آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۸۰، شماره ۱، شهریور ۱۳۹۱

اثر پنج اسانس گیاهی بر تولید زرالنون و رشد *Fusarium graminearum*

سودابه حسینیه فراهانی[۱]، منصوره میرابوالفتحی[۲]✉، یونس رضایی دانش[۳] و روح الله کرمی اسبو[۲]
۱- گروه بیماری‌شناسی گیاهی دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان
۲- آزمایشگاه تحقیقات مایکوتوکسین‌ها، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور؛ ۳- عضو هیئت علمي دانشگاه ارومیه
(تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۰؛ تاریخ پذیرش: مرداد ۱۳۹۱)

چکیده

زرالنون مایکوتوکسین استروژنیک غیر استروئیدی است که سبب بروز اختلال در فعالیت دستگاه تناسلی و سرطان می‌شود و مهم‌ترین گونه تولید کننده آن *Fusarium graminearum* می‌باشد. در این تحقیق اثر ضد قارچی و توکسین‌زدایی اسانس‌های آویشن (*Thymus vulgaris*)، نعناع(*Mentha sativa*)، مرزه(*Satureja hortensis*)، شوید(*Anethum graveolens*) و فلفل قرمز (*Capsicum annum*) با غلظت‌های ۲۵ µl/100 ml– ۲۵۰ به محیط کشت PDA و در غلظت‌های ۱۰–۲۰۰ µl/100 ml به محیط کشت PDB افزوده شد. درصد بازدارندگی از رشد هیف جدایه‌ها بعد از هفت روز در دمای ۲۵°C با اندازه گیری قطر رویش در محیط جامد و توزین وزن خشک توده میسلیومی در محیط مایع در مقایسه با شاهد محاسبه گردید. اثر اسانس‌های فوق با غلظت‌های ۸۰ µl/100 ml – ۵۰۰۰ در محیط PDB بر تولید زرالنون بررسی و میزان زرالنون تولید شده با دستگاه HPLC اندازه‌گیری شد. بازدارندگی کامل از رشد قارچ در محیط PDB برای آویشن، نعناع، مرزه و شوید به ترتیب در غلظت های µl/100 ml ۸۰، ۲۰۰، ۱۵۰و ۲۰۰ محیط کشت رخ داد. غلظتهای مختلف اسانس فلفل قرمز هیچ گونه اثر بازدارندگی از رشد نداشت. تولید زرالنون به میزان ۸۸٪، ۸۷٪، ۹۱٪، ۸۹٪ و ۹۳٪ به ترتیب در محیط حاوی اسانس‌های آویشن، نعناع، مرزه، شوید و فلفل قرمز کاهش یافت.
واژه‌های کلیدی: اسانس‌های گیاهی، *Fusarium graminearum*، زرالنون.

Effect of five essential oils on zearalenon production and growth of *Fusarium graminearum*

S.H. HOSEINIYEH FARAAHANI[1], M. MIRABOLFATHY[2]✉, H. REZAIE DANESH[3] and R. KARAMI OSBOO[2]
1-Department of Plant Pathology Islamic Azad University, Damghan Branch, Iran; 2-Mycotoxins Research Lab., Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran; 3- Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Uromie University, Iran

Abstract

Zearalenone is an estrogenic mycotoxin that causes vulvovaginitis and estrogenic responses and cancer which produces by *Fusarium* species specially *Fusarium graminearum* Schwabe. The antifungal effects of *Thymus vulgaris, Satureja hortensis*, *Anethum grareolens*, *Mentha sativa* and *Capsicum annum* essential oils were studied on the growth *of Fusarium graminearum* and zearalenone production. The essential oils were added to PDA medium at the concentrations of 25 to 250 with interval 25 µl/100 ml and at the concentrations of 10 to 80 with interval 10 and 100 to 200 with interval 25 µl/100 ml to PDB medium and one treatment as the control including *Fusarium graminearum* isolate without essential oil. The radial growth rate of the *Fusarium graminearum* isolate of each PDA medium treatment and the dried weight of its mycellial mass in each PDB medium were measured after incubation for seven days at 25°C. Zearalenone production of *Fusarium graminearum* isolate treated with *Thymus vulgaris, Satureja hortensis, Anethum grareolens, Mentha sativa* and *Capsicum annum* essential oils at the concentrations of 80,150,200,200 and 5000µl/100 ml PDB medium including the control treatment growing *Fusarium graminearum* without any essential oil were evaluated using HPLC. The experiments were done two times in three replicates. The most inhibitory effects of essential oils on the mycellial mass weights in PDB media were obtained at the concentrations 80, 150, 200, 200µl/100 ml of *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis*, *Anethum grareolens* and *Mentha sativa* treatments respectively which caused absolute mycelial growth inhibition of *Fusarium graminearum* in compare with the dried weight of mycelia mass of the control treatment (0.4g). *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis*, *Anethum grareolens*, *Mentha sativa* and *Capsicum annum* at the concentrations of 80, 150, 200 and 200µl/100 ml reduced zearalenone production 88%,87%,91%,89% and 93% respectively.
Key words: Essential oils, *Fusarium graminearum,* Zearalenone

✉ **Corresponding author:** mmirab2000@yahoo.com

مقدمه

استفاده از گیاهان دارویی جهت درمان بیماری‌ها و ناراحتی‌های جسمی از قدیم الایام رواج داشته است (Bazgir *et al.* 2008) و در دهه‌های اخیر با توجه به عوارض جانبی استفاده از داروهای شیمیایی گرایش برای مصرف گیاهان دارویی افزایش یافته است (Karaman *et al.*, 2001). در سال ۲۰۰۰ حدود ۶۰ میلیارد دلار درآمد کشورها از فروش گیاهان دارویی بوده است و ۲۵ درصد داروهای مدرن از گیاهان دارویی ساخته شده‌اند (Tzortzakis *et al.*, 2007). کشور ایران با شرایط آب و هوایی متنوع جایگاه تنوع گیاهان مختلف ازجمله گیاهان دارویی است. اسانس‌ها ترکیبات معطری هستند که در اندام‌های مختلف گیاهان یافت می‌شوند. آن‌ها مخلوطی از مواد مختلف با ترکیب شیمیایی متفاوت هستند که بوی بسیار قوی دارند و در دمای محیط و مجاورت هوا تبخیر می‌شوند و به همین دلیل به آن‌ها روغن‌های معطر فرار و یا اسانس‌های روغنی می‌گویند (Marin *et al.*, 2004). این ترکیبات به طور کامل در الکل حل می‌شوند و در آب غیر قابل اختلاط هستند، وزن مخصوص اسانس‌ها از آب کمتر است و هنگام استخراج بی رنگ می‌باشند (Singha *et al.*, 2006). اسانس‌ها علاوه بر خاصیت ضد میکروبی دارای خواص ضد انگلی، ضد تولید سم، ضد اکسایش نیز هستند که این ویژه گی‌ها در ارتباط با نوع ماده موثره موجود در اسانس است (Zaringhalam *et al.*, 2007). در بین گیاهان دارویی شناخته شده گیاهانی که ترکیبات فنلی بیشتری در اسانس آن‌ها وجود داشته باشد خاصیت ضد میکروبی قابل توجهی دارند (Antonov *et al.*, 1998). اسانس‌ها در تهیه حشره کش‌ها و لوازم آرایشی وبهداشتی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ultee *et al.*, 1999).

طبق تخمینی که در دنیا زده شده است، ۲۵٪ آلودگی‌های مایکوتوکسینی فراورده‌های غلات توسط گونه‌های مختلف فوزاریوم به جود می‌آیند (Atanda *et al.*, 2007). میزان داکسی نیوالنول تولید شده در ۲۰۰ گرم دانه‌های برنج و ذرت آلوده شده به قارچ *Fusarium graminearum* به ترتیب ۱۱۶ و ۶۵ میلی‌گرم بوده است (He *et al.*, 2007).

