دانش بیماری‌شناسی گیاهی (شاپای ا: ۶۲۹۰-۲۵۸۸، شاپای چ: ۹۲۷۰-۲۲۵۱)
سال یازدهم، جلد ۱، پاییز و زمستان ۱۴۰۰
Plant Pathology Science (eISSN:2588-6290, pISSN:2251-9270)
Vol. 11(1), 2022

Research Article

Effect of myrtle essential oil, chitosan and thiabendazole fungicide on citrus green mold

Safarali Mahdian✉, Amir Ramzani Domirkolaei, Mohammad Tajik Ghanbari
Department of Plant Protection, Sari Agricultural and Natural Resources University, Sari, Iran

Received: 10.29.2021 Accepted: 04.09.2022

Mahdian S, Ramzani Domirkolaei A, Tajik Ghanbari M (2022) Effect of myrtle essential oil, chitosan and thiabendazole fungicide on citrus green mold. Plant Pathology Science 11(1):74-88. Doi: 10.2982/PPS.11.1.74.

Abstract

Introduction: Green mold (*Penicillium digitatum*) is one of the most important post-harvest pathogens of citrus fruits. Tens of thousands of citrus fruits are often destroyed by green mold in Iran every year. The use of chemical toxins to control the disease, in addition to negative environmental effects, leads to the selection of fungal-resistant populations and also endangers consumer health, so non-chemical control of the pathogen has become an important goal of researchers in recent years. **Materials and Methods:** The essential oil components of myrtle (*Myrtus communis* L.) were extracted with a Clevenger apparatus and their compounds were identified with a gas chromatography apparatus with a mass spectrometer. The inhibitory effect of myrtle essential oil and the fungicides chitosan and thiabendazole on spore germination and colony growth was investigated by mixing with PDA and PDB under laboratory conditions and by impregnating the fruit surface during storage. **Results:** Thirteen compounds were identified in myrtle essential oil, which was quantitatively the highest compound 1-8 cineole. Myrtle essential oil at a concentration of 1700 ppm and chitosan at a concentration of 500 ppm inhibited 100% of fungal colony growth, as did the fungicide thiabendazole. **Conclusion:** It is possible to use myrtle essential oil or chitosan as an alternative to the fungicide thiabendazole to control citrus green mold.

Keywords: Chitosan, Citrus, Fruit rot, *Penicillium digitatum*

✉ Corresponding author: safaralim@gmail.com

مقاله پژوهشی

اثر اسانس مورد، کیتوزان و قارچکش تیابندازول بر کپک سبز مرکبات

صفرعلی مهدیان✉، امیر رمضانی دومیرکلایی، محمدعلی تاجیک قنبری
گروه گیاه‌پزشکی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۰۷ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۰

مهدیان ص، رمضانی دومیرکلایی ا و تاجیک قنبری م ع (۱۴۰۰) اثر اسانس مورد، کیتوزان و قارچکش تیابندازول بر کپک سبز مرکبات. دانش بیماری‌شناسی گیاهی ۱۱(۱): ۸۸-۷۴.
Doi: 10.2982/PPS.11.1.74.

چکیده

مقدمه: کپک سبز (*Penicillium digitatum*) از مهم‌ترین بیمارگرهای پس از برداشت میوه مرکبات است. سالانه ده‌ها هزار تن از محصول مرکبات اغلب به وسیله کپک سبز در ایران از بین می‌رود. استفاده از سمهای شیمیایی برای مدیریت بیماری ضمن داشتن اثر سوء زیست‌محیطی موجب انتخاب جمعیت مقاوم قارچ می‌گردد و نیز سلامت مصرف کننده را به خطر می‌اندازد، بنابراین مهار غیرشیمیایی بیمارگر هدف مهم پژوهشگران در سالهای اخیر شده است. **مواد و روش‌ها:** اجزای اسانس مورد (*Myrtus communis* L.) به وسیله دستگاه کلونجر استخراج و ترکیبات آن با دستگاه گاز کروماتوگرافی همراه با طیف‌سنج جرمی مورد شناسایی قرار گرفتند. اثر بازدارندگی از رشد پرگنه و جوانه‌زنی هاگ قارچ توسط اسانس مورد، کیتوزان و قارچکش تیابندازول به روش اختلاط آنها با محیط کشت PDA و PDB در آزمایشگاه و در انبار به روش آغشتگی سطحی میوه بررسی شد. **یافته‌ها:** سیزده ترکیب در اسانس مورد شناسایی شدند، که از نظر کمی بیشترین ترکیب ۱-۸ سینئول بود. اسانس گیاه مورد در غلظت ۱۷۰۰ قسمت در میلیون و کیتوزان در غلظت ۵۰۰ قسمت در میلیون، همانند قارچکش تیابندازول باعث بازدارندگی ۱۰۰ درصدی از رشد کلنی قارچ شدند. **نتیجه‌گیری:** استفاده از اسانس مورد یا کیتوزان به عنوان یک جایگزین قارچکش تیابندازول برای مبارزه با کپک سبز مرکبات امکان‌پذیر است.

واژگان کلیدی: پوسیدگی میوه، کیتوزان، مرکبات، *Penicillium digitatum*

مقدمه Introduction

کاهش پوسیدگیهای پس از برداشت محصولات غذایی به عنوان یک هدف مهم در بسیاری از سازمان‌های بین‌المللی و دولتی پیگیری می‌شود. قارچ *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. عامل کپک سبز از مهم‌ترین بیمارگرهای پس از برداشت میوه مرکبات است. این بیمارگر، میوه را در باغ،

✉ نویسنده مسئول: safaralim@gmail.com

کارخانه بسته‌بندی یا در طول نگهداری، ذخیره‌سازی و انبارداری آلوده می‌کند. زاد مایه عامل بیماری در طول فصل در سطح میوه وجود دارد و بعد از برداشت می‌تواند به جمعیت بالایی برسد، مگر اینکه اقدام‌های بهداشتی مناسب اتخاذ شود (Kanetis et al. 2007). ترکیباتی که به‌طور متداول برای تشکیل پوشش‌های خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل نشاسته، سلولز، آلژینات، زئین، گلوتن، کیتوزان، پکتین و سایر صمغ‌ها هستند (Fattahi Moghaddam and Eshcovarian 2013).

