کنترل درون شیشه‌ای قارچ *Penicillium digitatum* با استفاده از اسانس مرزه باغی

سارا اترش*[۱]، اصغر رمضانیان [۲] و مجید راحمی [۳]
[۱] دانشجوی سابق کارشناسی ارشد بخش علوم باغبانی دانشگاه شیراز
[۲] دانشیار بخش علوم باغبانی دانشگاه شیراز
[۳] استاد بخش علوم باغبانی دانشگاه شیراز
* نویسنده مسئول: atrashsara2020@gmail.com

چکیده

کپک سبز ناشی از *Penicillium digitatum* از بیماری‌های مهم پس از برداشت مرکبات در کشور ایران بشمار می‌آید. در این پژوهش از اسانس مرزه باغی *Satureja hortensis* برای کنترل رشد قارچ مولد کپک سبز در شرایط درون شیشه‌ای استفاده شد. قسمت‌های هوایی گیاه مرزه باغی با دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد. قارچ *Penicillium digitatum* از میوه‌های آلوده لیموترش استخراج و در محیط کشت PDA نگهداری شد. پس از آن محیط کشت با غلظت‌های مختلف اسانس مرزه (۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکرولیتر در لیتر) با ۳ تکرار تهیه شد و از توئین ۸۰ به غلظت ۰/۵ میلی‌لیتر در لیتر محیط کشت به‌عنوان امولسیفایر استفاده شد. قارچ *Penicillium digitatum* بر روی محیط کشت با غلظت‌های مختلف اسانس مایه‌کوبی شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در دستگاه انکوباتور قرار گرفت. هر ۴۸ ساعت یک بار به مدت ۸ روز قطر پرگنه‌های قارچ اندازه‌گیری و میزان تأثیر غلظت‌های مختلف روی میزان رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده از دستگاه GC-MS، بیشترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس مرزه مربوط به کارواکرول (۵۵/۶۷ درصد)، گاما ترپینن (۳۱/۹۸ درصد) و آلفا ترپینن (۳/۷۵ درصد) بود. اسانس مرزه باغی در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکرولیتر در لیتر در محیط کشت PDA به‌طور کامل از رشد پرگنه‌های قارچ *Penicillium digitatum* جلوگیری کرد. همچنین غلظت‌های پایین‌تر باعث کند شدن رشد قارچ گردید ولی رشد آن را متوقف نکرد.

***کلمات کلیدی:* کارواکرول، کپک سبز، درصد بازدارندگی رشد**

مقدمه

کپک سبز که توسط قارچ *Penicillium digitatum* از طریق منافذ و زخم‌های سطح پوست ایجاد می‌شود یکی از شایع‌ترین بیماری‌های پس از برداشت میوه‌های مرکبات محسوب می‌شود. این قارچ در پوست میوه ایجاد یک لکه آبکی نرم می‌نماید و پس از رشد، میسلیوم‌های سفیدرنگ پر از اسپورهای سبزرنگ نمایان می‌گردند (Plaza *et al*., 2004). با توجه به اثرات مخرب ناشی از کاربرد سموم شیمیایی جهت کنترل عوامل بیماری‌زا، تولید هر چه بهتر محصولات ارگانیک که کمکی مؤثر برای حفظ سالم‌سازی محیط‌زیست می‌کند ضرورت دارد (Alpsoy, 2010). مرزه باغی با نام علمی *Satureja hortensis* از تیره نعناعیان، گیاهی علفی و یک‌ساله با خصوصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد قارچی و ضد باکتریایی چشمگیر است (Tahmasbpour *et al*., 2015). در پژوهشی فعالیت ضد قارچی اسانس مرزه در غلظت ۲۵ درصد بهترین نتیجه را در کنترل قارچ *Aspergillus* sp. داشت (Dikbas *et al*., 2008).