زرالنون (ZON) مایکوتوکسین استروژنیکی برخی از گونه‌های فوزاریوم به ویژه *F. graminearm* است که در ساقه، پوست و دانه غلات تولید می‌شود (Ezekiel *et al.*, 2008). گونه‌های دیگر فوزاریم نیز به همراه سایر مایکوتوکسین‌ها زرالنون تولید می‌کنند (Paster *et al.*, 2004). زرالنون در گندم، جو، یولاف، ذرت و سایر غلات نواحی مختلف جهان و اخیراً در سویا، سورگوم، علوفه یافت شده است. این مایکوتوکسین در سیلو نیز تولید می‌شود (Regina *et al.*, 2006). زرالنون در غلظت کمتر از۱۰µg/ml به صورت بازدارنده انتقال در غشای سلول گیاهی عمل می‌کند، ولی در غلظت یک صدم مولار موجب غیر قطبی شدن غشای پلاسمایی سلول‌های گندم و ذرت گردیده و سبب نشت الکترولیت‌ها از بافت ریشه می‌شود (Zinedine *et a*l., 2007). رطوبت بالا در انبار غلات آلوده به *F. gramienarum* نیز به بالا رفتن میزان زرالنون و دیگر میکوتوکسین‌ها کمک می‌کند (Mirocha and Christensen, 1974). زرالنون سبب هیپر استروژنیسم در گاوها و بخصوص در هر دو جنس خوک می‌شود، دیگر عواقب آن در حیوانات به صورت کاهش میل جنسی، عقیم شدن، سقط جنین، بزرگ شدن رحم، غدد پستان، تغییر شکل تخمدان‌ها و بیضه‌ها و تغییر شکل واژن بروز کرده است. (Mirocha and Christenesn, 1974)، به دلیل اثرات سوء هورمونی زرالنون برسلامت انسان و حیوانات، آلودگی تولیدات گیاهی به زرالنون در مقادیر بیش از ۰/۲ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، غیر مجاز می‌باشد. زرالنون در دماهای بالا پایدار است، حدود ۶۰٪ زرالنون موجود در آرد بعد از پخت نان و ۸۰٪ آن در طی تولید بیسکویت در آن حفظ شده است (Rabert and Chooi, 2008).

اثر اسانس گیاهان Ajwain و *Myristica fragrans* به روش اختلاط با محیط کشت بر قارچ *F. graminearum* بررسی و نشان داده شده که در غلظت ۶ میکرولیتر در میلی‌لیتر باعث

جلوگیری کامل از رشد قارچ شده است (Singh *et al*., 2004). همچنین اثر اسانس گیاه *Foeniculum vulgare* در غلظت‌های ۶ میکرولیتر در میلی‌لیتر باعث جلوگیری کامل از رشد قارچ *F. graminearum* شده است (Singh *et al*., 2006)، در حالیکه اثر اسانس گیاه *Rosmarinus officinalis* L. در غلظت‌های ۴۵۰ و ۹۰۰ میکرولیتر در میلی‌لیتر بر قارچ *F. graminearum* سبب تحریک رشد قارچ شده است (Angioni *et al*., 2004). اثر اسانس گیاه *Melaleuca alternifolia* روی قارچ‌های *F. graminearum*، *F. culmorum*، *Pyrenophora graminea* و *Blumeria graminis* در غلظت‌های 0%، 0.25%، 0.5%، 1%، 2% و 5% بررسی و نشان داده شده است که بیشترین بازدارندگی مربوط به غلظت‌های ۵٪ بوده و در این غلظت بر هر چهار قارچ به میزان یکسانی اثر بازدارندگی داشته است (Terzi *et al*., 2007). لاهوجی و همکاران نشان دادند که اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه سبب بازدارندگی از رشد قارچ فوزاریوم شده و دارای فعالیت قارچ ایستایی هستند، همچنین اثر اسانس آویشن بر رشد جدایه *F. graminearum*، از تأثیر جداگانه هر یک از مواد موثره آن بیشتر بوده است (Lahoji *et al*., 2010).

آثار بازدارندگی اسانس‌های آویشن، میخک و نعناع استرالیایی بر رشد میسلیوم قارچ *Botrytis cinerea* مورد بررسی قرار گرفته ونشان داده شده است که اسانس آویشن توانسته است از رشد میسلیوم قارچ جلوگیری نماید (Lee *et al*., 2009). بررسی آثار بازدارندگی برخی از ترکیبات گیاهی نیز بر رشد میسلومی قارچ *Penicillium expansum* نشان داده که ترکیبات مورد بررسی سبب بازدارندگی کامل از رشد قارچ نام برده گردیده اند (Neri *et al*., 2006). اثر بازدارندگی اسانس گیاه آویشن در غلظت ۵۰ppm به روش اختلاط با محیط کشت روی قارچ‌های *Fusarium moniliform*، *Aspergillus fumigatus* و *A. flavus* به ترتیب ۱۰۰ ٪، ۹۷/۳٪ و ۹۲/۵٪ بوده است (Nguefack *et al*., 2004)، همچنین اثر اسانس آویشن روی قارچ‌های *Aspergillus flavus*، *A. parasiticus*، *A. ochraceus* در غلظت کمتر از ۵۰۰ppm باعث جلوگیری کامل از رشد قارچ‌ها شده است (Soliman and Badea, 2002).

اضافه نمودن اسانس آویشن در مقادیر ۶۰۰ و ۹۰۰ میکرولیتر بر لیتر در ظروف پتری حاوی محیط کشت و تماس مستقیم اسانس با کلنی قارچ *A. flavus* سبب حداکثر فعالیت ضد قارچی شده است (Thanaboripat *et al*., 2007). حداقل غلظت بازدارندگی آویشن بر قارچ *Aspergillus parasiticus*، ۲۰۰ میکروگرم در لیتر و زنیان ۳۰۰ میکروگرم در لیتربوده است (Maskouki *et al*., 2005).

در تحقیق حاضر اثر پنج اسانس گیاهی که با ذائقه مردم ایران سازگار است و در سال‌های اخیر بیشترین سطح زیر کشت مزارع گیاهان دارویی را به خود اختصاص داده است بر قارچ مولد زرالنون و زرالنون به عنوان مایکوتوکسین مضر برای سلامت انسان بررسی شده است زیرا امکان افزودن این مواد به گندم و فرآورده‌های آن که غذای اصلی مورد مصرف مردم است فراهم می باشد. رشد قارچ مولد این مایکوتوکسین و تولید آن در شرایط نامناسب انبار و مراحل فرآوری پس از برداشت مانند تهیه آرد ویا فرآورده‌های دیگر گندم تا نان نیز ادامه می یابد و در این راستا امکان کاربرد اسانس‌ها در مراحل اخیرالذکر با افزودن به گندم و فرآورده‌های مورد مصرف انسان گام بعدی خواهد بود.

روش بررسی

۱- اسانس‌های مورداستفاده: اسانس‌های آویشن، نعناع، شوید، مرزه و فلفل قرمز از شرکت باریج اسانس کاشان که با روش تقطیر با آب و در مقیاس صنعتی بدست آمده بودند، تهیه گردید. اسانس‌های بدست آمده در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سلسیوس تا زمان استفاده نگهداری شد.

۲- جدایه‌های قارچی: جدایه‌های قارچی این تحقیق شامل جدایه‌های استاندارد *F. graminearum* بودند که از آزمایشگاه تحقیقات مایکوتوکسین‌های، موسسه تحقیقات گیاهپزشکی تهیه گردید (Rezaeian *et al*., 2011).