کیتین $(C_8H_{13}O_5N)_n$ از فراوان‌ترین بیوپلیمرها بعد از سلولز است. این پلی‌ساکارید طبیعی عمدتاً در پوسته سخت‌پوستانی مانند خرچنگ و میگو، کوتیکول حشرات و دیواره سلولی قارچ‌ها یافت می‌شود. کیتوزان با نام علمی (Poly (β-D(1-4)-2-amino-2-deoxy-α-glucan پس از دِاستیله شدن کیتین به دست می‌آید. شواهد قوی وجود دارد که نشان می‌دهد مخلوط کیتوزان با محیط کشت قارچ از رشد میسلیومی آن بازداری نموده یا آن را به عقب می‌اندازد. به عنوان مثال، با افزایش غلظت کیتوزان از ۰/۷۵ به ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رشد شعاعی قارچ‌های *Colletotrichum gloeosporioides*، *Botrytis cinerea*، *Alternaria altarnata* و *Rhizopus stolonifer* کاهش یافت (ElGhaouth et al. 1992). مطالعات متعدد نشان داده است که کیتوزان می‌تواند به طور مستقیم باعث مهار جوانه‌زنی هاگ و لوله تندش بسیاری از قارچ‌ها مانند *Botrytis cinerea* و *Rhizopus stolonifer* (ElGhaouth et al. 1992)، *Fusarium solani* و *Sclerotium rolfsii* (Eweis et al. 2006) و *Penicililum* sp. (Chien and Chou 2006) شود. از آنجایی که کیتوزان خوراکی است می‌تواند جایگزین مناسبی برای پوشش‌های متداول میوه که از منابع نفتی به دست می‌آیند، باشد. گیاه مورد یا مورت (*Myrtus communis* L.) از تیره *Myrtaceae* به صورت درختچه‌ای، به ارتفاع حداکثر ۵ متر، با برگ‌های ساده متقابل بدون رگبرگ، گل‌های منفرد و دارای حداقل ۱/۵ درصد حجمی اسانس به رنگ زرد کم‌رنگ است. علاوه بر اسانس، ترکیبات فلاونویید، تانن و ویتامین C در برگ این گیاه وجود دارد (Aeinechi 2001). استفاده از اسانس برگ گیاه مورد برای مهار قارچ‌های بیمارگر در گزارش .et al Mohammadi (2008) توصیه شده است. قارچ‌کش‌های شیمیایی مانند تیابندازول، ایمازالیل، سدیم ارتوفنیل فنات، پیری میتانیل یا آمیزه‌های متفاوت این ترکیبات، ابزار اصلی مهار کردن بیماری‌های پس از برداشت مرکبات هستند (Ismail and Zhang 2004). با توجه به تمایل مصرف‌کنندگان برای جایگزین‌های طبیعی به‌جای قارچ‌کش‌هایی با پایه شیمیایی، اخیراً توجه بیشتری به استفاده از فرآورده‌های گیاهی به عنوان قارچ‌کش‌های مشتق شده گیاهی در مدیریت بیماری‌ها معطوف شده است. فعالیت ضد قارچی اسانس‌ها نشان می‌دهد که می‌توان از آن‌ها به عنوان جایگزین قارچ‌کش‌های شیمیایی برای مهار بیمارگرهای پس از برداشت میوه‌ها استفاده کرد. در این تحقیق اثر کیتوزان و

اسانس مورد در مقایسه با قارچ‌کش تیابندازول روی بازدارندگی رشد پرگنه و جوانه‌زنی هاگ قارچ *P. digitatum* عامل کپک سبز مرکبات در شرایط آزمایشگاهی و انبار مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها Material and Methods

جدایه *Penicillium digitatum* از کلکسیون موسسه گیاه‌پزشکی کشور (کد IRAN1037C) دریافت گردید. تجدید کشت آن انجام شد و بیماری‌زایی آن روی میوه پرتقال رقم تامسون به اثبات رسید. کیتوزان با وزن مولکولی پایین و درجه استیلاسیون ۷۷ درصد از بازار خریداری شد. محلول پایه کیتوزان ساخته شد و سترون گردید و محلول ۲٪ آن ساخته شد. قارچ‌کش تیابندازول تجارتی پودر وتابل ۶۰ درصد (Thiabendazol WP 60%) از بازار خریداری گردید.

تهیه اسانس مورد و شناسایی ترکیبهای آن

برگ‌های گیاه مورد جمع‌آوری و در شرایط طبیعی و به دور از نور مستقیم خورشید خشک و به وسیله آسیاب خرد گردید. مقدار ۷۵ گرم از آن اسانس گیری شد و فاز آبی و فاز روغنی جدا گردیدند. برای تهیه محلول پایه اسانس، دو میلی‌لیتر اسانس با دو میلی‌لیتر توین ۲۰ حل گردید و با آب مقطر سترون به حجم ۲۰ میلی‌لیتر رسانده شد و محلول پایه PPM ۱۰۰۰۰۰ تهیه گردید. برای شناسایی ترکیبات اسانس مورد، از دستگاه کروماتوگراف گازی با طیف‌سنج جرمی (GC-MS Agilent Technologies)، مجهز به ستون HPS به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت لایه فاز ساکن برابر ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. درصد نسبی هر کدام از ترکیب‌های تشکیل‌دهنده با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام به دست آمد. نرم‌افزار NIST در آنالیز دستگاه مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی اثر تیمارها روی رشد پرگنه قارچ