مواد و روش‌ها

اندام‌های هوایی گیاه مرزه در مرحله بذردهی به‌وسیله دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب اسانس‌گیری شد. میوه‌های لیموترش دارای علائم کپک سبز به آزمایشگاه منتقل شدند. اسپورهای قارچ پس از استخراج و خالص‌سازی در محیط کشت PDA نگهداری شدند. سپس محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف اسانس (۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکرولیتر در لیتر) با ۳ تکرار تهیه شد. از توئین ۸۰ نیز به غلظت ۰/۵ میلی‌لیتر در هر لیتر محیط کشت به‌عنوان امولسیفایر استفاده شد. ۲۴ ساعت پس از اعمال تیمارها در محیط کشت، از قارچ‌های خالص پنی‌سیلیوم بلوک‌های حاوی قارچ با قطر متوسط ۵ میلی‌متر جدا شد و در مرکز تشتک پتری‌های حاوی غلظت‌های مختلف اسانس قرار داده شد و در انکوباتور در ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شد.

هر ۴۸ ساعت یک بار به مدت ۸ روز قطر پرگنه‌های قارچ اندازه‌گیری و میزان تأثیر غلظت‌های مختلف روی میزان رشد قارچ در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. همچنین جهت مشخص نمودن نوع و میزان ترکیبات شیمیایی موجود در اسانس، پس از استخراج، نمونه اسانس در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان فارس GC-MS شد. این آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۸ تیمار و ۳ تکرار انجام شد. واکاوی داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹ و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

نتایج و بحث

با استفاده از دستگاه GC-MS ترکیب‌های مختلف و میزان درصد آن‌ها در اسانس مرزه باغی تعیین شد. بازده اسانس مرزه باغی ۱/۴۴ درصد (وزن خشک) بود. یافته‌ها نشان داد که بیشترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس مرزه مربوط به کارواکرول ۵۵/۶۷ درصد، گاما ترپینن ۳۱/۹۸ درصد، آلفا ترپینن ۳/۷۵ درصد، مجموعاً بیش از ۹۰ درصد ترکیبات عمده اسانس مرزه باغی را تشکیل دادند، همچنین ترکیبات پیسیمن ۲/۲۰ درصد، آلفا توجن ۱/۱۶ درصد و میرسن ۱/۱۵ درصد که بین ۱ تا ۳ درصد ترکیبات اسانس مرزه را شامل شدند (جدول ۱). کارواکرول جز اسیدهای فنولیک بوده که دارای قدرت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به پیش سازهای خود (گاما ترپینن و پی سیمن) است. در پژوهشی مشخص شد که کارواکرول از ترکیبات اصلی اسانس مرزه بود (Bezić *et al*., 2009) که نتایج ما همسو با این پژوهش بود.

جدول ۱- ترکیب‌های شیمیایی در اسانس مرزه باغی با GC-MS

Compound	Retention time (RT)	Retention index (RI)	(%)
Thujene-α	6.29	924	1.16
Pinene-α	6.49	932	0.64
Pinene-β	7.52	974	0.22
Myrcene	7.77	988	1.15
Phellandrene	8.22	1002	0.24
Terpinene-α	8.61	1014	3.75
Cymene-ρ	8.69	1020	2.20
Sylvestrene	8.96	1025	0.37
Terpinene-γ	10.04	1054	31.98
Terpinen-4-ol	13.92	1174	0.20
Thymol	18.17	1289	0.80
Carvacrol	18.89	1298	55.67
Caryophyllene	23.95	1417	0.36
Bicyclogermacrene	26.79	1500	0.18
Bisabolene	27.27	1505	0.21

اسانس مرزه باغی در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۲۰۰ میکرولیتر در لیتر در محیط کشت PDA به‌طور کامل از رشد پرگنه های قارچ *Penicillium digitatum* جلوگیری کرد (۱۰۰ درصد بازدارندگی رشد). تا پایان آزمایش، پرگنه‌های قارچ در محیط کشت هیچ‌گونه رشدی نداشت. غلظت ۸۰۰ میکرولیتر در لیتر بیش از ۹۰ درصد بازدارندگی رشد قارچ ایجاد کرد. غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ باعث کند شدن رشد قارچ گردیدند ولی رشد آن را متوقف نکردند (جدول ۲). به‌طورکلی تمام غلظت‌های مورد استفاده از اسانس مرزه نسبت به شاهد اثر بازدارندگی رشد بر پرگنه‌های قارچ داشت. از آنجایی که در این آزمایش از توئین ۸۰ به‌عنوان امولسیفایر (حلال اسانس) استفاده شد، جهت بررسی اثر توئین بر درصد بازدارندگی یک تیمار توئین به تنهایی نیز در نظر گرفته شد که اثر تیمار توئین بر درصد بازدارندگی رشد قارچ *Penicillium digitatum*تفاوت معنی‌داری با تیمار شاهد نداشت.