۳- بررسی بازدارندگی از رشد: اثر بازدارندگی اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید و فلفل قرمز بر رشد دو جدایه منتخب مولد زرالنون *F. graminearum* ضمن اختلاط اسانس‌ها با محیط‌های کشت PDA (potato dextrose agar) و PDB(potato dextrose broth) ارزیابی شد.

۳- ۱- اختلاط با محیط کشت PDA و PDB: به این منظور ابتدا اسانس‌های فوق الذکر با توئین- ۸۰ به نسبت حجمی ۰/۵٪ v/v درصد مخلوط شد و بعد از اتوکلاو نمودن محیط کشتPDA، غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۱۰، ۲۳۰ و ۲۵۰ میکرولیتر از آن‌ها با ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت مخلوط شد (Grover and Moore, 1962). در این بررسی از توئین- ۸۰، ۰/۵٪ v/v درصد فاقد اسانس برای تیمار شاهد استفاده گردید، اسانس‌ها با همزدن در محیط کشت پخش شدند، محیط کشت حاصل در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و در حالت مایع، درون ظروف پتری (به قطر ۹ سانتی‌متر) توزیع گردید و پس از منعقد شدن دیسک‌های قارچی هفت روزه جدایه‌های ذکر شده با قطر ۵ میلی‌متر در مرکز هر یک از تشتک‌های پتری به صورت معکوس گذاشته شد. تشتک‌های پتری مایه زنی شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. پس از گذشت هفت روز قطر رشد هر جدایه اندازه گیری شد. در انجام این آزمایش برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد و آزمایش دو بار تکرار گردید.

برای بررسی اثر ضد قارچی اسانس‌های مذکور در محیط کشت PDB در فلاسک‌های ۲۵۰ میلی‌لیتری ۳۰ میلی‌لیتر، محیط کشت PDB ریخته شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه و فشار ۱/۵ اتمسفر اتوکلاو شد پس از سرد شدن محیط مقادیر ۷۰، ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵ و ۲۰۰ میکرولیتر اسانس به آن‌ها اضافه شد و به آرامی تکان داده شد. سپس تعداد ۳ دیسک قارچی به قطر ۵ میلی‌متر از کشت هفت روزه دو جدایه فوق *F. graminearum* در هریک از فلاسک‌ها انداخته شد. فلاسک‌های مایه زنی شده در انکوباتور و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و بعد از گذشت ۱۰ روز وزن خشک میسلیوم هر تیمار اندازه گیری شد. در انجام این آزمایش برای هر تیمار ۳ تکرار در نظر گرفته شد وآزمایش دو بار تکرار گردید.

۳- ۲- درصد بازدارندگی از رشد: درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس با بهره گیری از فرمول ارائه شده توسط پندی و همکاران (Pandey *et al.*, 1982) محاسبه شد.

$$100\times \%\ GI = (dc - dt / dc)$$

Growth Inhibition=GI

باز داری از رشد (میلی‌متر)

dc = diameter control

میانگین قطر رشد قارچ در تیمار شاهد (میلی‌متر)

dt = diameter treatment

میانگین قطر رشد قارچ در تیمار مورد بررسی (میلی متر)

۳- ۳- تعیین خاصیت قارچ ایستایی یا قارچ کشی اسانس: برای تفکیک اثر قارچ ایستایی از قارچ کشی اسانس‌ها، از روش ارائه شده توسط تامسون (Thomson, 1989) استفاده شد. بدین منظور قطعه محیط کشت حاوی قارچ که در تیمار اسانس و یا ماده موثره هیچ گونه رشدی نداشت به محیط کشت PDA فاقد اسانس منتقل شد، در صورتیکه قطعه مذکور پس از هفت تا ده روز در محیط فاقد اسانس رشد می کرد این امر به عنوان ویژه گی قارچ ایستایی اسانس ارزیابی می‌گردید، همچنین حداقل غلظت بازدارندگی نیز تعیین گردید.

۴- تأثیر اسانس‌های مختلف بر تولید زرالنون یا غیر فعال سازی آن:

۴-۱- اندازه‌گیری زرالنون(ZON): بدین منظور محیط کشت مایع حاوی رشد ده روزه جدایه‌های توکسین زای *F. graminearum* تیمار شده با اسانس‌های آویشن، نعناع، شوید، مرزه و فلفل قرمز و تیمار بدون اسانس (شاهد)، به مدت سه دقیقه در مخلوط کن همراه ۷۰ میلی‌لیتر متانول ۷۰٪ مخلوط شده و با عبور از کاغذ صافی واتمن شماره ۱ به کمک پمپ خلأ صاف و عصاره صاف شده استخراج گردید. سپس دو میلی‌لیتر از آن با هشت میلی‌لیتر بافر فسفات (PBS) مخلوط ودر نهایت ۵ میلی‌لیتر از این عصاره از ستون‌های ایمنو افینیتی

اختصاصی زرالنون ساخت شرکت R. BiopharmRhone (Easy- extract®zearalenone) عبور داده شد، سپس ستون با شش میلی‌لیتر بافر PBS، شستشو داده شد و زرالنون چسبیده به ستون با ۱/۶ میلی‌لیتر متانول از ستون خارج، جمع آوری و ۱/۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه به لوله آزمایش اضافه شد و پس از ۳ دقیقه ورتکس به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا تزریق شد.

۴-۲- اندازه‌گیری زرالنون با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا: به این منظور از استانداردهای ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانو گرم در میلی‌لیتر زرالنون برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. استاندارد زرالنون به صورت خالص از شرکت سیگما خریداری و پنج میلی گرم استاندارد زرالنون در پنج میلی‌لیتر استونیتریل حل شد تا استاندارد ۱mg/ml بدست آمد از محلول استاندارد اخیر استانداردی با غلظت ۱۰۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر در حلال استونیتریل ساخته شد. تعیین غلظت این استاندارد توسط اسپکترومتر شرکت Perkin Elmer (UV/Vis Spectrometer Lamda 25) در طول موج ۲۷۲ nm صورت گرفت و با استفاده از این استاندارد، استانداردهایی با غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰ و ۲۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر در حلال متانول ۴۰٪ ساخته شد. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از هر نمونه استاندارد به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Waters 1525)، دارای پمپ Breeze، دتکتور فلورسانس، تزریق کننده خودکار ۷۱۷، ستون فاز معکوس C18 با ابعاد ۱۵۰× ۴/۶ میلی متر و اندازه ذرات 5µm ساخت کارخانه (Waters Milford, MA, USA) تزریق شد. فاز متحرک متانول ۶۰٪ و سرعت عبور آن از سیستم 1ml/minبود. میزان زرالنون در طول موج ۲۷۲ nm، با استفاده ازنرم افزار Breeze و محاسبه سطح زیر منحنی کروماتوگرام نمونه تزریق شده در مقایسه با منحنی کالیبراسیون مختص همان آزمایش محاسبه گردید و برای هر نمونه مدت زمان ۱۵ دقیقه در نظر گرفته شد (شکل ۱).

۵- تجزیه و تحلیل داده‌ها: در این تحقیق از طرح کاملاً تصادفی و آزمایش فاکتوریل با طرح پایه کاملاً تصادفی برای بررسی اثرات ساده استفاده شد و برای تجزیه واریانس و گروه بندی میانگین تیمارها از نرم افزار F-LSD، آزمون چند دامنه‌ای دانکن استفاده گردید (Alizadeh and Tarinejad, 2002) و نرمال بودن اعداد در برنامه مینی‌تب (Minitab 15) و آزمون Kolmogorov- Smirnov به اثبات رسید.