به منظور بررسی اثر کیتوزان غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ پی پی‌ام در دمای ۴۰ درجه سلسیوس با محیط کشت PDA مخلوط و در تشتک‌های پتری توزیع شد. در بررسی اثر اسانس مورد از محلول پایه آن، غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۱۷۰۰ پی پی‌ام تهیه گردید و به ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA سترون اضافه و به خوبی یکنواخت گردید. این محلول قبل از منعقد شدن در پنج تشتک پتری توزیع گردید. جهت بررسی اثر قارچ‌کش تیابندازول روی رشد پرگنه، غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ پی پی‌ام تیابندازول به محیط کشت PDA سترون در دمای ۴۰ درجه سلسیوس اضافه شد و پس از تکاندن و یکنواخت شدن در تشتک پتری توزیع گردید (Simon 2008). یک قرص پنج میلی‌متری از کشت جوان قارچ *P. digitatum* در مرکز تشتک پتری حاوی

تیمارهای مورد نظر مایه‌زنی گردید. رشد رویشی هاله اطراف قرص قارچی بعد از هر ۲۴ ساعت با خط‌کش در دو جهت عمود بر هم اندازه‌گیری شد. هر تیمار پنج تکرار داشت و درصد بازدارندگی تیمارهای مختلف پس از تصحیح با رابطه ۱ به دست آمد (Abbott 1925).

$$\mathbf{IP} = \frac{\mathbf{C-T}}{\mathbf{C}} \times \mathbf{100}$$

که در آن؛ IP = درصد بازدارندگی، C = میانگین قطر رشد هاله قارچ در تیمار شاهد، T = میانگین قطر رشد قارچ در تیمار مورد نظر.

برای تعیین غلظت اولیه تیمارها، از روش رقت لوله‌ای (Microdilution and Macrodilution Broth procedures) استفاده شد. غلظت‌های مختلف از هر دو تیمار تهیه و روی قارچ بیمارگر مایه‌زنی شدند. کمترین غلظتی از ماده مورد آزمایش که از آن غلظت به بالا رشد قارچ *P. digitatum* تحت تأثیر قرار گرفت و رشد آن نسبت به شاهد کمتر بود، به عنوان پایین‌ترین غلظت در نظر گرفته شد و کمترین غلظتی از ماده مورد آزمایش که از آن غلظت به بالا رشد قارچ *P. digitatum* دیده نشد به عبارت دیگر رشد قارچ کاملاً مهار شد، به عنوان بالاترین غلظت در نظر گرفته شد.

آزمایش اثر تیمارها روی جوانه‌زنی هاگ *P. digitatum*

محیط کشت مایع PDB تهیه و سترون گردید. از هر یک از غلظت‌های به کار رفته در آزمایش قبلی، یک میلی‌لیتر برداشت شد و داخل ویال‌های ۱/۵ میلی‌لیتری ریخته شد و ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون هاگ با غلظت $۱۰^{۵}$ هاگ در میلی‌لیتر در هر ویال مایه‌زنی گردید. ویال‌ها در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند و پس از ۲۴ ساعت روزی یک بار تا ۵ روز تعداد هاگهای جوانه‌زده در تیمارهای مختلف با استفاده از لام نئوبار شمارش گردید. این آزمایش در پنج تکرار انجام گرفت و درصد بازدارندگی تیمارهای مختلف پس از تصحیح با رابطه ۱ به دست آمد (Griffin 1994).

آزمایش اثر مواد بر پوسیدگی میوه مرکبات در انبار

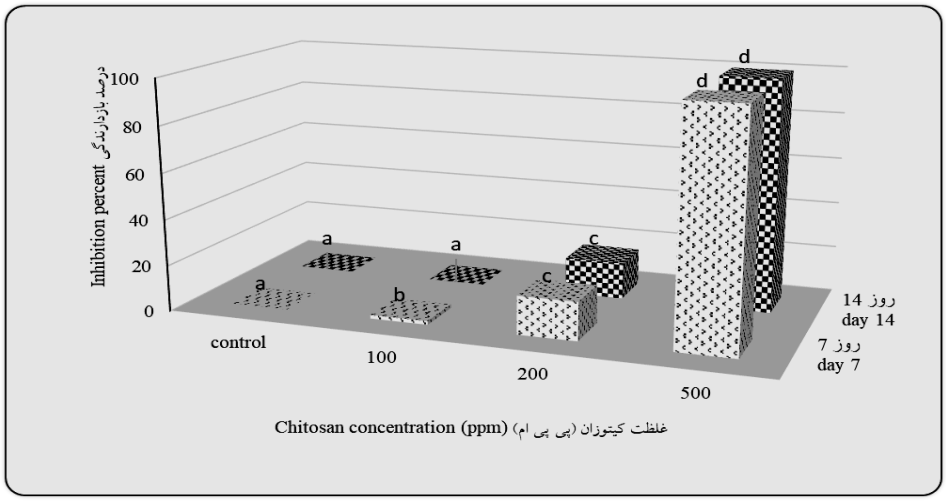
از میوه مرکبات (رقم تامسون) یک اندازه، سالم و عاری از هر گونه تیمار شیمیایی و عارضه فیزیولوژیک در انبار استفاده گردید. پس از سترون کردن میوه‌ها، روی هر میوه یک زخم به قطر ۲ میلی‌متر و عمق ۲ میلی‌متر ایجاد شد. محل زخم با ۲۵ میکرولیتر سوسپانسیون هاگ (با غلظت $۱۰^{۵}$ هاگ در میلی‌لیتر) مایه‌زنی شد. میوه‌های مایه‌زنی شده به مدت یک دقیقه در محلول تیمارهای از قبل تهیه شده (غلظت‌هایی که در شرایط آزمایشگاه مهار مؤثرتری روی رشد پرگنه و جوانه‌زنی هاگ قارچ داشتند) غوطه‌ور شده و پس از خشک شدن در شرایط انبار نگهداری شدند. برای هر تیمار ۳ تکرار و در هر تکرار ۵ میوه وجود داشت.

میانگین داده‌های هر آزمایش با استفاده از آزمون دانکن مقایسه گردید. جدول تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از آنالیز یک طرفه (ANOVA) در نرم‌افزار SPSS ver. 16 انجام و نمودارها با نرم‌افزار Excel 2013 ترسیم شدند.

