

Evaluation of antifungal effect of shirazi thyme and peppermint essential oils and their major monoterpenes in controlling verticillium fungus on pistachios in vitro

Mahdi Akhlaghi^{*1}, Seyed Hamid Reza Ziaolhagh², Esmaeil Babakhanzadeh³,
Vahideh Rafiei⁴

1. Corresponding Author, Plant Protection Research Department, Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran. E-mail: m.akhlaghi66@yahoo.com
2. Food Technology Research Department, Agricultural Engineering Research Department, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran. E-mail: mahdi.akhlaghi66@gmail.com
3. Agricultural Engineering Research Department, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran. E-mail: esmaeilbabakhanzade@yahoo.com
4. Plant Protection Research Department, Agricultural and Natural Resources Research and Education Center of Semnan Province (Shahrood), AREEO, Shahrood, Iran. E-mail: rafiee1743@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 06.27.2021
Revised: 08.05.2021
Accepted: 11.21.2021

Keywords:
Carvacrol,
Thymol,
Verticillium dahliae,
Verticillium wilt

ABSTRACT

Background and Objectives: Wilt disease caused by the pathogenic fungus *Verticillium dahliae* is one of the dangerous factors threatening the cultivation of pistachio trees in the country, which has spread in different parts of the country in the last two decades, including Semnan province. Lack of suitable fungicides to control *V. dahliae* and continuous use of several common fungicides in the country has contributed to the spread of the fungus. Therefore, in the current situation, we need to use new compounds with high efficiency to control this pathogenic fungus. Therefore, the aim of this study was to use plant essential oils and monoterpene compounds to control pistachio verticillium Fungus.

Materials and Methods: In this study, *V. dahliae* native isolates obtained from gardens of Shahrood (Semnan province) were used. After isolation and purification of *V. dahliae*, macroscopic and microscopic features including colony characteristics on PDA and conidium / microsclerotia size and shape were used for tentative-identification of isolates using valid keys. Then, the essential oils of Shirazi Thyme (*Zataria multiflora*) and Peppermint (*Mentha piperita*) were used to evaluate the antifungal effect. After preparing the herbal plants (from the medicinal plants farm of Agricultural and Natural Resources Research Center of Semnan Province (Shahrood)), the essential oil extraction process was performed using Clevenger method. The antifungal effect was investigated by mixing with culture medium at concentrations of 20, 40, 60, 80 and 100 µL/mL. Also, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) were determined for the two essential oils. Then, using Thymol and Carvacrol monoterpenes, antifungal effects were tested by mixing with culture medium at three concentrations of 15, 150 and 1500 µL/mL against *V. dahliae*.

Results: The conidia of the isolates were evaluated in the dimensions of 1.6 to 3.7 µm individually. The microsclerotia dimensions of the isolates were 17 to 45 µm. Due to the dimensions of conidia, microsclerotia and colony color, the isolate was identified as *V. dahliae* in pistachio tree. Both

Shirazi thyme essential oil and peppermint were effective in preventing the growth of *V. dahliae* hyphae. The results showed that Shirazi thyme essential oil had a stronger antifungal effect compared to peppermint essential oil, so that in the third week, growth was observed only at a concentration of 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, but in the case of peppermint essential oil, fungal growth was observed in all concentrations. The results of MIC and MFC were 20 and 30 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for Shirazi thyme and 100 and 150 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for peppermint essential oil, respectively. Other results of this study showed that thymol was more potent than carvacrol in preventing the growth of *V. dahliae*, so that at concentrations of 150 and 1500 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of both compounds, no fungal growth was observed, but at a concentration of 15 $\mu\text{L}/\text{mL}$ carvacrol the growth of fungal hyphae was close to control treatment.

Conclusion: The results of this study showed that two essential oils of Shirazi thyme (with the main monoterpene compounds of carvacrol and thymol) and peppermint were very effective in controlling *V. dahliae*, so that at concentrations less than 150 $\mu\text{L}/\text{ml}$, they showed the fungicidal effect. The results of this study can be used as a method to control pistachio Verticillium wilt disease.

Cite this article: Akhlaghi, Mahdi, Ziaolhagh, Seyed Hamid Reza, Babakhanzadeh, Esmaeil, Rafiei, Vahideh. 2022. Evaluation of antifungal effect of shirazi thyme and peppermint essential oils and their major monoterpenes in controlling verticillium fungus on pistachios in vitro. *Journal of Plant Production Research*, 29 (2), 183-199.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/JOPP.2022.19267.2843

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ارزیابی اثر ضد قارچی اسانس آویشن شیرازی و نعنای فلفلی و مونوترپن‌های عمده آن‌ها در کنترل قارچ ورتیسیلیوم پسته در شرایط آزمایشگاه

مهدی اخلاقی^{*}، سید حمیدرضا ضیاءالحق^۲، اسماعیل باباخانزاده^۳، وحیده رفیعی^۴

۱. نویسنده مسئول، بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران. رایانامه: m.akhlaghi66@yahoo.com
۲. بخش تحقیقات صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران. رایانامه: mahdi.akhlaghi66@gmail.com
۳. مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران. رایانامه: esmailbabakhanzade@yahoo.com
۴. بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان سمنان (شاهرود)، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، شاهرود، ایران. رایانامه: rafiee1743@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی- پژوهشی	سابقه و هدف: یکی از عوامل خطرناک تهدیدکننده کشت درختان پسته در سطح کشور بیماری پژمردگی ناشی از قارچ <i>Verticillium dahliae</i> می‌باشد که در دو دهه اخیر در مناطق مختلف کشور، از جمله استان سمنان گسترش پیدا کرده است. یکی از دلایل گسترش بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی پسته عدم وجود قارچ‌کش و ترکیبات شیمیایی مناسب جهت کنترل این بیماری می‌باشد. از این‌رو در شرایط کنونی نیاز به استفاده از ترکیبات جدید با کارایی بالا جهت کنترل این بیماری می‌باشد. از این‌رو هدف از این پژوهش، استفاده از اسانس‌های گیاهی و ترکیبات مونوترپنی تشکیل‌دهنده آن‌ها، در کنترل بیماری ورتیسیلیوم پسته می‌باشند.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۰۶ تاریخ ویرایش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۸/۳۰	مواد و روش‌ها: جدایه <i>V. dahliae</i> از باغات پسته شهرستان شاهرود جداسازی و شناسایی آن با استفاده از صفات ریخت‌شناسی و کلید معتبر قارچ‌شناسی انجام پذیرفت. از دو اسانس گیاهی آویشن شیرازی (<i>Zataria multiflora</i>) و نعنای فلفلی (<i>Mentha piperita</i>) جهت بررسی اثر ضد قارچی استفاده شد. پس از تهیه مواد گیاهی از مزرعه گیاهان دارویی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان سمنان (شاهرود)، فرآیند اسانس‌گیری با استفاده از دستگاه کلونجر انجام پذیرفت. بررسی اثر ضد قارچی با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت در غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر صورت گرفت. هم‌چنین حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی برای دو اسانس تعیین گردید. در ادامه با به‌کارگیری دو ترکیب مونوترپنی تیمول و کارواکرول، <i>Verticillium dahlia</i>
واژه‌های کلیدی: پژمردگی ورتیسیلیومی، تیمول، کارواکرول، <i>Verticillium dahlia</i>	