نتیجه و بحث

۱- تأثیر اسانس‌های مختلف بر بازدارندگی از رشد در محیط PDA: نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از آزمون اثر غلظت‌های متفاوت اسانس گیاهان مختلف بر بازدارندگی از رشد جدایه *F. graminearum* در محیط PDA نشان داد که اثرات نوع اسانس، غلظت اسانس و نیز اثر متقابل نوع اسانس در غلظت آن در سطح آماری ۰/۰۵ معنی‌دار می‌باشد.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکرولیتر اسانس آویشن در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بر رشد جدایه *F. graminearum* در محیط جامد نشان داد، بین غلظت‌های متفاوت اسانس آویشن در سطح ۹۹٪ تفاوت معنی‌داری وجود داشته و مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی آن نشان داد که می‌توان غلظت‌ها را در چهار گروه مختلف قرار داد. غلظت‌های ۱۰۰تا ۲۵۰ میکرولیتر، دارای ۱۰۰٪ بازدارندگی بوده و از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند و درگروه a قرار گرفتند. پس از آن غلظت‌های ۷۵، ۵۰ و ۲۵ میکرولیتر از این اسانس به ترتیب در گروه‌های مجزا (b, c, d) و با درصدهای بازدارندگی به ترتیب ۷۷/۴۱٪، ۶۷/۴۱٪ و ۵۵/۹۳٪ بودند (جدول۱). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ در محیط جامد و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین (R^2=96%) و معادله: Y= 0.576x+38.66، وجود دارد که نشان دهنده رابطه

عکس بین افزایش غلظت و میزان رشد میسلیوم می‌باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۷۹۷ میلی‌متر از رشد کلنی در محیط کاسته می‌شود.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکرولیتر اسانس مرزه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بر رشد جدایه *F. graminearum* در محیط PDA نشان داد بین غلظت‌های متفاوت آن در سطح ۹۹٪ تفاوت معنی داری وجود دارد و بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در هشت گروه مختلف قرار داد. غلظت‌های ۲۰۰ تا۲۵۰ میکرولیتر بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (۱۰۰٪) و از نظر آماری دارای اختلاف معنی‌داری نمی‌باشند. پس از آن غلظت‌های۱۷۵، ۱۵۰، ۱۲۵، ۱۰۰، ۷۵، ۵۰ و ۲۵ میکرولیتر از اسانس به ترتیب در گروه‌های مجزا (b,c,d,e.f,g,h) با درصد بازدارندگی به ترتیب ۹۵/۹۳، ۸۹/۲۶، ۷۷/۴۱، ۶۶/۸۴،۳۰/۴۴، ۵۵/۶۵ و ۴۵/۹۳ قرار گرفتند (جدول ۱). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس مرزه بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ در محیط جامد و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین (R^2=0.99%) و معادله :Y= 0.3138X-0.40985 وجود دارد که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و میزان رشد میسلیومی می‌باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۳۸میلی‌متر از رشد کلنی در محیط کاسته می‌شود.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۲۵ تا ۲۵۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر اسانس نعناع بر رشد جدایه *F. graminearum*. در محیط جامد نشان داد بین غلظت‌های متفاوت آن در سطح ۹۹٪ تفاوت معنی‌داری وجود دارد و بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در نه گروه مختلف قرار داد. غلظت ۲۵۰ میکرولیتر بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (۱۰۰٪) و در گروه جداگانه a قرار گرفته است، پس از آن غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵،۲۰۰ و ۲۲۵ میکرولیتر از اسانس نعناع که به ترتیب در گروه‌های مجزا (i,h,g,f,e,e,d,c,b) با درصد بازدارندگی به ترتیب ۹/۲۶٪، ۲۱/۵۸٪، ۲۸/۱۵٪، ۳۷/۷۸٪، ۴۴/۰۷٪، ۴۴/۰۷٪، ۶۵/۹۳٪، ۷۹/۲۶٪ و ۸۹/۶۳٪ نسبت به شاهد قرار گرفتند (جدول ۱). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس نعناع بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ در محیط جامد و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین (R^2=0.96%) و معادله Y=-0.3905X-0.3727 وجود دارد که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و میزان رشد میسلیوم می باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۳۵ میلی‌متر از رشد کلنی در محیط کاسته می‌شود.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۲۵ تا ۲۰۰ میکرولیتر اسانس شوید در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بر رشد جدایه *F. graminearum*. در محیط جامد نشان داده شد بین اثر غلظت‌های متفاوت اسانس شوید در سطح ۹۹٪ تفاوت معنی‌داری وجود دارد و بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در هشت گروه مختلف قرار داد. غلظت ۲۵۰ میکرولیتر بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (۱۰۰٪) و در گروه جداگانه a قرار گرفت و پس از آن غلظت‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۲۵، ۱۵۰، ۱۷۵، ۲۰۰ و ۲۲۵ میکرولیتر از اسانس به ترتیب در گروه‌های مجزا (b, c,c,d,e, ,f,g,h,h) با درصد بازدارندگی به ترتیب ۹۱/۸۵٪، ۸۷/۴۱٪، ۷۹/۶۳٪، ۸۷/۱۵٪، ۶۷/۴۰٪، ۶۳/۷۰٪، ۵۳/۷۰٪، ۵۰/۷۳٪ و ۵۰/۷۴٪ نسبت به شاهد قرار گرفتند (جدول ۱). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس شوید بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ در محیط جامد و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین (R^2=0.96%) و معادله: Y= 0.3955X- 0.086، برقرار است که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و رشد میسلیوم می‌باشد. در

این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۲۷ میلی‌متر از رشد کلنی در محیط کاسته می‌شود.

۲- تأثیر اسانس‌های مختلف بر بازدارندگی از رشد در محیط PDB: تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۱۰تا۸۰ میکرولیتر اسانس آویشن در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بر رشد جدایه *F. graminearum* در محیط مایع نشان داد بین غلظت‌های متفاوت اسانس آویشن در سطح ۹۵٪ تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین‌های درصد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در هشت گروه مختلف قرار داد.

جدول ۱- اثر غلظت‌های مختلف (µl/100ml) اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع و شوید بر بازدارندگی از رشد in*F. graminearum* (٪) در محیط کشت PDA و گروه‌بندی آماری آن‌ها

Table 1. The effect of different concentrations of five essential oils on inhibition growth (%) of *F. graminearum* in PDA and their statistical groups

غلظت Concentration / اسانس essential oil			25	50	75	100	125	150	175	200	225	250
آویشن *Thymus vulgaris*	میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth		55.93	67.41	77.41	100						
	گروه‌ها Groups		d	c	b	a*						
مرزه *Satureja hortensi*	میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth		45.93	55.65	66.30	77.41	84.44	89.26	95.93	100		
	گروه‌ها Groups		h	g	f	e	d	c	b	a		
نعناع *Mentha sativa*	میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth		9.26	21.58	28.15	37.78	44.07	44.07	65.93	79.26	89.63	100
	گروه‌ها Groups		i	h	g	f	e	e	d	c	b	a
شوید *Anethum grareolen*	میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth		50.73	50.74	53.70	63.70	67.40	79.63	87.15	87.41	91.85	100
	گروه‌ها Groups		h	h	g	f	e	d	c	c	b	a

* میانگین‌های دارای حروف مشترک در هر ردیف سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند.

The same letters in each row are not significantly different at the 0.01 probability level.