یافته‌ها و بحث Results and Discussion

اثر بازدارندگی کیتوزان بر رشد پرگنه و جوانه‌زنی هاگ *P. digitatum*

بررسی اثر بازدارندگی کیتوزان بر رشد پرگنه قارچ نشان داد که با افزایش غلظت کیتوزان میزان بازدارندگی از رشد پرگنه افزایش پیدا کرد. در تیمار شاهد (فاقد کیتوزان) و تیمار ۱۰۰ پی پی‌ام کیتوزان (بازدارندگی ۱/۶ درصد)، کمترین بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ مشاهده شد. این دو تیمار از لحاظ آماری در یک گروه قرار گرفتند و با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشتند. تیمار کیتوزان ۲۰۰ پی پی‌ام با ۱۶/۶ درصد بازدارندگی نسبت به شاهد تفاوت معنی‌داری داشت و در مهار قارچ تأثیر جزئی داشت. تیمار ۵۰۰ پی پی‌ام کیتوزان به طور کامل از رشد قارچ جلوگیری کرده و در سطح تشتک پتری رشد پرگنه قارچ مشاهده نشد. این تیمار از نظر آماری با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌داری داشت و نشان داد که کیتوزان توانایی مهار رشد پرگنه قارچ را دارد. آزمایش اثر بازدارندگی کیتوزان بر رشد پرگنه قارچ تا ۱۴ روز بعد از مایه‌زنی نگهداری شد و مشخص شد اختلاف روز هفتم با روز چهاردهم به صورت جزئی است (شکل ۱). اثر بازدارندگی تیمارهای کیتوزان بر جوانه‌زنی هاگ مشابه



شکل ۱. اثر بازدارندگی غلظت‌های کیتوزان بر رشد پرگنه *P. digitatum*؛ حروف غیرمشابه در بالای ستون‌ها نشانه تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها است.

Figure 1. Inhibitory effect of chitosan concentrations on colony growth of *P. digitatum*; dissimilar letters on top of columns indicate a significant difference between them.

اثر آن بر رشد پرگنه قارچ بود. این آزمایش تا پنج روز (۱۲۰ ساعت) بعد از مایه‌زنی ادامه یافت و بیشترین اثر در تیمار ۵۰۰ پی پی‌ام مشاهده شد.

کیتوزان یک بیوپلیمر با کاربرد وسیع است و شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد کیتوزان خاصیت ضدقارچی دارد (ElGhaouth 1992). خاصیت ضد میکروبی کیتوزان ناشی از گروه‌های آمینی با بار مثبت آن است. این گروه‌ها با غشاء سلولی میکروارگانیسم‌ها که دارای بار منفی است واکنش داده و منجر به نشت اجزاء پروتیینی و سایر اجزا درون سلولی میکروارگانیسم‌ها می‌شود. کیتوزان منجر به مهار سنتز mRNA و پروتیین، ایجاد بر هم‌کنش با DNA و RNA و همچنین ناهنجاری‌هایی در میسلیوم قارچ (تورم و کاهش اندازه هیف) می‌شود. همچنین کیتوزان سبب شلاته شدن فلزات و سایر ترکیبات مغذی ضروری شده و در نتیجه از رشد قارچ ممانعت می‌کند (AlHetar 2010 Long et al. 2014,). کیتوزان می‌تواند جوانه‌زنی هاگ قارچ‌های *P. expansum* و *B. cinerea* را کاملاً مهار کند و باعث آسیب دیدن غشای پلاسمایی در هر دو بیمارگر شود (Liu et al. 2007). نتایج مشابهی از خاصیت قارچ کشی کیتوزان بر روی قارچ‌های *Fusarium oxysporum* (AlHetar et al. 2010)، *Physalospora piricola* (Meng et al. 2010) و *Colletotrichum* sp. (Jitareerat et al. 2007) نیز گزارش شده است. با مطالعه گزارش‌های مرتبط با کاربرد کیتوزان در مهار بیماری‌های پس از برداشت می‌توان استنتاج کرد که اثر کیتوزان روی بیمارگرهای پس از برداشت می‌تواند متغیر باشد و به عواملی مانند غلظت، وزن مولکولی، درجه استیلاسیون، نحوه استفاده و درجه حرارت در طول ذخیره‌سازی بستگی دارد.

اثر اسانس مورد بر رشد پرگنه و جوانه‌زنی هاگ *P. digitatum*

اثر بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس مورد بر رشد پرگنه قارچ تا دو هفته پس از مایه‌زنی نشان داد که با افزایش غلظت اسانس در محیط کشت میزان بازدارندگی از رشد پرگنه افزایش پیدا کرد. اسانس گیاه مورد با غلظت ۱۷۰۰ پی پی‌ام کاملاً از رشد پرگنه قارچ ممانعت کرد و ۱۰۰ درصد بازدارندگی داشت. کمترین میزان بازدارندگی در تیمار اسانس ۲۰۰ پی پی‌ام با بازدارندگی ۵۵/۹ درصد مشاهده شد (جدول ۱). کلیه تیمارهای حاوی اسانس نسبت به شاهد از رشد قارچ بازدارندگی داشتند و بین تیمارهای حاوی اسانس با یکدیگر و همچنین با تیمار شاهد (فاقد اسانس) اختلاف معنی‌داری مشاهده گردید (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه میانگین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ *P. digitatum* در تیمار با اسانس گیاه مورد.