کارواکرول یک مادهٔ فنولی بوده و بیشترین درصد ترکیبات اسانس مرزه را شامل می‌شود (جدول ۱). مکانیسم احتمالی اثر بازدارنده اسانس مرزه بر رشد قارچ می‌تواند همانند ترکیبات فنولی ناشی از تخریب دیوارهٔ سلولی و سیستم‌های آنزیمی قارچ باشد، همچنین کارواکرول موجود در این اسانس موجب از بین رفتن انسجام غشای پلاسمایی، نشت درون‌سلولی ATP، یون‌های پتاسیم و در نهایت مرگ یاخته‌ای بیمارگر می‌شود (Pank *et al*., 2004). در پژوهشی قدرت مهارکنندگی و میکروب‌کشی اسانس گیاه مرزه مشخص شد و احتمال داده‌اند که این خواص به دلیل حضور کارواکرول زیاد در اسانس است (Tahmasbpour *et al*., 2015)؛ و همچنین در تحقیقی اثر اسانس مرزه روی باکتری‌ها (گرم منفی و گرم مثبت) و قارچ *Candida albicans* گزارش شد (Moradian *et al*., 2013) که یافته‌های ما مطابق با نتایج این پژوهش‌ها بود.

استفاده از اسانس مرزه می‌تواند روشی ایمن، ارزان و کاربردی برای کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی باشد و با توجه به عدم نگرانی از باقی ماندن سموم شیمیایی و اثرات زیان‌بار آن‌ها بر روی محصولات کشاورزی و با توجه به کنترل بیماری، وضعیت محصول از لحاظ کیفیت و مشتری‌پسندی به‌مراتب بهتر می‌شود. با توجه به نتایج آزمایش غلظت ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر اسانس مرزه چون بیشتر از ۹۰ درصد بازدارندگی رشد قارچی را داشتند مصرف آن از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه است و در مراحل بعد جهت کنترل کپک سبز لیموترش در شرایط کشت درون بدنی لیموترش مناسب است.

جدول ۲- درصد بازدارندگی *Penicillium digitatum* در تیمارهای مختلف اسانس مرزه طی مدت ۸ روز در محیط درون شیشه‌ای در ۲۵ درجه سلسیوس

تیمار و دوره انبارداری (روز)	۲	۴	۶	۸
شاهد	۰/۰۰^{g}*	۰/۰۰^{g}	۰/۰۰^{g}	۰/۰۰^{g}
توئین	۵/۳۳$^{e-g}$	۳/۹۳$^{e-g}$	۲/۱۰^{fg}	۱/۴۹^{fg}
اسانس ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر	۱۴/۱۰^{e}	۱۲/۲۶^{ef}	۹/۰۹$^{e-g}$	۷/۲۰$^{e-g}$
اسانس ۴۰۰ میکرولیتر در لیتر	۶۲/۰۶^{d}	۶۰/۸۹^{d}	۵۹/۵۰^{d}	۵۷/۱۰^{d}
اسانس ۶۰۰ میکرولیتر در لیتر	۸۶/۹۹^{bc}	۸۵/۰۵^{c}	۸۳/۰۰^{c}	۸۲/۶۲^{c}
اسانس ۸۰۰ میکرولیتر در لیتر	۹۷/۱۸^{ab}	۹۷/۲۷^{ab}	۹۶/۵۳^{ab}	۹۱/۲۸$^{a-c}$
اسانس ۱۰۰۰ میکرولیتر در لیتر	۱۰۰/۰۰^{a}	۱۰۰/۰۰^{a}	۱۰۰/۰۰^{a}	۱۰۰/۰۰^{a}
اسانس ۱۲۰۰ میکرولیتر در لیتر	۱۰۰/۰۰^{a}	۱۰۰/۰۰^{a}	۱۰۰/۰۰^{a}	۱۰۰/۰۰^{a}