غلظت ۸۰ بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (۱۰۰٪) و پس از آن غلظت‌های۷۰، ۶۰، ۵۰، ۴۰، ۳۰، ۲۰ و ۱۰ میکرولیتر از اسانس به ترتیب در گروه‌های مجزا b، c، d، e، f، g، h به ترتیب با درصد بازدارندگی ۸۹/۵۲٪، ۸۴/۲۳٪، ۸۰/۹۰٪، ۷۸/۱۱٪، ۵۳/۵۹٪، ۴۵/۵۱٪ و ۹/۲۶٪ نسبت به شاهد قرار گرفتند (جدول ۲). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ در محیط جامد و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین (R^2=0.79%) و معادله Y= 0.168X-0.0025، که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و میزان وزن میسلیوم می باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۰۰۲۵ میلی گرم از وزن توده میسلیوم در محیط کاسته می‌شود.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۵۰ تا ۱۵۰ میکرو لیتر اسانس مرزه در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع بر رشد جدایه *F. graminearum* نشان داد بین غلظت‌های متفاوت اسانس مرزه در سطح ۹۵٪ تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در پنج گروه مختلف قرار داد. غلظت ۱۵۰ بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (۱۰۰٪) و پس از آن غلظت‌های ۱۲۵، ۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ به ترتیب در گروه‌های مجزا e،d،c،b با درصد بازدارندگی ۹۷/۲۰٪، ۹۴/۷۲٪، ۵۵/۹۹٪ و ۲۱/۸۶٪، نسبت به شاهد قرار گرفتند (جدول ۳). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس مرزه بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ در محیط مایع و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین (R^2=0.92%) و با معادله: Y= 0.239X-0.0018، که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و وزن میسلیوم می‌باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۰۰۱۸ میلی گرم از وزن توده میسلیوم در محیط کاسته می‌شود.

تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های۵۰ تا ۲۰۰ میکرو لیتر اسانس نعناع در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط مایع بر رشد *F. graminearum* نشان داد بین غلظت‌های متفاوت اسانس نعناع در سطح ۹۵٪ تفاوت معنی‌داری وجود دارد. بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی می‌توان غلظت‌ها را در شش گروه مختلف قرار داد. غلظت ۲۰۰ بیشترین درصد بازدارندگی را داشته (۱۰۰٪) و پس از آن غلظت‌های ۱۷۵، ۱۵۰، ۱۲۵، ۱۰۰، ۷۵ و ۵۰ به ترتیب در گروه‌های مجزا c,d b,،e،e،f به ترتیب با درصد بازدارندگی ۹۷/۲۰٪، ۸۴/۹۰٪، ۵۵/۹۹٪، ۵۴/۲۸٪، ۴۷/۸۹٪، ۴۳/۹۹٪ و ۴۰/۹۵٪ نسبت به شاهد قرار گرفتند (جدول ۳). تجزیه رگرسیونی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس نعناع بر درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ در محیط جامد و برازش معادله نشان داد که بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ رابطه‌ای خطی با ضریب تبیین (R^2=0.69%) و معادله Y= 0.162X-0.0011 وجود دارد که نشان دهنده رابطه عکس بین افزایش غلظت و وزن توده میسلیوم می‌باشد. در این مدل به ازای افزایش هر یک پی پی ام بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۰۰۱۱ میلی‌گرم از وزن توده میسلیوم در محیط کاسته می‌شود. تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۲۵ تا۲۰۰ میکرولیتر اسانس شوید بر رشد *F. graminearum* در محیط مایع نشان داد بین غلظت‌های متفاوت اسانس شوید در سطح ۹۵٪ تفاوت معنی‌داری وجود دارد.

بر اساس مقایسه میانگین‌های در صد بازدارندگی اسانس شوید در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر بیشترین بازدارندگی را ایجاد نموده است و با سایر غلظت‌ها دارای تفاوت معنی‌داری بوده و با ۱۰۰٪ بازدارندگی در گروهی مجزا قرار گرفت. کمترین میزان بازدارندگی نیز در غلظت ۵۰ بود که سبب ۵۵/۴۹ ٪ بازدارندگی نسبت به شاهد شد. مدل رگرسیونی بدست آمده برای اسانس شوید از نوع درجه اول و خطی Y=-0.188X-0.0011 بوده که نشان دهنده رابطه عکس افزایش غلظت و وزن توده میسلیومی می‌باشد. در این مدل شیب منفی بوده و به ازای افزایش هر یک ppm بر غلظت اسانس به مقدار ۰/۰۰۱۱ میلی گرم از وزن توده میسلیومی در محیط کاسته می‌شود.

نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس داده‌های حاصل از اثر غلظت‌های ۵۰۰µl/100ml ، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰ ،۳۰۰۰، ۴۰۰۰ و ۵۰۰۰ اسانس فلفل قرمز بر رشد *F. graminearum* در محیط مایع نشان داد تیمارهای اسانس فلفل قرمز در غلظت‌های متفاوت هیچ گونه اثر بازدارندگی بر رشد جدایه مذکور نداشته و همه غلظت‌ها در یک گروه قرار گرفتند.

بر اساس آزمایش‌های انجام شده کمترین غلظت لازم برای بازدارندگی از رشد جدایه *F. graminearum* در محیط کشت جامد برای اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع و شوید برابر ۲۵µl/100ml بود، در حالی که این غلطت در محیط کشت

مایع برای آویشن ۱۰ و برای مرزه، نعناع و شوید ۵۰µl/100ml بود.

۲-تأثیر اسانس‌های مختلف بر کاهش تولید زرالنون: در این آزمایش غلظت بازدارندگی کامل از رشد *F. graminearum* اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید و غلظت‌های مختلف فلفل قرمز در محیط مایع استفاده شد و میزان زرالنون تولید شده توسط قارچ در هر یک از تیمارها اندازه گیری شد. بر اساس نتایج حاصل همه اسانس‌های فوق الذکر سبب کاهش تولید زرالنون توسط جدایه ذکر شده گردیدند. بیشترین بازدارندگی مربوط به فلفل قرمز با ۹۳٪ بازدارندگی و کمترین بازدارندگی مربوط به اسانس مرزه با ۸۷٪ کاهش تولید زرالنون بود. میزان بازدارندگی از تولید زرالنون توسط غلظت‌های ۸۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰۰ (µl/100ml) برای اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید و فلفل قرمز به ترتیب برابر ۸۸٪، ۸۷٪، ۸۷٪، ۹۱٪، ۸۹٪ و ۹۳٪ بود (جدول ٤ و شکل ۱).

بر اساس نتایج این تحقیق بین غلظت‌های مورد استفاده هر یک از اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید و بازدارندگی از رشد میسلیوم *F. graminearum* رابطه‌ای خطی وجود دارد به طوری که به ازای افزایش هر یک ppm از غلظت اسانس‌های فوق در محیط جامد به ترتیب ۰/۷۹۷، ۰/۳۸، ۰/۳۵ و۰/۲۷ میلی متر از رشد هیف کاسته شده است. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود آویشن در همه غلظت‌های استفاده شده بیشترین تأثیر را داشته است، در مورد غلظت‌های ۲۵ و۵۰ که مرزه موثرتر بوده به نظر می‌رسد با مقایسه اثر ۸ غلظت دیگر آن، علت آن عدم توزیع مناسب اسانس آویشن در غلظت پایین در محیط جامد باشد. غلظت ۲۵۰ µl/100ml همه اسانس‌ها در محیط کشت جامد باعث بازدارندگی کامل از رشد شده است (شکل ۲).