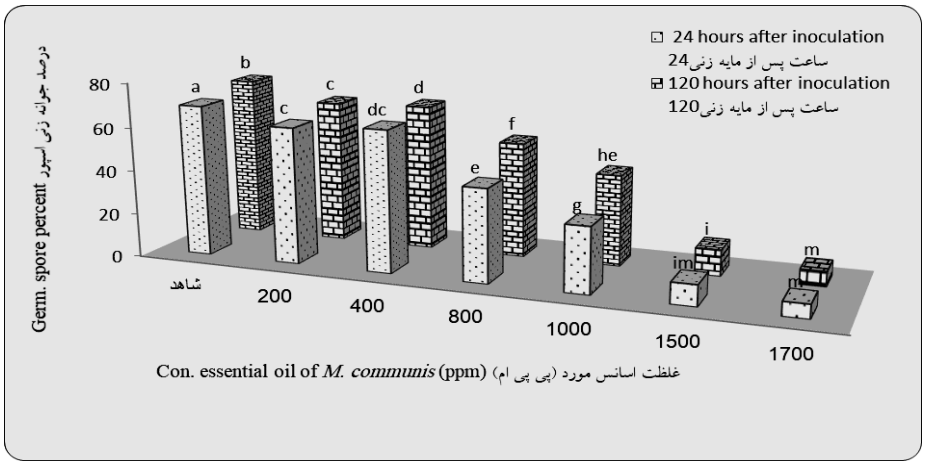
Table 1. Comparison of the average inhibition percentage of *P. digitatum* colony in the treatment with essential oil of Myrtle.

Percentage of colony growth inhibition in day	غلظت اسانس گیاه مورد (ppm) Concentration of essential oil of *M. communis* (ppm)						
	Control	200	400	800	1000	1500	1700
Day 7	0	40.7 a *	43.8 c	54.5 eb	81.3 g	86.3 hl	100 m
Day 14	0	55.9 be	57.9 d	67.1 f	87.1 h	92.1 l	100 m

* حروف غیرمشابه روی اعداد نشانه تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها است ($p \leq 0.05$).

* Dissimilar letters on numbers indicate a significant difference between them ($p \leq 0.05$).

آزمایش اسانس گیاه مورد روی جوانه‌زنی هاگ قارچ *P. digitatum* در محیط کشت مایع نشان داد که با افزایش غلظت اسانس در محیط کشت مایع، میزان جوانه‌زنی هاگ کاهش یافت. شمارش هاگهای جوانه‌زده پس از گذشت ۱۲۰ ساعت از مایه‌زنی نشان داد که کمترین میزان هاگ جوانه‌زده در تیمار اسانس ۱۷۰۰ پی پی‌ام با هفت درصد جوانه‌زنی بود و بیشترین میزان جوانه‌زنی در تیمارهای ۲۰۰ و ۴۰۰ پی پی‌ام به ترتیب با ۶۴/۴ و ۶۲/۴ درصد جوانه‌زنی مشاهده شد. دو تیمار اخیر در یک گروه قرار گرفتند و بین آن‌ها اختلاف معنی‌داری وجود نداشت امّا نسبت به سایر تیمارها و شاهد تفاوت معنی‌داری نشان دادند (شکل ۲).



شکل ۲. اثر غلظت‌های مختلف اسانس مورد بر جوانه‌زنی هاگ قارچ *P. digitatum* پس از گذشت ۲۴ و ۱۲۰ ساعت از مایه‌زنی، حروف غیرمشابه روی ستون‌ها نشانه تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها است.

Figure 2. Effect of different concentrations of exssential oil concentrations of Myrtle on germination of *P. digitatum* spores after 24 and 120 hours of inoculation; dissimilar letters on top of columns indicate a significant difference between them.

ترکیبهای شناسایی شده در اسانس گیاه مورد

سیزده ترکیب اصلی در آزمایش اسانس گیاه مورد (*M. communis*) به وسیله دستگاه کروماتوگراف گازی (GC-MS)، شناسایی گردیدند که در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به مکان جغرافیایی که گیاه در آن کشت شده و مرحله رشدی گیاه در زمان نمونه‌برداری ممکن است کمیت و کیفیت ترکیبات آن متفاوت باشد (Senatore et al. 1997). در این آزمایش که از گیاه مورد در منطقه ساری نمونه‌برداری شده بود، از نظر کمی بیشترین ترکیب شناسایی شده ۱، ۸- سینئول (۲۰/۳۴) بود و پس از آن ترکیبات لینالول (۱۶/۹۲) و گاما ترپینن (۱۴/۴۶) به ترتیب قرار داشتند. کمترین ترکیب شناسایی شده ژرانیول پروپیونات (۱/۰۱) و کمیت قبل از آن مربوط به بنزن (۱/۰۵) بود (جدول ۲). در گزارش پژوهشگران ترکیبات ۱، ۸- سینئول، لینالول و گاما ترپینن از اجزای اصلی مورد شناخته شده‌اند امّا درصد آن‌ها با درصد به دست آمده در این پژوهش متفاوت است (Najibzadeh et al. 2011).

اثر ضد میکروبی و ضد قارچی اسانس گیاه مورد و نیز ترکیبهای سازنده آن از قبیل سینئول، لینالول و گاماترپینن گزارش شده است (Miller and Danniel 2005, Martinetz et al. 1998). خاصیت ضد

جدول ۲. نوع و درصد ترکیبات شناسایی شده در اسانس گیاه مورد (*M. communis*)

Table 2. Type and percentage of compounds identified in the essential oil of *M. communis*

ردیف Row	نام ترکیب Name of Composition		درصد ترکیب Composition percentage
1	۱، ۸- سینئول	1,8-Cineole	20.34
2	لینالول	Linalool	16.92
3	گاماترپینن	Gama terpinene	14.45
4	آلفاترپینئول	Alpha.trpineol	10.02
5	اکتادین	Octadien	5.54
6	کامفن	Camphene	3.93
7	ژرانیول	Geraniol	3.46
8	کاریوفیلین	Caryophyllene	2.58
9	آلفا کاریوفیلین	alpha-Caryophyllene	2.2
10	۴ و ۶ دی اتیل ۲ متوکسی پریمیدین	4,6-Diethyl-2-Methoxypyrimidine	2.18
11	کاریوفیلین اکساید	Caryophyllene oxide	1.8
12	بنزن	Benzene	1.05
13	ژرانیول پروپیونات	Geranyl propionate	1.01