کارواکروول به عنوان اجزای اصلی بسیاری از اسانس‌های گیاهان دارویی، اثرات ضد قارچی آن‌ها با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت در سه غلظت ۱۵، ۱۵۰ و ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر سنجیده شد.

یافته‌ها: کنیدی‌های جدایه مورد بررسی در ابعاد ۱/۶ تا ۳/۷ میکرومتر و عموماً به صورت منفرد ارزیابی شد. ریزستخینه‌های جدایه مورد بررسی در ابعاد ۱۷ تا ۴۵ میکرومتر تشخیص داده شدند. با توجه به ابعاد کنیدی، ریزستخینه و رنگ کلنی، جدایه مورد نظر به عنوان قارچ *V. dahliae* درختان پسته شناسایی شد. در جلوگیری از رشد هیف‌های قارچ، هر دو اسانس آویشن شیرازی و نعناع فلفلی موثر ارزیابی شدند. نتایج نشان داد اسانس آویشن شیرازی از اثر ضد قارچی قوی‌تری در مقایسه با اسانس نعناع فلفلی برخوردار بود، به طوری که در هفته سوم، رشد قارچ فقط در غلظت ۲۰ میکرولیتر بر لیتر اسانس آویشن شیرازی مشاهده شد اما در مورد اسانس نعناع فلفلی در تمامی غلظت‌های مورد استفاده رشد قارچ مشاهده شد. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی به ترتیب برای آویشن شیرازی ۲۰ و ۳۰ میکرولیتر بر لیتر و برای اسانس نعناع فلفلی ۱۰۰ و ۱۵۰ میکرولیتر بر لیتر به دست آمد. دیگر نتایج این پژوهش نشان داد، ترکیب تیمول در جلوگیری از رشد قارچ *V. dahliae* قوی‌تر از ترکیب کارواکروول عمل نمود، به طوری که در غلظت‌های ۱۵۰ و ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر هر دو ترکیب هیچ‌گونه رشد قارچ مشاهده نشد، اما در غلظت ۱۵ میکرولیتر بر لیتر ترکیب کارواکروول رشد هیف قارچ نزدیک به تیمار شاهد بود.

نتیجه‌گیری: نتایج این پژوهش بیانگر آن بود که دو اسانس آویشن شیرازی (با ترکیبات عمدۀ مونوترپنی کارواکروول و تیمول) و نعناع فلفلی، در کنترل قارچ ورتیسیلیوم بسیار مؤثر عمل نمودند، به طوری که در غلظت‌های کم‌تر از ۱۵۰ میکرولیتر بر لیتر اثرات قارچ‌کشی در مورد آن‌ها مشاهده گردید. نتایج به دست آمده از این پژوهش می‌تواند به عنوان روشی در کنترل بیماری پژمردگی ورتیسیلیومی پسته مورد استفاده قرار گیرد.

استناد: اخلاقی، مهدی، ضیاءالحق، سید حمیدرضا، باباخانزاده، اسماعیل، رفیعی، وحیده (۱۴۰۱). ارزیابی اثر ضد قارچی اسانس آویشن شیرازی و نعناع فلفلی و مونوترپن‌های عمدۀ آن‌ها در کنترل قارچ ورتیسیلیوم پسته در شرایط آزمایشگاه. نشریه پژوهش‌های تولید گیاهی، ۲۹ (۲)، ۱۹۹-۱۸۳.

DOI: 10.22069/JOPP.2022.19267.2843



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

درخت پسته سالیان متمادی در محدوده ایران کشت شده است و خاستگاه این درخت ارزشمند ایران و کشورهای آسیای غربی می‌باشد (۱). این محصول باغی مهم در میان محصولات باغی کشور از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است، به طوری که در سال زارعی ۹۸ سطح کشت آن معادل ۵۱۸ هزار هکتار برآورد شده است (۲). استان سمنان با دارا بودن بیش از ۲۲ هزار هکتار سطح زیرکشت، از استان‌های اصلی کشت پسته در سطح کشور محسوب می‌گردد. در سال‌های اخیر به دلیل کشت محصول پسته در مناطقی با مزیت نسبی کم‌تر، گسترش ارقام جدید (بدون توجه به شرایط منطقه) و تغییرات اقلیمی رخ داده در سطح کشور شاهد گسترش آفات و بیماری‌های این محصول مهم و صادراتی کشور هستیم. از مشکلات مهم درختان پسته می‌توان به بیماری خطرناک پژمردگی ورتیسیلیومی در کشور اشاره نمود که در دو دهه اخیر در مناطق مختلف کشور از جمله استان سمنان در حال گسترش می‌باشد. از علائم عمومی این بیماری می‌توان به ضعف، زردی یا پژمردگی برگ‌ها روی یک یا چند شاخه، خشکیدگی شاخه‌های یک سمت درخت و در نهایت خشک شدن کل درخت اشاره نمود (۳، ۴). در اثر گسترش این بیماری حلقه آوندی و بخشی از چوب شاخه‌ها یا تنه درخت آلوده به قارچ به رنگ قهوه‌ای تغییر رنگ می‌دهد (۳). در مورد پژوهش‌های انجام شده در پیرامون پژمردگی ورتیسیلیومی پسته در ایران، مطالعات انجام گرفته در حد شناسایی عامل بیماری، تعیین پراکنش آن، تأثیر شوری و خشکی روی بیماری در دو یا سه پایه و ارزیابی مقاومت ارقام محلی به عامل بیماری بوده است (۵).