منحنی رگرسیونی اثر اسانس‌ها در محیط مایع نیز نشان داد، بین غلظت هر یک از اسانس‌های مورد استفاده و درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم *F. graminearum* در این محیط رابطه‌ای خطی وجود داشته و به ازای افزایش هر یک ppm غلظت اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید در محیط مایع به ترتیب ۰/۰۰۲۵، ۰/۰۰۱۸، ۰/۰۰۱۱ و۰/۰۰۱۱ میلی‌گرم از وزن میسلیوم توده میسلیومی *F. graminearum* کاسته می‌شود. در این محیط نیز آویشن در همه غلظت‌ها بیشترین تأثیر را داشته است و پس از آن اسانس‌های مرزه، نعناع و شوید هستند.

نتایج نشان می‌دهند که اسانس‌های، آویشن با غلظت ۱۰۰µ l/100ml، مرزه با غلظت ۲۰۰µ l/100ml، نعناع و شوید با غلظت ۲۵۰µ l/100ml سبب بازدارندگی کامل از رشد *F. graminearum* در محیط PDA شدند و در محیط PDB به ترتیب با غلظت‌های ۸۰µ ،۱۵۰ ،۲۰۰ l/100ml و ۲۰۰ سبب بازدارندگی کامل از رشد *F. graminearum* شده‌اند (جدول ۵).

از مقایسه غلظت لازم برای بازدارندگی کامل از رشد هیف در دو محیط جامد و مایع به خوبی دریافت می‌شود که غلظت بازدارندگی کامل از رشد هیف در محیط مایع به مراتب کمتر از محیط جامد است که به نظر می‌رسد تماس مستقیم اسانس با هیف علت آن باشد. لاهوجی و همکاران نیز اثر اسانس گیاه آویشن شیرازی را در مهار رشد جدایه‌های *Fusarium graminearum* و کاهش تولید داکسی نیوالنول بررسی نموده و نشان دادند که آویشن شیرازی در غلظت ۱٦µ l/100ml در محیط کشت جامد سبب بازدارندگی کامل از رشد جدایه مورد بررسی گردیده است (Lahoji *et al*., 2010). نتایج حاصل از اثر غلظت‌های ۵۰۰ تا۵۰۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتراسانس فلفل قرمز (*Capsicum annuum*) محیط کشت بر بازدارندگی از رشد جدایه *F. graminearum* در هر دو محیط PDA و PDB نشان داد اسانس فلفل قرمز هیچگونه اثر بازدارندگی بر رشد جدایه *F. graminearum* نداشت.

نتایج نشان داد کلیه اسانس‌ها فعالیت قارچ ایستایی داشتند. نری و همکاران در ایتالیا در بررسی اثر کارواکرول بر *Penicillium expansum* به این نتیجه رسیدند که کارواکرول در پایین‌ترین غلظت بازدارنده خود خاصیت قارچ ایستایی داشته است (Neri *et al*., 2006).

Lahoji *et al*. (2010) نیز نشان داد که اسانس‌های آویشن شیرازی و مرزه با بازدارندگی از رشد قارچ فوزاریوم دارای فعالیت قارچ ایستایی می‌باشند.

جدول ۲- اثر غلظت‌های مختلف اسانس آویشن بر رشد *F. graminearum* در محیط PDB

Table 2. The effect of different concentrations (µl/100ml) of *Thymus vulgaris* essential oils on inhibition growth (%) of *F. graminearum* in PDB and their statistical groups

غلظت Concentration / اسانس essential oil		10	20	30	40	50	60	70	80
آویشن *Thymus vulgaris*	میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth	9.26	45.516	53.599	78.11	80.90	84.23	89.52	100
	گروه‌ها Groups	h	g	f	e	d	c	b	a

میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند

The same letters are not significantly different at the 0.01 probability level

جدول ۳- اثر غلظت‌های مختلف (µl/100ml) اسانس‌های مرزه، نعناع و شوید بر بازدارندگی رشد *F. graminearum*in (٪) در محیط کشت PDB و گروه بندی آماری آن‌ها

Table 3. The effect of different concentrations of *Satureja hortensis, Anethum grareolensand Mentha sativa* essential oils on inhibition growth (%) of *F. graminearum* in PDB and their statistical groups

غلظت Concentration / اسانس essential oil		50	75	100	125	150	175	200
مرزه *Satureja hortensis*	میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth	21.86	55.99	94.72	97.20	100		
	گروه‌ها Groups	e	d	c	b	a		
نعناع *Mentha sativa*	میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth	43.99	47.89	54.28	55.99	84.90	97.20	100
	گروه‌ها Groups	g	f	e	d	c	b	a*
شوید *Anethum grareolens*	میانگین بازدارندگی Mean of inhibition growth	55.49	58.47	74.30	79.20	90.40	95.10	100
	گروه‌ها Groups	g	f	e	d	c	b	a

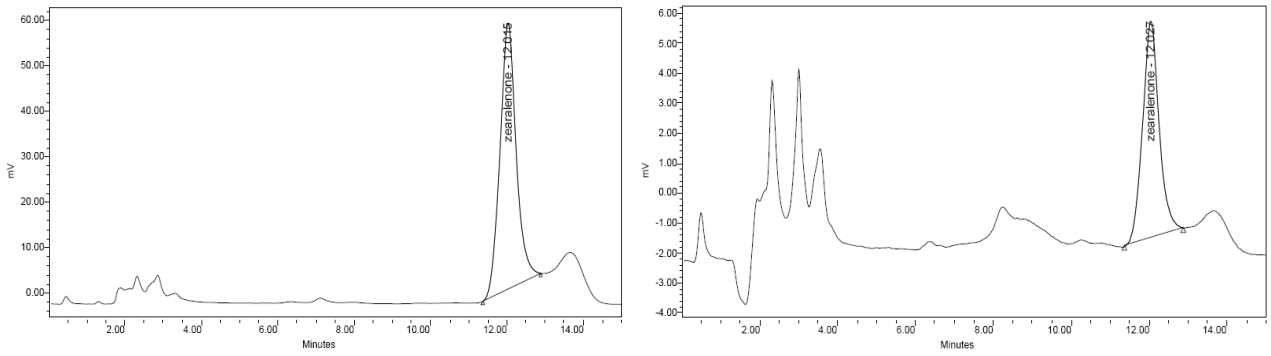
* میانگین‌های دارای حروف مشترک در سطح ۱ درصد اختلاف معنی‌داری ندارند