میکروبی اسانس مورد را به اجزای تشکیل‌دهنده آن یا به اثر سینرژیستی مجموعه یا بخشی از اجزای آن می‌توان نسبت داد (Yadegarinia et al. 2006, Kalemba and Kunika 2003). در پژوهش حاضر اسانس گیاه مورد توانایی مهار قارچ *P. digitatum* در غلظت‌های بالا را داشت و تفاوت در میزان بازدارندگی، به میزان ماده مؤثره موجود در اسانس گیاه مرتبط بود. در آنالیز ترکیبات موجود در اسانس گیاه مورد، ۱، ۸- سینئول، لینالول و گاماترپین و آلفاترپینئول به ترتیب بیشترین درصد ترکیبات را دارا بودند و به عنوان اجزاء اصلی اسانس گیاه مورد، نقش مهمی در خواص ضد قارچی آن دارند. اسانس‌های روغنی از سنتز RNA و DNA، پروتیین‌ها و پلی‌ساکاریدها در سلول باکتری‌ها و قارچ‌ها جلوگیری می‌کنند. این اثر مشابه اثر آنتی‌بیوتیک‌ها روی قارچ‌ها است. همچنین این ترکیبات باعث تغییر در نفوذپذیری کانال $K^+ - H^+$ و شیب یونی و در نتیجه منجر به اختلال در عملکرد سلول و مرگ آن می‌شوند (Kalemba and Kunika 2003). اسانس گیاه مورد خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی دارد و فعالیت ضد میکروبی آن در برابر *Escherichia coli*، *Staphylococcus aurus* و *Candida albicans* گزارش شده است (Yadegarinia et al. 2006). عصاره و اسانس برگ گیاه مورد در برخی گونه‌های قارچ *Fusarium* sp. توانایی مهار قارچ را داشته است، در حالی که در گونه‌هایی از قارچ *Penicillium* sp. بی‌تأثیر بوده است (Martinetz et al. 1998). در گزارش برخی از محققان نشان داده شده است که ترکیبات فنلی و حلقوی موجود در اسانس‌های گیاهی فعالیت ضد میکروبی بالایی دارند و مشخص شده است که دیواره سلولی بیمارگر هدف اصلی ترکیبات فنلی است. این ترکیبات در نفوذپذیری غشاء سلول اختلال ایجاد می‌کنند و باعث مهار فعالیت‌های تنفس می‌شوند. ماهیت آب‌گریزی این ترکیبات در اسانس روغنی، آن‌ها را قادر می‌سازد که به غشای سلول و میتوکندری قارچ به‌راحتی نفوذ کرده و در نتیجه باعث ایجاد اختلال در فعالیت‌های آنزیمی غشاء سلول قارچ شوند (Martinetz et al. 1998).

اثر قارچکش تیابندازول بر رشد پرگنه و جوانه‌زنی هاگ *P. digitatum*

نتیجه آزمایش قارچکش تیابندازول روی رشد پرگنه قارچ *P. digitatum* در محیط کشت PDA نشان داد که با افزایش غلظت قارچکش، میزان رشد قارچ کاهش یافت. بیشترین بازدارندگی در روز ۷ در تیمار تیابندازول ۵۰۰ پی پی‌ام با ۱۰۰٪ بازدارندگی مشاهده شد. در این غلظت هیچ اثری از رشد قارچ در سطح پتری به وجود نیامد و از نظر آماری با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. کمترین بازدارندگی در تیمار تیابندازول ۵۰ پی پی‌ام مشاهده شد که با تیمار شاهد در یک گروه آماری قرار گرفتند و تفاوت معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد. در این تیمار در روز هفتم بعد از مایه‌زنی،

جدول ۳. میانگین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه *P. digitatum* در تیمار با تیابندازول

Table 3. Mean of inhibition percentage of *P. digitatum* colony growth by thiabendazole treatment

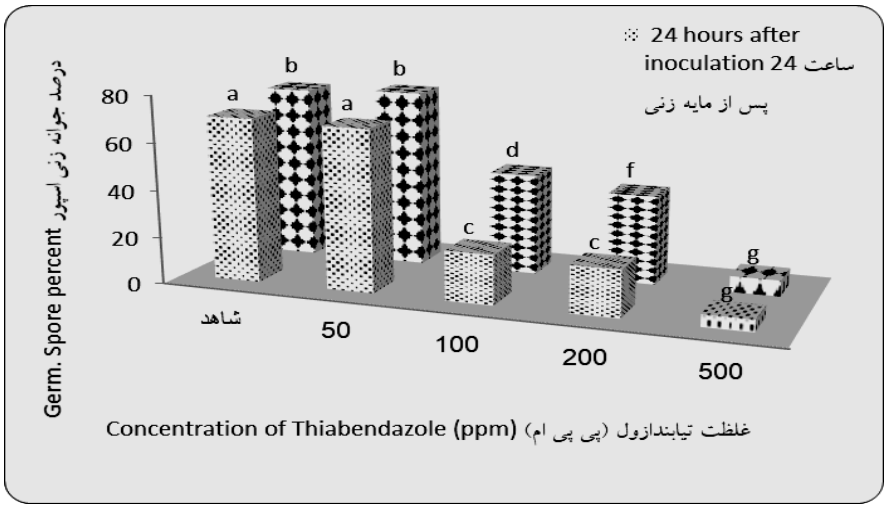
Percentage of inhibitory	Concentration of thiabendazole fungicide (ppm)				
	شاهد	50	100	200	500
Day 7	0a	3.1b*	17.3c	68.2e	100f
Day 14	0a	0a	14.6d	70.3e	100f

* حروف غیرمشابه روی اعداد نشانه تفاوت معنی‌دار بین آن‌ها است ($p \leq 0.05$).

* Dissimilar letters on numbers indicate a significant difference between them ($p \leq 0.05$).

۳/۱ درصد بازدارندگی به وجود آمد امّا این اثر تا روز چهاردهم از بین رفت و با شاهد یکسان شد (جدول ۳).