مطابق پژوهش‌های انجام‌شده، قارچ *Verticillium dahliae* از مناطق پسته‌کاری استان سمنان گزارش شده است (۶) در مورد کنترل این بیماری تاکنون

روش موثری ارائه نشده است و عموم روش‌های ارائه شده شامل خودداری از کشت در زمین‌های آلوده، استفاده از ارقام مقاوم، ضدعفونی خاک با استفاده از سموم شیمیایی (تدخینی) که با توجه به قیمت بالا و محدودیت‌های زیست‌محیطی و بهداشتی، عملاً توسط کشاورزان قابل اجرا نمی‌باشد (۷). از این‌رو لازم است تا با استفاده از ترکیبات جدید به‌خصوص ترکیبات موجود در طبیعت، تحقیقاتی آزمایشگاهی و محیطی به منظور یافتن ترکیبات مؤثر جهت کنترل این بیماری انجام پذیرد. اسانس‌ها یکی از فرآوردهایی می‌باشند که از گیاهان استحصال می‌شوند و در حقیقت نوعی از ترکیبات فرار گیاهی بوده که از تقطیر مواد فرار موجود در اندام‌های مختلف گیاهان تازه یا خشک به‌دست می‌آیند و دارای ترکیبات فرار با منشاء ترپنوئید یا غیرترپنوئید هستند (۸). بیش از ۳۰۰۰ نوع اسانس وجود دارد که حدود ۳۰۰ نوع آن از نظر تجاری اهمیت پیدا کرده‌اند و در بازارهای جهانی مورد عرضه قرار می‌گیرند (۹). به‌خاطر گستردگی پروفایل‌ها و اجزاء اسانس‌ها، خاصیت ضد میکروبی اسانس‌ها وابسته به یک سازوکار نیست، بلکه راه‌ها و سازوکارهای متنوع در سطح مولکولی در این موضوع نقش ایفا می‌کنند، از این‌رو چنین برداشت می‌شود که راه‌های متنوع در فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها دخیل است (۱۰). در مورد کنترل قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی با اسانس‌ها و ترکیبات مونوترپنی آن‌ها پژوهش‌هایی زیادی انجام شده که قسمت عمده آن‌ها در مورد قارچ‌های پس از برداشت می‌باشد (۱۱، ۱۲). اثر متابولیت‌های گیاهی از جمله اسانس‌ها تاکنون بر روی قارچ ورتیسیلیوم در کشور ایران مورد آزمایش قرار نگرفته است. پژوهش‌هایی در مورد کاربرد اسانس‌ها در جلوگیری از رشد قارچ ورتیسیلیوم در دنیا انجام شده است که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به تأثیر ۱۰ اسانس روی سه گروه سازگاری رویشی (VCG) قارچ ورتیسیلیوم اشاره نمود که بیش‌ترین اثر مربوط

و در ادامه سه مرتبه با آب مقطر سترون شستشو انجام پذیرفت. پس از خشک شدن قطعات برش خورده بر روی کاغذ صافی در شرایط هود سترون قطعات درون پتری حاوی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار^۱ (PDA) (لیوفلیکم، تِرامو، ایتالیا / ۳۹ گرم در لیتر) قرار گرفتند. پتری‌ها به مدت یک تا دو هفته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. به‌منظور خالص‌سازی از حاشیه کُنی‌های قارچ ورتیسلیوم برداشته شد (نواحی حاوی هیف تازه) و درون محیط PDA جدید قرار گرفت. پس از سه هفته و با کامل شدن رشد قارچ، جهت شناسایی قارچ موردنظر از صفات ریخت‌شناسی و کلید معرفی شده توسط هیلوکس (۱۹۹۲) استفاده به عمل آمد (۱۴، ۱۵).

جمع‌آوری، شناسایی و فرآیند خشک کردن بافت‌های گیاهی جهت استخراج اسانس: گیاهان مورد بررسی در این پژوهش، از مزرعه تحقیقاتی گیاهان دارویی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی استان سمنان (شاهرود) تهیه شدند. گیاهان مورد استفاده شامل آویشن شیرازی و نعناع فلفلی بودند. مشخصات گیاهان مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است. پس از انتقال نمونه‌های گیاهی به آزمایشگاه، قسمت‌های اضافی بافت‌های گیاهی حذف گردیدند و نمونه‌های گیاهی در شرایط سایه و در دمای اتاق بین دو ورقه کاغذی قرار داده شدند و هر روز با انجام عمل هوادهی به صورت کامل خشک شدند (۱۶).

به اسانس یکی از گونه‌های گیاه مرزنجوش (*Origanum syriacum*) به‌دست آمد (۱۳). با توجه به ماهیت قارچ ورتیسلیوم و خاکزاد بودن آن، بررسی اثر اسانس‌های گیاهی بر روی این قارچ در مقایسه با سایر قارچ‌های بیماریزا از جمله قارچ‌های پس از برداشت تاکنون کم‌تر انجام شده است. در این پژوهش سعی شد تا از اسانس دو گیاه آویشن شیرازی و نعناع فلفلی و ترکیبات مونوترپنی عمده آن‌ها جهت کنترل جدایه بومی بیماریزای به‌دست آمده درختان پسته استان سمنان استفاده شود. درک بیوشیمی گیاهان دارویی و فرآیندهای فیزیولوژی و شیمیایی متابولیت‌های طبیعی می‌تواند منجر به تولید قارچ‌کش‌های مؤثر جهت کنترل عوامل بیماریزایی همچون پژمردگی ورتیسلیومی درختان پسته شود.

مواد و روش‌ها

جداسازی قارچ ورتیسلیوم از درختان پسته: شاخه‌های دارای خشکیدگی از باغات جنوب شهر شاهرود جمع‌آوری و درون کیسه‌های پلاستیکی به آزمایشگاه منتقل گردید و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ابتدا نمونه‌ها با آب معمولی شسته شدند و پس از خشک شدن و برش شاخه‌ها، قطعات کوچکی بین مرز بافت سالم و آلوده جدا گردید. قطعات کوچک در محلول هیپوکلریت سدیم ۰/۵ درصد به مدت یک دقیقه غوطه‌ور گردید

جدول ۱- نام علمی، نام عمومی، خانواده گیاهی و بافت مورد استفاده گیاهان مورد بررسی در این پژوهش.