The same letters are not significantly different at the 0.01 probability level

جدول ٤- میزان کاهش تولید زرالنون (٪) توسط اسانس‌ها

Table 4. The rate of zearalenone reduction (%) by several essential oils in PDB

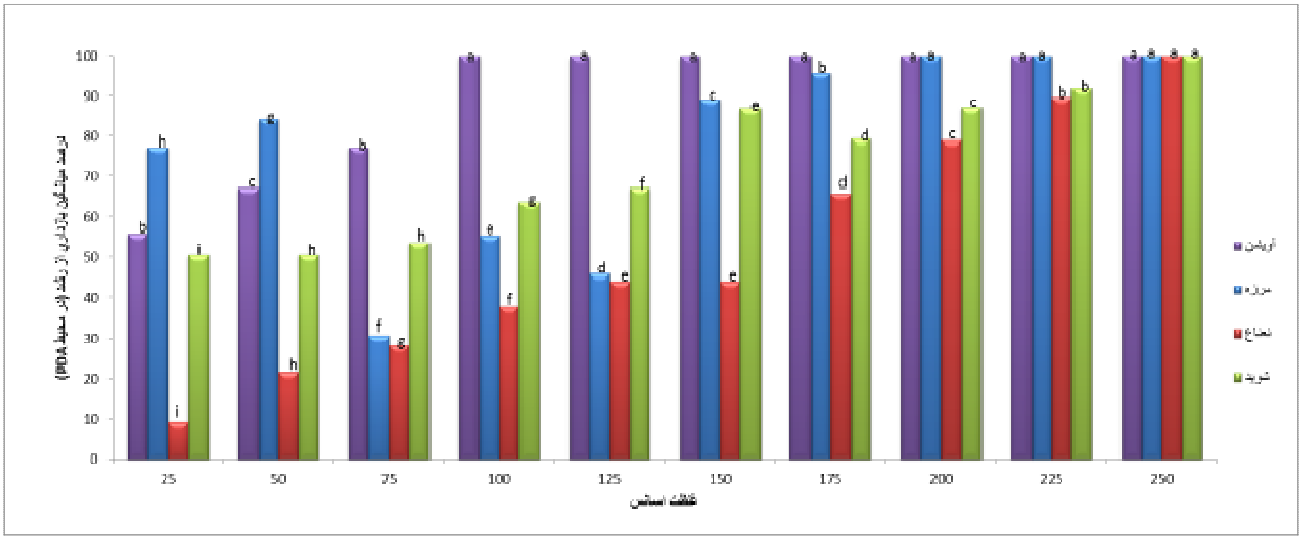
نام اسانس **Essential oil**	آویشن ***Thymus vulgaris***	مرزه ***Satureja hortensis***	نعناع ***Mentha sativa***	شوید ***Anethum grareolens***	فلفل قرمز ***Capsicum annum***
غلظت **concentration µl/100ml**	80	150	200	200	5000
درصد کاهش **Reduction**	88	87	91	89	93



Control ***Capsicum annum***

شکل ۱- کروماتوگرام زرالنون در تیمار آویشن و شاهد فاقد اسانس

Fig. 1. HPLC chromatograms of zearalenon in *Capsicum annum* and control treatments



شکل ۲- نمودار اثر غلظت‌های مختلف اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع و شوید بر بازدارندگی از رشد جدایه *F.graminearum* در محیط PDA

Fig. 2. The effect *of Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis*, *Anethum grareolensand, Mentha sativa* essential oils on inhibition growth of *F. graminearum*in in PDA

جدول ۵– غلظت‌های (µl/100ml) بازدارندگی از رشد کامل *F. graminearum* اسانس‌های مختلف در محیط کشت PDA

Table 5. The absolute mycelial growth ihibition of *F.graminearum* by *Thymus vulgaris*, *Satureja hortensis*, *Anethum grareolens* and *Mentha sativa* essential oils concentrations in PDA and PDB media

اسانس Essential oil / محیط کشت Culture medium	آویشن *Thymus vulgaris*	مرزه *Satureja hortensis*	نعناع *Anethum grareolens*	شوید *Mentha sativa*
PDA	100	200	250	250
PDB	80	150	200	200

Ozcan and Boyraz (2006) نیز در ترکیه نشان دادند که غلظت ۵ میکرولیتر در ٦٠ میلی‌لیتر از اسانس مرزه به میزان ۸۷٪ باعث کنترل *Alternaria mali* و *Botrytis cinerea* شده است. بررسی اثر اسانس گیاه رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) روی میکروارگانیزم‌های مختلف شامل باکتری‌ها، *Candida albicans* و *F. graminearum* نشان داده است که بهترین تأثیر در مورد *F. graminearum* حاصل شده است.

بر اساس نتایج آزمایش‌های انجام شده میزان بازدارندگی از تولید زرالنون توسط اسانس‌های آویشن، مرزه، نعناع، شوید و فلفل قرمز به ترتیب برای غلظت‌های ۸۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰۰ میکرولیتر در ۱۰۰ میلی‌لیتر برابر ۸۸٪، ۸۷٪، ۹۱٪، ۸۹٪ و ۹۳٪ بود (جدول ۵). Marin *et al*. (2004) در بررسی اسانس گیاهان نشان دادند غلظت‌های ۵۰۰µ l/ml و ۱۰۰۰ به میزان ۲۰ تا ۸۰٪ سبب کاهش تولید داکسی نیوالنون می‌شود. ماه موند نیز در بررسی اثر بعضی از اسانس‌های حاوی ترکیبات فنلی به این نتیجه رسیدند که کاهش تولید افلاتوکسین به علت کاهش توده میسلیومی قارچ می‌باشد (Mahmound, 1994). در سال‌های اخیر گیاهان دارویی و معطر به لحاظ وجود مواد آنتی اکسیدان و ضد میکروبی مورد توجه خاص قرار گرفته‌اند، این دسته مواد بیشتر شامل ترکیبات فنلی، فلاونوئیدها، ترپینوئیدها، کارتنوییدها هستند (Singha *et al*., 2006). معمولا ابتدا آزمایش‌های اولیه برای سنجش وجود اثرات فوق انجام می‌شود، سپس با استفاده از دستگاه‌های GC و GC–MS اجزا موثر شناسایی می‌شوند.

در تحقیق حاضر ضمن مقایسه اثر اسانس‌ها با یکدیگر مشخص گردید، اسانس آویشن از اسانس‌های دیگر بهتر عمل کرده است. این مورد می تواند به مواد موثره آویشن مربوط باشد، همان طور که Lahoji *et al*. (2010) نشان دادند که اثر اسانس آویشن بر رشد جدایه فوزاریوم از تأثیر جداگانه مواد موثره آن بیشتر است. غلظت‌های مختلف اسانس فلفل قرمز هیچ گونه اثر بازدارندگی بر رشد جدایه مذکور نداشت، اما به میزان قابل توجهی (۹۳٪) سبب کاهش تولید زرالنون شد، که می‌توان علت را به نوع مواد موثره موجود در فلفل مانند کاپسایسین نسبت داد و یا به دلیل باند شدن اسانس فلفل و زرالنون در فاز جداسازی و رسوب نمودن آن اشاره نمود که در این حالت اسانس سبب تخریب ساختار سم شده است. همچنین در مورد اسانس‌های آویشن و فلفل قرمز می‌توان این احتمال را داد که اسانس این گیاهان از طریق اثر بر غشای سلولی و اختلال در سنتز آنزیمی سبب اختلال در بیوسنتز سم می‌شوند. علاوه بر این اسانس‌های نام برده به علت خاصیت قارچ ایستایی با بازدارندگی از رشد قارچ به صورت غیر مستقیم سبب کاهش تولید زرالنون شده‌اند. ترکیبات فنلی دارای خاصیت بالای ضد میکروبی هستند و در واقع ترکیبات فنلی موجود در اسانس‌های گیاهی بیشترین تأثیر را در ایجاد خاصیت ضد میکروبی دارند. این ترکیبات هم در غشاء سلول نفوذ می‌کنند و هم می‌توانند در لخته شدن محتویات سلول نقش داشته باشند در این صورت می‌توان امیدوار بود به جای استفاده از ترکیبات سنتتیک که همگی دارای اثرات سوء برای

مصرف کنندگان هستند و ضمن تخریب محیط زیست، سلامت استفاده کنندگان را به خطر می‌اندازند از اسانس‌های طبیعی که خوشبختانه زمینه مواد اولیه و تولید آن‌ها در کشور قابلیت‌های بسیار بالایی دارد استفاده نمود. از نظر صرفه اقتصادی هر چند اسانس‌ها در رقابت با قارچ‌کش‌های شیمیایی قیمت تمام شده گرانتری دارند اما غلظت اسانس‌های مورد استفاده بسیار ناچیز بوده و مصرف آن‌ها را توجیه می‌سازد. از طرف دیگر چون زرالنون در گندم که غذای اصلی مردم است تولید می‌شود و این اسانس‌ها هم معطر هستند و ذائقه مردم ایران با آن‌ها خو گرفته است، و به طور معمول از آن‌ها استفاده می‌شود می‌توان آن‌ها را در طبخ انواع نان و خمیرها استفاده نمود.