اثر قارچکش تیابندازول روی جوانه‌زنی هاگ قارچ *P. digitatum* در محیط کشت مایع نشان داد کمترین میزان جوانه‌زنی بعد از ۲۴ ساعت از مایه‌زنی، در تیمار ۵۰۰ پی پی‌ام تیابندازول با جوانه‌زنی ۵/۲ درصد بود و از نظر آماری با سایر گروه‌ها تفاوت معنی‌دار داشت. بیشترین درصد جوانه‌زنی هاگ قارچ پس از گذشت ۲۴ ساعت، در تیمار ۵۰ پی پی‌ام و شاهد با جوانه‌زنی به ترتیب ۶۹ و ۷۰ درصد بود. که از نظر آماری تفاوت معنی‌داری بین این دو تیمار وجود نداشت. پس از گذشت ۱۲۰ ساعت از مایه‌زنی، کمترین میزان جوانه‌زنی هاگ در تیمار تیابندازول ۵۰۰ پی پی‌ام با جوانه‌زنی ۶/۸ درصد به



شکل ۳. اثر غلظت‌های مختلف قارچکش تیابندازول بر جوانه‌زنی هاگ *P. digitatum* پس از گذشت ۲۴ و ۱۲۰ ساعت از مایه‌زنی؛ حروف غیرمشابه روی ستون‌ها به معنای تفاوت معنی‌دار است.

Figure 3. Effect of different concentrations of thiabendazole on germination of *P. digitatum* spore after 24 and 120 hours of inoculation; Dissimilar letters on top of each column showed a significant difference.

وجود آمد که این تیمار از نظر آماری با سایر تیمارها تفاوت معنی‌دار داشت. در این زمان بین سایر تیمارها نیز اختلاف معنی‌دار وجود داشت. امّا تیمارهای تیابندازول ۵۰ پی پی‌ام و شاهد با جوانه‌زنی به ترتیب ۷۵/۶ و ۷۴/۳ درصد اختلاف معنی‌داری نداشتند و در یک گروه قرار گرفتند. این نتیجه نشان داد که تیمار ۵۰۰ پی پی‌ام تیابندازول می‌تواند از جوانه‌زنی هاگ قارچ ممانعت کند و با گذشت زمان (۱۲۰ ساعت) اختلاف معنی‌داری در جوانه‌زنی هاگ قارچ مشاهده نشد (شکل ۳).

مقایسه اثر اسانس مورد و کیتوزان با قارچکش تیابندازول

مقایسه میانگین بازدارندگی از رشد پرگنه به وسیله اسانس مورد و تیابندازول نشان داد که تیمار اسانس ۱۷۰۰ پی پی‌ام و تیمار تیابندازول ۵۰۰ پی پی‌ام از نظر بازدارندگی اثر یکسان داشتند و درصد بازدارندگی آن‌ها ۱۰۰ درصد بود. این دو تیمار در مهار رشد پرگنه قارچ در محیط کشت مصنوعی تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند و از نظر آماری در یک سطح قرار گرفتند. در مقایسه ممانعت از جوانه‌زنی هاگ قارچ مشخص شد که تیمار اسانس ۱۷۰۰ پی پی‌ام و تیمار تیابندازول ۵۰۰ پی پی‌ام به ترتیب با درصد جوانه‌زنی ۷ و ۶/۸ درصد از نظر بازدارندگی اثر یکسان داشتند و در یک گروه آماری قرار گرفتند.

نتیجه مقایسه میانگین بازدارندگی از رشد پرگنه به وسیله کیتوزان و تیابندازول نشان داد که تیمار کیتوزان ۵۰۰ پی پی‌ام و تیمار تیابندازول ۵۰۰ پی پی‌ام از نظر بازدارندگی اثر یکسان داشتند و درصد بازدارندگی آن‌ها ۱۰۰ درصد بود. اثر بازدارندگی کیتوزان بر روی جوانه‌زنی هاگ در تیمار ۵۰۰ پی پی‌ام و تیمار تیابندازول ۵۰۰ پی پی‌ام به ترتیب با جوانه‌زنی ۱۸/۸ و ۶/۸ درصد تا ۱۲۰ ساعت بعد از آزمایش (روز پنجم) از نظر بازدارندگی اثر متفاوت داشتند. در مقایسه بالاترین غلظت مؤثر به کار رفته در آزمایش (تیابندازول ۵۰۰ پی پی‌ام، کیتوزان ۵۰۰ پی پی‌ام و اسانس ۱۷۰۰ پی پی‌ام) درصد بازدارندگی از رشد پرگنه به ترتیب میزان ۱۰۰، ۱۰۰ و ۱۰۰ بود؛ اما ممانعت از جوانه‌زنی هاگ در روز پنجم به ترتیب ۶/۸، ۱۸/۸ و ۷ درصد بود. این نشان می‌دهد اثر ممانعت از جوانه‌زنی هاگ در کیتوزان کمتر از اسانس در بیشترین غلظت مؤثر آن‌ها در بازدارندگی از رشد پرگنه می‌باشد؛ بنابراین به منظور استفاده از کیتوزان برای ممانعت از جوانه‌زنی هاگ، لازم است غلظت بالاتری به کار برده شود و هزینه بیشتری لازم خواهد داشت.

در بررسی اختلاط اسانس گیاه مورد و کیتوزان مشاهده شد که ترکیب این دو ماده در مهار جوانه‌زنی هاگ، تقویت‌کننده اثر یکدیگر می‌باشند. از بین تیمارهای آزمایش شده دو تیمار که اثر مهاری بالاتری داشتند انتخاب شدند. آزمایش اثر هم‌افزایی آن‌ها نشان داد بیشترین میزان بازدارندگی از رشد پرگنه در تیمار ۵۰۰ PPM کیتوزان + ۱۰۰۰ PPM اسانس (با بازدارندگی ۱۰۰٪) بود. امّا در ممانعت از

جوانه‌زنی هاگ قارچ این اثر مشاهده نگردید (جوانه‌زنی ۲/۲٪ پس از ۱۲۰ ساعت)؛ به عبارت دیگر برای ممانعت صد در صد از جوانه‌زنی هاگ غلظت بالاتری لازم بود. آزمایش این تیمار در مهار پوسیدگی مرکبات در انبار (محیط طبیعی) به میزان ٪۶۶/۶ در مقایسه با شاهد ٪۱۰۰ بود. در غلظت‌های بالاتر (کیتوزان PPM ۲۰۰۰ + اسانس PPM ۲۰۰۰) در انبار میزان مهار به ٪۴۶/۶ رسید. با این حال میزان مهار آن‌ها در مقایسه با قارچ‌کش تیابندازول PPM ۲۰۰۰ (٪۲۶/۶) کمتر بود.