Table 1. Botanical name of plants, common name, family and part of the plant used.

بافت مورد استفاده Plant part used	خانواده Family	نام عمومی Common names	نام علمی Botanical name
شاخه گل‌دار Flowering branches	نعناعیان Lamiaceae	آویشن شیرازی Shirazi thyme	<i>Zataria multiflora</i>
شاخه گل‌دار Flowering branches	نعناعیان Lamiaceae	نعناع فلفلی Peppermint	<i>Mentha piperita</i>

مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح آماری ۹۹ درصد انجام پذیرفت (۱۸). درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف هر یک از اسانس‌ها با اندازه‌گیری قطر پرگنه قارچ در نمونه شاهد و تیمارهای مختلف و با استفاده از رابطه ۱ تعیین گردید (۱۹).

$$I = \frac{D_t - D_c}{D_c} \times 100 \quad (1)$$

که در آن، I درصد بازدارندگی، Dt قطر کلنی تیمار و Dc قطر کلنی شاهد می‌باشند.

آزمون حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی برای

اسانس‌ها: غلظت‌های ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۵ میکرولیتر در لیتر از هر یک از اسانس‌های مورد آزمایش درون ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت PDA تهیه شد. یک پتری حاوی محیط کشت DMSO یک درصد به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. در ادامه قطعات مساوی از قارچ بر روی محیط کشت قرار گرفت، پتری‌ها در دمای ۲۵ به مدت یک هفته انکوبه گردیدند. پتری‌ها از نظر گسترش کلنی قارچ یا عدم رشد از طریق اندازه‌گیری قطر کلنی قارچ در مقایسه با شاهد مورد ارزیابی قرار گرفتند. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC^۲) شامل غلظتی است که در آن کاهش رشد قارچ نسبت به شاهد مشهود بود. همچنین حداقل غلظت کشندگی (MFC^۳) قارچ شامل غلظتی از ترکیبات مورد آزمایش بود که طی یک هفته انکوباسیون، هیچ‌گونه رشد قارچ، نسبت به شاهد مثبت مشاهده نگردید. همه مراحل آزمایش سه بار تکرار شد و نتایج به صورت میانگین ارائه گردید (۱۸).

تهیه ترکیبات مونوترپنی: پس از بررسی اثر اسانس‌ها بر رشد قارچ *V. dahliae* و بررسی پژوهش‌های مرتبط

فرآیند اسانس‌گیری: اسانس‌گیری با استفاده از روش شریفی‌راد و همکاران (۲۰۱۴) با اندکی تغییرات انجام پذیرفت (۱۷). بافت‌های گیاهی خشک شده به وسیله دستگاه آسیاب، به صورت پودر کامل درآمدند و ۱۰۰ گرم از پودر در مخزن دستگاه کلونجر یک لیتری قرار داده شده و ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون درون بالن دستگاه ریخته شده و به مدت چهار ساعت عمل اسانس‌گیری انجام شد. از پودر سولفات سدیم^۱ جهت آنگیری اسانس‌ها استفاده شد. اسانس‌های بدست آمده برای انجام آزمون‌های مختلف از جمله آزمون ضدباکتریایی، در شیشه‌های تیره (دو میلی لیتری) و درب بسته، در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

ارزیابی میزان اثر ضد قارچی اسانس‌های مورد

آزمایش: اثر ضد قارچی اسانس‌ها به روش اختلاط با محیط کشت PDA بررسی شد. غلظت‌های ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر هر یک از اسانس‌ها در ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت PDA تهیه گردید. از ترکیب دی متیل سولفوکساید (DMSO) یک درصد به عنوان حلال استفاده شد. اسانس‌ها قبل از انعقاد محیط کشت (دمای ۴۵ درجه) درون پتری هشت سانتی‌متری توزیع گردید. قطعات هم اندازه قارچ *V. dahliae* از محیط کشت با استفاده از چوب پنبه‌بُر جدا و در مرکز پتری (حاوی یکی از پنج غلظت مورد نظر اسانس‌ها) قرار گرفت. پتری‌ها تلقیح شده در ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. از محیط کشت بدون اسانس که حاوی DMSO یک درصد بود به عنوان شاهد استفاده شد. رشد هیف قارچ بعد از گذشت هفت روز در تیمار شاهد و اسانس‌ها بررسی شد، هم‌چنین میزان رشد قارچ در روزهای ۱۴ و ۲۱ نیز اندازه‌گیری شد. آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی با سه تکرار انجام پذیرفت.

2- Minimum Inhibitory Concentration

3- Minimum Fungicidal Concentration

1- Na₂SO₄

نتایج و بحث

شناسایی عامل بیماری پژمردگی ورتیسلیومی درختان پسته: کُلنی‌های قارچ در محیط کشت PDA در ابتدا سفید و با طولانی شدن زمان و تشکیل سختینه‌ها بر روی سطح هیف‌های قارچ رنگ محیط سیاه شد. مدت زمان کامل شدن رشد قارچ در پتری‌های ۱۲ سانتی‌متری معادل ۲۱ روز بود. کِنیدی‌های قارچ در ابعاد ۱/۶ تا ۳/۷ میکرومتر تشخیص داده شدند که عموماً به صورت منفرد بودند. هم‌چنین ریزسختینه‌های تشکیل شده در ابعاد ۱۷ تا ۴۵ میکرومتر برای جدایه مورد نظر تشخیص داده شد که با نتایج محمدی و همکاران (۲۰۰۶) مطابقت دارد (۶).

اثر ضد قارچی اسانس‌های مورد آزمایش: نتایج حاصل از جدول تجزیه واریانس نشان داد که اثر غلظت‌های مختلف دو اسانس آویشن و نعناع فلفلی در جلوگیری از رشد میسلیوم‌های قارچ ورتیسلیوم در سطح آماری ۹۵ درصد معنی‌دار بود (جدول ۲). در مجموع اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با اسانس نعناع فلفلی به‌طور معنی‌داری مؤثرتر ارزیابی شد ($P < 0.05$)، به‌طوری‌که در مدت زمان سه هفته، به غیر از غلظت ۲۰ میکرولیتر بر لیتر در سایر غلظت‌ها، رشد قارچ مشاهده نشد و میزان بازدارندگی آن ۱۰۰ درصد بود. غلظت ۲۰ میکرولیتر بر لیتر اسانس آویشن شیرازی با ۶۶/۸۴ درصد بازدارندگی، به‌طور معنی‌داری بیش‌تر از اثر غلظت‌های مختلف اسانس نعناع فلفلی ارزیابی شد. در مورد اسانس نعناع فلفلی، رشد میسلیوم قارچ در پنج غلظت مورد استفاده مشاهده شد، به‌طوری‌که بیش‌ترین اثر بازدارندگی مربوط به غلظت ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر (۴۶/۴۷ درصد) و کم‌ترین اثر بازدارندگی مربوط به غلظت ۲۰ میکرولیتر بر لیتر نعناع فلفلی (۳۴/۱۱ درصد) بود (شکل ۱).