* در هر ستون داده‌های با حروف یکسان از نظر آماری در سطح احتمال ۵٪ آزمون دانکن معنی‌دار نیستند

منابع

Alpsoy, L. 2010. Inhibitory effect of essential oil on aflatoxin activities. African Journal of Biotechnology, 9(17), 2474-2481.

Bezić, N., Šamanić, I., Dunkić, V., Besendorfer, V., & Puizina, J. 2009. Essential oil composition and internal transcribed spacer (ITS) sequence variability of four South-Croatian Satureja species (Lamiaceae). Molecules, 14(3), 925-938.

Dikbas, N., Kotan, R., Dadasoglu, F., & Sahin, F. 2008. Control of *Aspergillus flavus* with essential oil and methanol extract of *Satureja hortensis*. International Journal of Food Microbiology, 124(2), 179-182.

Moradian, H., Bazargani, A., Rafiee, A., & Nazarialam, A. 2013. In vitro comparison of antimicrobial activity of aqueous decoction of *Coriandrum sativum*, and Dentol Drop with chlorhexidine on Streptococcus mutans. Iranian Journal of Microbiology, 5(3), 239.

Pank, F., Pfefferkorn, A., & Kruger, H. 2004. Evaluation of a summer savory collection (*Satureja hortensis* L.) with regard to morphology, precocity, yield components and essential oil and carcacrol content. Zeitschrift Fur Arznei Und Gewurzpflanzen, 72-78.

Plaza, P., Sanbruno, A., Usall, J., Lamarca, N., Torres, R., Pons, J., & Viñas, I. 2004. Integration of curing treatments with degreening to control the main postharvest diseases of clementine mandarins. Postharvest Biology and Technology, *34*(1), 29-37.

Tahmasbpour, E., Mohammadpour, G., Tahmasbpour, R., Noureini, S., & Bagherpour, G. 2015. In vitro antimicrobial and cytotoxicity assays of *Satureja bakhtiarica* and *Zataria multiflora* essential oils. American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, 3(6), 502-511.

In Vitro Control of *Penicillium digitatum* Using Savory Essential Oil

Sara Atrash[1*], Asghar Ramezanian[2], Majid Rahemi[3]

[1] M.Sc. Graduated of Horticultural Science, Shiraz University
[2] Associate Professor, Dept. Horticultural Science, Shiraz University
[3] Professor, Dept. Horticultural Science, Shiraz University
[*]*Corresponding Author: atrashsara2020@gmail.com*

Abstract

Green mold due to *Penicillium digitatum* is one of the most important citrus diseases in Iran. In this research, *Satureja hortensis* essential oil was used to control green mold generating fungus in in vitro condition. The aerial parts of *Satureja hortensis* was used for essential oil extraction with distillation method using Clevenger apparatus. The *Penicillium digitatum* separated from infected lime fruit and was cultured on PDA medium treated with different concentrations of the savory essential oil (0, 200, 400, 600, 800, 1000 and 1200 µl L^{-1}) with 3 replications. Tween 80 was used as emulsifier at concentration of 0.5 ml L^{-1} of culture medium. Culture media was incubated at 25 °C. Colonies diameter was measured every 48 hours up to 8 days to measure the fungus growth in different concentrations of essential oil. Based on the results obtained from the GC-MS, the main components of savory essential oil were carvacrol (55.76%), terpinene (31.98%), and α- Terpinene (3.75%). *Satureja hortensis* essential oil at concentrations of 1000 and 1200 µl l^{-1} of PDA culture medium prevented the growth of *Penicillium digitatum* colonies. Lower concentrations of essential oil decreased fungal growth but did not suppress colonies growth completely.

***Keywords*: Carvacrol, Green Mold, Growth Inhibition Percent**