نتیجه‌گیری Conclusion

بازدارندگی کامل از رشد قارچ *P. digitatum* در تیمار اسانس مورد با غلظت ۱۷۰۰ پی پی‌ام، تیمار کیتوزان با غلظت ۵۰۰ پی پی‌ام و در تیمار با قارچکش تیابندازول با غلظت ۵۰۰ پی پی‌ام در این پژوهش ثابت شد، به عبارت دیگر قدرت مهار کپک سبز مرکبات به وسیله قارچ‌کش تیابندازول بیش از سه برابر اسانس مورد و مشابه با قدرت مهارکنندگی کیتوزان بوده است. با توجه به خطر زیست محیطی و بروز مقاومت در جمعیت بیمارگر به خاطر کاربرد قارچ‌کش‌ها، می‌توان گفت به کارگیری ترکیبات طبیعی و زیست سازگار همچون کیتوزان جایگزین مناسبی برای کاهش مصرف سمها به ویژه در بیماریهای پس از برداشت بوده و همچنین می‌تواند توجیه کننده استفاده از قارچ‌کش‌های طبیعی ضعیف‌تر مانند اسانس مورد باشد. همچنین ترکیب کیتوزان + اسانس مورد (٪۴۶/۶) در مقایسه با تیابندازول (٪۲۶/۶) می‌تواند پوسیدگی پنسیلیومی مرکبات را تا حد قابل قبولی در انبار کاهش دهد.

منابع References

1. Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology 18:265-267.
2. Aeinechi Y (2001) Medical Terminology and Medicinal Plants of Iran. Tehran University Press. 1196p. (In Persian).
3. AlHetar MY, Zainal Abidin MA, Sariah M, Wong MY (2010) Antifungal activity of chitosan against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Journal of Applied Polymer Science 1204:2434-2439.
4. Ameziane N, Boubaker H, Boudyach H, Msanada F, Jilal A, Ait Benaoumar A (2007) Antifungal activity of Moroccan plants against citrus fruit pathogens. Agronomy for Sustainable Development 27:273-277.
5. Chien PJ, Chou CC (2006) Antifungal activity of chitosan and its application to control postharvest quality and fungal rotting of Tankancitrus fruit (Citrus tankan Hayata). Journal of the Science Food and Agriculture 86:1964-1969.

6. ElGhaouth A, Arul J, Grenier J, Asselin A (1992) Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. Phytopathology 82:398-402.

7. Eweis M, Elkholy SS, Elsabee MZ (2006) Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. International Journal of Biological Macromoleculs 38:1-8.

8. Fattahi Moghaddam J, Eshcovarian M (2013) Reaction of some citrus fruit bioactive compounds to wax coating during storage. Journal of Plant Production Research. 20:59-72. (In Persian with English Abstract).

9. Griffin DH (1994) Spore dormancy and germination. pp.375-398. In: DH Griffin (ed.). Fungal physiology, Second edition, New York: John Wiley & Sons.

10. Ismail M, Zhang J (2004) Postharvest citrus diseases and their control. Outlooks on Pest Management 15:29-35.

11. Jitareerat P, Paumchai S, Kanlayanarat S, Sangchote S (2007) Effect of chitosan on ripening, enzymaticactivity and disease development in mango (*mangifera indica*) fruit. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 352:211-218.

12. Kalemba D, Kunika A (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry 10:813-829.

13. Kanetis L, Forster H, Adaskaveg JE (2007) Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil and pyrimrthanil for managing citrus green moold. Plant Diseases 91:1502-1511.

14. Liu J, Tian SP, Meng XH, Xu, Y (2007) Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. Postharvest Biological Technology 44:300-306.

15. Long LT, Tien NTT, Trang NH, Ha TTT, Hieu NM (2014) Study on antifungal ability of water soluble chitosan against green mould infection in harvested oranges. Journal of Agricultural Science 6:205-213.

16. Martinetz H, Johnson M, Phillips B (1998) Antimicrobial effects of *Myrtus communis* L. essential oil on cilinical isolates of *Fusarium* and *Penicilium*. Medicinal Plants. 34:85-59. (In Persian with English Abstract).

17. Meng X, Yang L, Kennedy JF, Tian S (2010) Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. Carbohydrate Polymers 81:70-75.

18. Miller P, Danniel R (2005) Inhibitory effects of *Zingiber officinalis* and *Myrtus Communis* L. Against Dimatiaceouses. Fitopatolgia 22:211-215.

19. Mohammadi R, Mirhendi Esfahani SA, Shadzi Sh, Moattar F (2008) Antifungal activity of *Myrtus communis* L. against Aspergillus clinical isolates. Journal of Isfahan Medical School 26:105-110. (In Persian with English Abstract).

20. Najibzadeh T, Yadegari MH, Naghdi Badi H, Salehnia AN (2011) Antifungal effect of essential oil of *Myrtus communis* on oral candidiasis in immunosuppressive rats. Journal of Medicinal Plants 38:102-116. (In Persian with English Abstract).

21. Senatore F, DeFuco R, DeFeo V (1997) Essential oils from *Salvia* spp. (Lamiaceae). I. Chemical composition of the essential oils from *Salvia glutinosa* L. growing wild in Southern Italy. Journal of Essential Oil Research 9:151-157.

22. Simon J (2008) The Toxicology and Biochemistry of Insecticides, CRC Press/ Taylor & Francis Group, Boca Raton, USA. 21p.

23. Yadegarinia D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Alipoor Astaneh SH, Rasooli I (2006) Zambonelli biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. Phytochemistry 67:1249-1255.