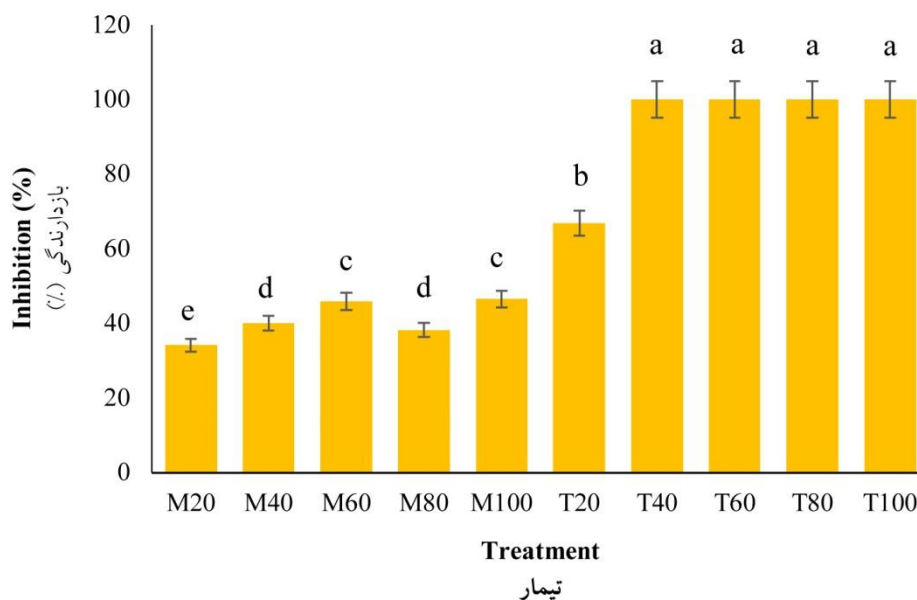
با آنالیز گاز کروماتوگرافی دو اسانس آویشن شیرازی و نعناع فلفلی، دو ترکیب عمده اسانس آویشن شیرازی شامل کارواکول (2-Methyl-5-(1-methylethyl)phenol) و تیمول (5-Methyl-2-(Propan-2-yl) phenol) جهت بررسی روی قارچ *V. dahliae* انتخاب شدند. دو ترکیب کارواکول و تیمول از شرکت سیگما آلد ریچ تهیه و در دمای چهار درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. ترکیبات فوق دارای خلوص ۹۹/۵ درصد بودند.

آزمون اثر ترکیبات مونوترپنی بر رشد قارچ ورتیسلیوم در شرایط آزمایشگاهی: اثر ضد قارچی با روش اختلاط با محیط کشت PDA بررسی شد. غلظت‌های ۱۵، ۱۵۰ و ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر هر یک از دو ترکیب مونوترپنی تیمول و کارواکول درون ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت PDA تهیه گردید. از ترکیب دی متیل سولفوکساید (DMSO) یک درصد به عنوان حلال استفاده شد. ترکیبات مونوترپنی قبل از انعقاد محیط کشت (دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد) درون پتری هشت سانتی‌متری توزیع گردید و به مدت ۳۰ ثانیه بر روی شیکر (با تکان ۷۰ دور در دقیقه) جهت پخش یک نواخت ترکیبات قرار گرفت. قطعات هم اندازه قارچ *V. dahliae* از محیط کشت با استفاده از چوب پنبه‌بُر جدا و در مرکز هر یک از پتری‌های حاوی غلظت‌های ذکر شده قرار گرفت. پتری‌های تلقیح شده در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. از محیط کشت بدون ترکیب تیمول و کارواکول که حاوی DMSO یک درصد بود به عنوان شاهد استفاده شد. با گذشت مدت زمان ۱۴ روز، رشد قارچ در تیمار شاهد و تیمارهای دو ترکیب مونوترپنی بررسی شد. آزمایش در سه تکرار انجام پذیرفت و پس از آن درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف تیمول و کارواکول با استفاده از رابطه ۱ به دست آمد (۱۸).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف اسانس‌های نعناع فلفلی و آویشن شیرازی بر جلوگیری از رشد میسیلیوم‌های قارچ *Verticillium dahliae* ($P < 0.05$).

Table 2. Analysis of variance of the effect of different concentrations of peppermint and Shirazi thyme essential oils on the growth inhibition of *Verticillium dahliae* mycelium ($P < 0.05$).

معنی داری Significance	F	میانگین مربعات Mean of Squares	درجه آزادی Degree of Freedom	مجموع مربعات Sum of Squares	منابع تغییرات Source
0.0001	1611.885	2620.455	9	23584.096	بین گروه‌ها Between groups
		1.626	20	32.514	درون گروه‌ها Within groups
			29	23616.61	کل Total



شکل ۱- اثر نوع اسانس (نعناع فلفلی (M) آویشن شیرازی (T)) و غلظت اسانس (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر) بر جلوگیری از رشد قارچ *Verticillium dahliae* (درصد). ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اثر معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.05$).

Fig. 1. Effect of essential oil type (peppermint, M and Shirazi thyme, T) and essential oil concentration (20, 40, 60, 80 and 100 $\mu\text{L/mL}$) on preventing the growth of *Verticillium dahliae* (percentage). Columns with similar letters have no significant effect ($P < 0.05$).

