. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Jalili-Marandi, R., Hassani, A., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Pirzad, A. and Sefidkon, F. 2010. *Thymus kotschyanus* and *Carum copticum* essential oils as botanical preservatives for table grape. Journal of Medicinal Plants Research. 4(22): 2424-2430.

Kritzman, G. and Netzer, D. 1978. A selective medium for isolation and identification of *Botrytis* spp. from soil and onion seed. Phytoparasitica. 6: 3-7.

Lee, S. O., Choi, G. J., Jang, K. S., Lim, H. K. Cho, K. Y. and Kim, J. C. 2007. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. Plant Pathology Journal. 23(2): 97-102.

Mermer Dogu, D. and Zobar, D. 2014. Effects of some plant essential oils against *Botrytis cinerea* and *Tetranychus urticae* on grapevine.Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences .Special Issue. 1: 1268–1273.

Numpaque, M. A., Oviedo, L. A., Gil, J. H., García, C. M. and Durango, D. L. 2011. Thymol and carvacrol: biotransformation and antifungal activity against the plant pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Botryodiplodia theobromae*. Tropical Plant Pathology. 36 (1): 3-13.

Sesan, T. E., Enache, E., Iacomi, B. M., Oprea, M., Oancea, F. and Iacomi, C. 2015. Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* Pers. In the Blackcurrant crop (*Ribes nigrum* L.). Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus. 14(1): 29-43.

Shin, M. H., Kim, J. H., Choi, H. W., Keum Y. S. and Chum S. C. 2014. Effect of Thymol and Linalool fumigation on postharvest diseases of table grapes. Mycobiology. 42(3): 262–268.

Sirirat, S., Wimolpun, R. and Sanit. S. 2009. Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plants against grey mould (*botrytis cinerea*). Asian Journal of Food and Agro- Industry. Special Issue. S229-S233.

Soylu, E. M., Kurt, S. and Soylu, S. 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology. 143(3): 183-189.

Vesaltalab, Z., Gholami, M. and Zafari, D. M. 2012. Clove buds (*Eugenia caryophyllata*) and Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oils effects on control of grapes gray mold *in-vitro*. Annals of Biological Research. 3 (5): 2447-2453.

Villanueva-Bermejo, D., Angelov, I., Vicente, G., Stateva, R. P., Rodriguez García-Risco, M., Reglero, G., Ibañez, E. and Fornari, T. 2015. Extraction of thymol from different varieties of thyme plants using green solvents. Journal of Science of Food and Agriculture. 95(14): 2901-290.

Investigation on the Antifungal Potential of Thymol and Carvacrol Bearing Plants in Controlling *Botrytis cinerea*, the Causal Agent of Grape Gray Rot

Zaker, M.*[1], Bouland Nazar, A. R.[2] and Mohammadi, A. R.[3]

1. Plant Protection Research Department, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province, AREEO, Shahroud, Iran. 2. Barij Medicinal Plants Research Center, Barij Essence Pharmaceutical Co., Kashan, Iran. 3. Seed and Plants Improvement Research Department, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province, AREEO, Shahroud, Iran.

Received: July, 24, 2016 Accepted: Dec, 26, 2017

Abstract

During the last several decades the efficacy of plant extracts and essential oils in controlling plant diseases specially those of leaf spots and fruit rots have raised the interest of many researchers worldwide. Several findings have approved the antifungal potential of plant products containing Thymol and Carvacrol compounds against a wide range of plant fungal diseases including grape gray rot. *Botrytis cinerea*, the causal agent of grape gray rot has a wide host range and can cause severe loss in the field and during storage. In this study the antifungal efficacy of five essential oils, ie: Wild marjoram, Savory, Fennel, Wormwood and Rosemary were evaluated at three concentrations 200, 400 and 600 ppm on mycelia growth, spore germination and germ tube elongation of *B. cinerea* under laboratory conditions. Results indicate that Wild marjoram, Savory and Fennel at 200, 400 and 600 ppm could completely (100%) inhibit the mycelia growth as well as spore germination of this fungus respectively, while Wormwood and Rosemary had either very little or no effect on this fungus . Results also approve that Wild marjoram and Savory essential oils which contain Thymol and Carvacrol compounds, specially the first one containing both the compounds showed the highest antifungal activity against *B. cinerea*.

Keywords: Antifungal potential, essential oils, grape, gray rot.

***Corresponding author:** Masoud Zaker, Email: masoudzaker35@gmail.com