References

ALIZADEH, B. and TARINEJAD, A. 2002. Usage of MSTATC in statistic analysis, Setude publication,26p

ANGIONI, A., A. BARRA, E. CERETI, D. BARILE, J. D. CAISSON, M. ARLORIO, S. DESSI, V. CORONEO, and P. CABRAS, 2004. Chemical composition plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Journal of the Agriculture and Food Chemistry 52:3530-3535.

ANTONOV, A., A. STEWART and M. WALTER.1998. Inhibition of conidium germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by natural products. Journal of Food Microbiology. 23: 13 33.

ATANDA, O. O., A. AKPAN, F. OLUWAFEMI, 2007. The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. Journal of Food Control. 18 (2007) 601–607.

BARRERA-NECHA, L. L, C. GARDUNO-PIZANA and L. J. GARCIA-BARREERA, 2009. In vitro antifungal activity of essential oils and their compounds on mycelial growth of *Fusarium oxysporum* f. sp *gladioli* (maassey) synder ander and Hansen. Journal of Plant Pathology. 8(1): 17-21.

BAZGIR, A., J. SHAHKARAMI and A. NAGHAVI, 2008. Investigation on growth inhibition effect of post-harvest pathogenic fungi with four plant essential oils.18th Iranian Plant Protection congress. 322.

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

EZEKIEL, C. N., A. C. ODEBODE and S. O. FAPOHUNDA, 2008. Zearalenone production by naturally occurring *Fusarium* species on maize, wheat and soybeans from Nigeria. Journal of Biology and Environmental Science, 2(6), 77-82.

GROVER, R. K. and J. D. MOORE, 1962. Toximetric studies of fungicides against brown rot organism– *Sclerotinia fructicola* and *S. laxa* . Phytopathology 52: 876-880.

HE, J., R. YANG, T. ZHOU, R. TSAO, J. C. YONG, H. ZHU, X. Z. LI, G. J. BOLAND, 2007. Purification of dexoynivalenol from *Fusarium graminearum* rice culture and mouldy corn by high-speed counter-current chromatography. Journal of Chromatography 1151: 187 192.

KARAMAN, S., M. DIGRAK, U. RAVID and A. ILCIM. 2001. Antibacterial and antifungal activity of the essential oil of *Thymus revolutus* from Turkey. Journal of Ethnopharmacology. 76: 183-186.

LAHOJI, A., M. MIRABOLFATHI and R. KARAMI-OSBOO. 2010. Effect of *Zataria multiflora* and *Satureja hortensis* essential oils, Thymol and carvacrol on growth *of Fusarium graminearum* isolates and deoxynivalenol production. Iran J. Plant Path. Vol. 45: 60-65

LEE, Y. S., J. KIM, S. G. LEE, E. OH, S. C. SHIN and K. PARK, 2009. Effects of plant essential oils and components from Oriental sweetgum (*Liquidambar orientalis*) on growth and morphogenesis of three phytopathogenic fungi. Journal of Pesticide Biochemistry and Physiology 93:138–143.

MARIN, S., A. VELLUTI, A. J. RAMOS and V. SANCHIS, 2004. Effect of essential oils on zearalenone and dexoynivalenol production by *Fusarium graminearum* in non-sterilized maize grain. Journal of Food Microbiology. 21: 313-318

MASKOUKI, M., S. A. MORTAZAVI and S. RAD, 2005.Control of *Aspergillus parasiticus* growth by essential oils in synthetic media. Journal Agric Science

Natural Resource, vol. (11) 3: 61-69.

MIROCHA, C. J. and C. M. CHRISTENSEN, 1974. Oestrogenic mycotoxins synthesized by Fusarium. Mycotoxins, edited by I. F. H. Purchase (Amesterdam: Elsevier), pp. 129-148.

NERI, F., M. MARI and S. BRIGATI, 2006. Control of *Penicillium expansum* by plant volatile compounds. Plant Pathology, 55: 100-105.

NGUEFACK, J., V. LETH, P. H. AMVAMZOLLO and S. B. MATHUR, 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. Journal of Food Microbiology. 94:329-334.

OZCAN, M. and BOYRAZ, N. 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. Intl. J. Food Microbiol. 107: 238-242

PANDEY, D. K., N. N. TRIPATHI, R. D. TRIPATHI and S. N. DIXIT, 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *H. suaveolens*. Zeitschrift fur Pflanzenkraneaten and Pflanzenschutz 89: 344-349.

PASTER, N., J. YONASSI, R. B GOLAN and M. MENASHEROV, 2004. Production of zearalenone in vitro and in corn grains stored under modified atmospheres. Journal of Food Microbiology. 12: 157-165.

RABERT, M. and F. CHOOI, 2008. Analysis of the Fusarium toxins Deoxynivalenol and Zearalenone in Austrian feeds of the crop years 2002 and 2003. Journal of Food Mycotoxins. 21: 29-31.

REGINA, M., F. GERALDO, D. J. TESSMANN, C. KEMMELMEIER, 2006. Production of mycotoxins by *Fusarium graminearum* isolated from small cereals (wheat, Triticale and barley) affected with scab disease in Southern BRAZIL. Journal of Microbiology. 37:58-63.

REZAEIAN DOLOEI, R., S. REZAEE, M. MIR-ABOLFATHY, H. ZAMANIZADEH and M. RAZAVI, 2011. Molecular identification and detection of gene encoding deoxynivalenol in *Fusarium graminearum* isolates, the causal agent of *Fusarium* head blight of wheat in Iran. Modern Science of Sustainable Agricultural Journal. Vol. 7: 19- 26.

SINGHA, G., S. MAURYA, C. CATALAN and M. P. DELAMPASONA, 2004. chemical constituents, antifungal and antioxidative effects of Ajwain essential oil and its acetone extract. Journal of Agriculture and Food Chemistry 52(11):3292-3296.

SINGHA, G., S. MAURYA, M. P. DE LAMPASONA and C. CATALAN, 2006. Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and it is acetone extract. Food Control. 17:745-752.

SOLIMAN, K. M. and R. I. BADEA, 2002. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. Food Chemistry and Toxicology, 40: 1669-1675.

TERZI, V., C. MORCIA, P. FACCIOLI, G. VALE, G. TACCONI, and M. MALNATI, 2007. In vitro antifungal activity of the tea tree essential oil and its major components against plant pathogens. Letters in Applied Microbiology, 44:613-618.

THAMSON, D. P. 1989. Fungitoxic ativity of essential oil components on food storage fungi. Mycologia. 81(1):151-153.

THANABORIPAT, D., Y. SUVATHI, P. SRILOHASIN, S. SRIPAKDEE, O. PATTHANAWANITCHAI and S. CHAROENSETTASILP, 2007. Inhibitory effect of essential oils on growth of *Aspergillus flavus*. KMITL Science Technology Journal 7: 1-5.

TZPRTZAKIS, N. G. and C. D. ECONOMAKISC, 2007. Antifungal activity of lemongrass essential oils against key postharvest pathogens. Food Science. (8): 253-258.

ULTEE, A., T. P. W. KETS and E. J. SMID, 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. Applied and Environmental Microbiology. 65: 4606-4610.

ZARINGHALAM, M. and M. SATARI, 2007. Eeffect of pepper and *Zataria multiflora* essential oils on frenum of DNAse enzyme *stafilucocos oreuos*. Journal of Iranian Pharmaceutic Plants. 6(24): 33.

ZINEDINE, A., J. MIGUEL SORIANO, J. C. MOLTO and J. MANES, 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. Journal of Food and Chemical Toxicology. 45: 1-18.