گیاهی و بقای طولانی‌مدت اسپورها در خاک اشاره نمود. در اندک پژوهش‌های صورت گرفته در این زمینه، نقش برخی از اسانس‌های گیاهی از جمله گیاهان خانواده نعناعیان در کنترل این قارچ مشخص شده است. نتایج اثر ضد قارچی آویشن شیرازی و نعناع فلفلی نیز تأییدکننده پژوهش‌های قبلی در این

پیرامون نقش ضد قارچی اسانس‌های گیاهی در مورد قارچ *V. dahliae* در مقایسه با سایر قارچ‌های بیماریزای گیاهی پژوهش‌های کم‌تری صورت گرفته است. از دلایل عمده این امر می‌توان به خاکزی بودن قارچ *V. dahliae*، حضور در بافت آوندی، کند رشد بودن، اثر قارچ بر روی طیف زیادی از محصولات

افزایش خواص مختلف اسانس، از جمله اثر ضد قارچی بسیار مؤثر می‌باشد (۲۱). در مورد اسانس گیاه نعنای فلفلی در پژوهش‌های گذشته مشخص شد که این اسانس از خواص آنتی‌اکسیدانی، قارچ‌کشی و حشره‌کشی برخوردار است (۲۳). منتول ترکیب اصلی اسانس نعنای فلفلی را تشکیل می‌دهد و در مورد اثر ضد قارچی آن باید به این نکته اشاره نمود که در مقایسه با تیمول و کارواکرول از قدرت ضد قارچی کم‌تری برخوردار است که نتایج این پژوهش با آن مطابقت داشت.

نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل کشندگی اسانس‌ها: نتایج حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی نشان دو اسانس مورد آزمایش نشان داد، حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) برای اسانس آویشن شیرازی ۲۰ میکرولیتر بر لیتر بود در حالی که حداقل غلظت بازدارندگی از رشد برای اسانس نعنای فلفلی ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر برآورد شد که این نتایج، نشان‌دهنده قدرت بیش‌تر اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با اسانس گیاه نعنای فلفلی در کنترل قارچ ورتیسیلیوم بود. در مورد مقدار حداقل غلظت کشندگی (MFC) نتایج بیانگر آن بود که برای اسانس آویشن مقدار MFC برابر با ۳۰ میکرولیتر بر لیتر بود در حالی که برای اسانس نعنای فلفلی مقدار MFC برابر با ۱۵۰ میکرولیتر بر لیتر به‌دست آمد که بیانگر تأثیر کم‌تر اسانس نعنای فلفلی در مقایسه با آویشن بود. رابطه ۲، رابطه بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی اسانس را مشخص نمود. همان‌طور که در رابطه ۲ و شکل ۲ مشاهده می‌شود حداقل غلظت بازدارندگی ۲۰/۶۸ به‌دست آمده است (عرض از مبدأ). در حقیقت نمودار رگرسیون بین غلظت اسانس و درصد بازدارندگی بیانگر آن بود که غلظت ۴۰ میکرولیتر بر لیتر در جلوگیری از رشد هیف قارچ

حوزه بود (۱۳). در پژوهش‌های گذشته پیرامون اثر آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) و اثرات ضد قارچی آن پژوهش‌هایی انجام گرفته بود، اما پژوهش حاضر اثبات نمود که اسانس گیاه آویشن شیرازی (*Z. multiflora*) از قدرت ضد قارچی بالایی علیه *V. dahlia* برخوردار است (۱۳) در مورد اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با سایر اسانس‌های گیاهی و اثر ضد قارچی مناسب آن در مورد قارچ‌های بیماریزای انسانی از جمله *Candida albicans* و قارچ‌های بیماریزای گیاهی مانند *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* پژوهش‌های گذشته این امر را اثبات نموده است (۱۱، ۲۰). همچنین در این پژوهش اثرات ضد قارچی گیاه نعنای فلفلی (*M. piperita*) نیز اثبات گردید که در مورد دو اسانس فوق، اولین گزارش علیه قارچ *V. dahlia* می‌باشد. در مورد اثر بهتر اسانس آویشن شیرازی نسبت به اسانس گیاه نعنای فلفلی باید به این نکته اشاره نمود که ترکیبات فنلی کارواکرول و تیمول عمده ترکیبات اسانس آویشن شیرازی را تشکیل می‌دهند، که این ترکیبات از اثرات ضد باکتریایی و ضد قارچی شناخته شده‌ای برخوردار هستند (۲۱). در پژوهش‌های گذشته مشخص شد که اسانس‌های دارای کارواکرول بیش‌ترین مهار رشد را به‌ترتیب برای قارچ‌های *Aspergillus spp.*، *Cladosporium spp.*، *Botrytis cinerea*، *Fusarium oxysporum* و *Alternaria alternata*، *Penicillium spp.*، *Rhizopus oryzae* باعث شده‌اند (۲۲). حداقل غلظت بازدارندگی از رشد کارواکرول برای قارچ‌های نامبرده شده با مقدار متوسط ۱۵۴ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داد، کارواکرول به‌طور قابل‌توجهی دارای خاصیت قارچ‌کشی بوده است (۲۲). همچنین اثر هم‌زمان دو ترکیب کارواکرول و تیمول با سایر ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس مانند پاراسیمین در

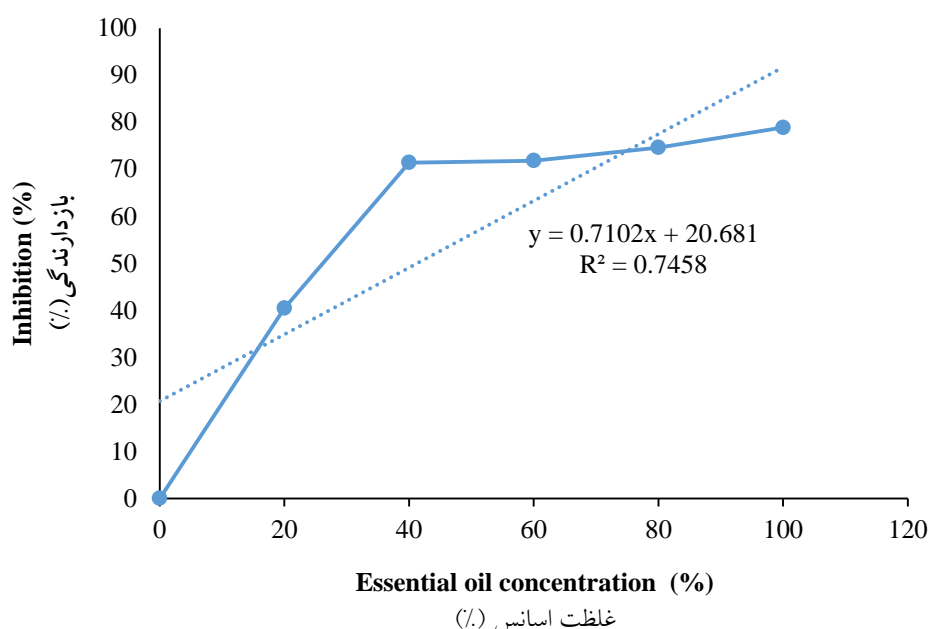
بر روی هیف قارچ ورتیسلیوم مرتبط دانست. اگر چه اختلال در دیواره سلولی هیف، تغییر در خصوصیات ریخت‌شناسی و اضمحلال کنیدی از اثرات اسانس‌ها بر قارچ‌های بیماریزای گیاهی و انسانی ذکر شده است اما در پژوهش‌های اخیر این فرضیه مطرح شد که گروه هیدروکسیل و وجود الکترون‌های Delocalized برای فعالیت ضد میکروبی ترکیبات فنلی مانند کارواکرول و تیمول مهم است که این عوامل می‌توانند در جلوگیری از فعالیت‌های حیاتی قارچ مؤثر باشند (۲۲).

نتایج این بخش نشان داد در مقایسه با قارچ‌کش‌های عمومی مورد استفاده در کنترل قارچ *V. dahliae* (مانند ایپرودیون-کاربندازیم)، استفاده از دو اسانس آویشن شیرازی و نعنای فلفلی می‌تواند در غلظت‌های تا ۱۰ و ۱۵ برابر کم‌تر در جلوگیری از رشد قارچ مؤثر باشد.

بسیار موثر بود به طوری که در افزایش غلظت اسانس‌ها از ۴۰ تا ۱۰۰ میکرولیتر بر لیتر تغییرات مشهودی در بازدارندگی از رشد قارچ مشاهده نگردید.

$$y = 0.7102x + 20.681 \quad (2)$$

آزمایش‌های MIC و MFC یک روش کارآمد برای مقایسه فعالیت قارچ‌کشی و محدودکننده رشد قارچی چندین عامل ضد میکروبی در یک زمان است که از آن به منظور غربالگری استفاده می‌شود. به نظر می‌رسد ترکیبات موجود در اسانس آویشن شیرازی در مقایسه با اسانس نعنای فلفلی در غلظت‌های کم‌تر اثر بهتری را از خود نشان می‌دهند و مانع از فرآیند تشکیل هیف در قارچ ورتیسلیوم می‌شوند که می‌توان آن را به اثر سینرژیستی ترکیبات تشکیل‌دهنده و اثر تدخینی بهتر اسانس آویشن در شرایط آزمایشگاه



شکل ۲- نمودار رگرسیون بین غلظت اسانس‌ها و درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Verticillium dahliae*.
Fig. 2. Regression diagram between essential oils concentration and inhibition percentage of *Verticillium dahliae*.

کارواکرول ارزیابی شد (شکل ۳). همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود غلظت‌های ۱۵۰ و ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر هر دو مونوترپن تیمول و کارواکرول بیش‌ترین اثر بازدارندگی (۱۰۰ درصد) را داشتند؛ اما در غلظت ۱۵ میکرولیتر بر لیتر بیش‌ترین اثر بازدارندگی مربوط به تیمول (۸۱/۷ درصد) و کم‌ترین آن مربوط به کارواکرول (۷/۷۹ درصد) بود.

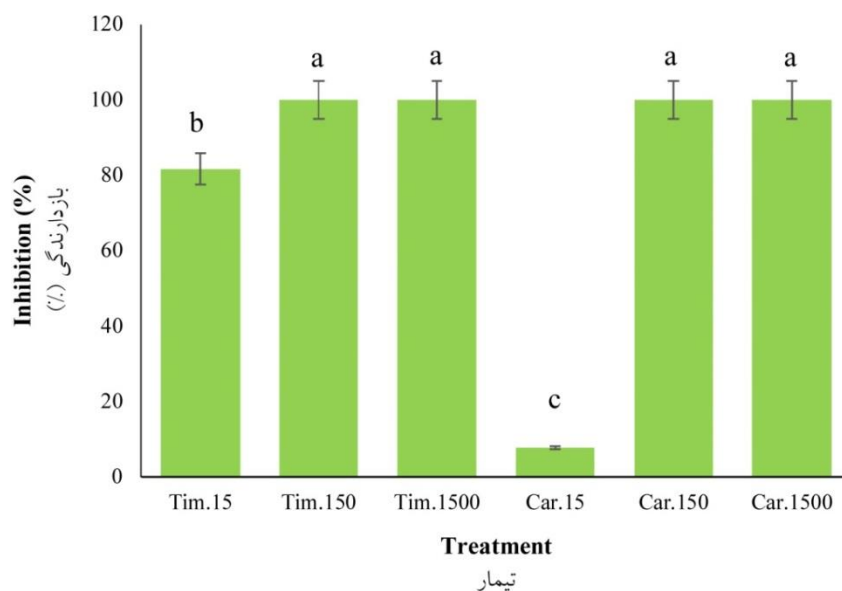
اثر ترکیبات مونوترپنی تیمول و کارواکرول بر رشد قارچ: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۳) اثر ضد قارچی دو ترکیب مونوترپنی مورد آزمایش در مدت زمان دو هفته نشان داد، هر دو ترکیب مونوترپنی تیمول و کارواکرول در جلوگیری از رشد قارچ در مقایسه با شاهد از توانایی بسیار بالایی برخوردار بودند. در مجموع اثر بازدارندگی تیمول بهتر از

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر غلظت‌های مختلف دو مونوترپن تیمول و کارواکرول بر جلوگیری از رشد میسیلیوم‌های قارچ

Verticillium dahliae ($P < 0.05$).

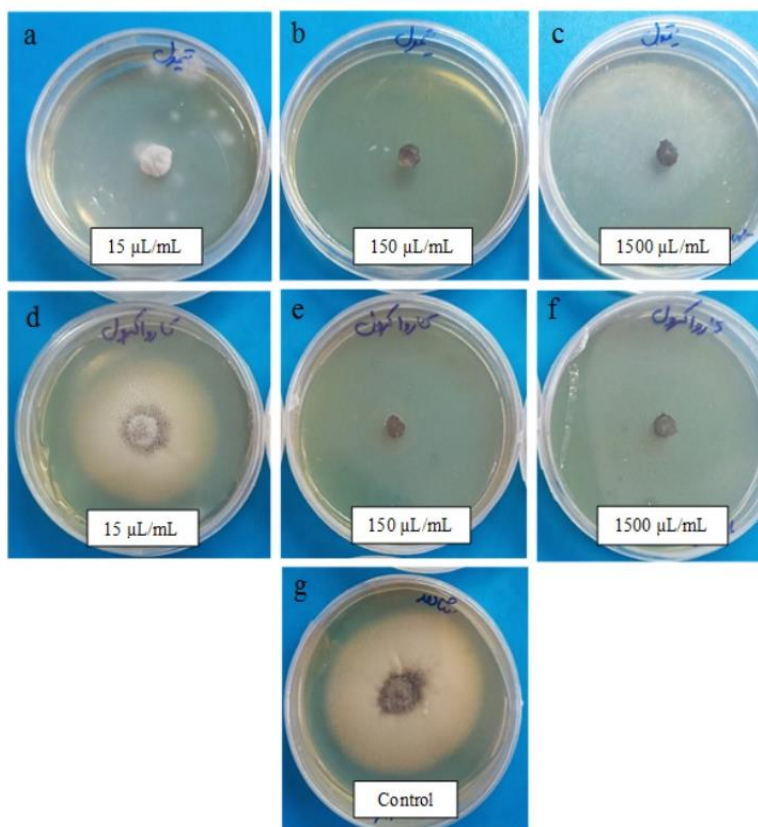
Table 3. Analysis of variance of the effect of different concentrations of thymol and carvacrol monoterpenes on inhibition of growth of *Verticillium dahliae* mycelium ($P < 0.05$).

معنی‌داری Significance	F	میانگین مربعات Mean of Squares	درجه آزادی Degree of Freedom	مجموع مربعات Sum of Squares	منابع تغییرات Source
0.0001	929.043	4081.321	5	20406.6	بین گروه‌ها Between groups
		4.393	12	52.716	درون گروه‌ها Within groups
			17	20459.322	کل Total



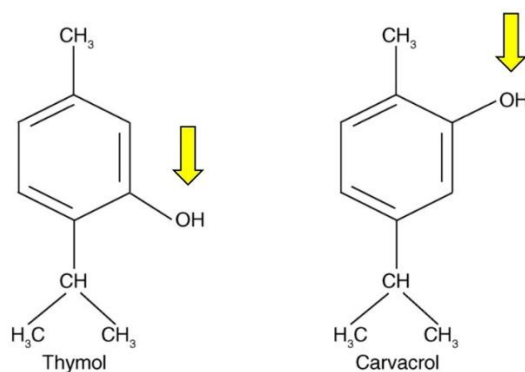
شکل ۳- اثر نوع مونوترپن (تیمول (Tim) و کارواکرول (Car)) و غلظت آن‌ها (۱۵، ۱۵۰ و ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر) بر مهار قارچ *Verticillium dahliae* (درصد). ستون‌های دارای حروف مشابه فاقد اثر معنی‌دار می‌باشند ($P < 0.5$).

Fig. 3. Effect of type of monoterpene (Thymol (Tim) and carvacrol (Car)) and their concentrations (15, 150 and 1500 μ l/ml) on inhibition of *Verticillium dahliae* (percentage). Columns with similar letters have no significant effect ($P < 0.5$).



شکل ۴- میزان اثر دو ترکیب مونوترپنی تیمول و کارواکرول در جلوگیری از رشد قارچ *Verticillium dahliae* در مدت زمان ۱۴ روز در سه غلظت ۱۵، ۱۵۰ و ۱۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر در مقایسه با شاهد. a: تیمول (۱۵ µL/mL)، b: تیمول (۱۵۰ µL/mL)، c: تیمول (۱۵۰۰ µL/mL)، d: کارواکرول (۱۵ µL/mL)، e: کارواکرول (۱۵۰ µL/mL)، f: کارواکرول (۱۵۰۰ µL/mL)، g: شاهد.

Fig. 4. The effect of thymol and carvacrol monoterpenes in preventing the growth of *Verticillium dahliae* for 14 days of incubation at three concentrations of 15, 150 and 1500 µL/mL compared to the control, a: thymol (15 µL/mL), b: thymol (150 µL/mL), c: thymol (1500 µL/mL), d: carvacrol (15 µL/mL), e: carvacrol (150 µL/mL), f: carvacrol (1500 µL/mL), g: control.



شکل ۵- تفاوت گروه هیدروکسیل در دو ترکیب شیمیایی تیمول و کارواکرول.

Fig. 5. Differences of hydroxyl groups in two chemical compounds of thymol and carvacrol.

همان‌طوری که نتایج نشان این بخش نشان داد، ترکیبات مونوترپنی تیمول و کارواکرون دارای اثرات ضد قارچی بسیار مناسبی در برابر قارچ ورتیسیلیوم بودند. کارواکرون با غشای سلولی از طریق تغییر نفوذپذیری کانال‌های K^+/H^+ واکنش می‌دهد و تغییر در شیب یونی منجر به توقف و اختلال عملکردهای اساسی سلول و مرگ آن می‌شود (۲۴). پژوهش‌های اخیر در مورد تیمول و کارواکرون اثبات نموده است که این دو ترکیب به عنوان مولکول‌های کوچک چربی‌دوست می‌توانند از سدهای بسیاری که در سلول‌های جانوری قرار دارد عبور کرده و اثرات خود بر جای بگذارند (۲۵) همچنین ثابت شده است که واکنش اجزای اسانس با یکدیگر نقش مهمی در تعیین اثر ضد میکروبی گیاه ایفا می‌کند، ضمن آن‌که تیمول و کارواکرون دارای اثرات هم‌افزایی می‌باشند (۲۶) از این رو وجود دو ترکیب فوق در گیاه آویشن شیرازی می‌تواند خواص ضد قارچی مطلوبی را فراهم کند.

اکبری‌نیا و همکاران (۱۳۸۹) عملکرد و میزان ترکیبات اصلی آویشن را نشان داده و گزارش داده‌اند که مهم‌ترین ترکیبات ضد قارچی آویشن کارواکرون و تیمول می‌باشند (۲۷). تیمول نسبت به کارواکرون دارای نقش مهم‌تری در افزایش خاصیت ضد میکروبی اسانس گیاه آویشن می‌باشد. دلیل اثر بیش‌تر تیمول نسبت به کارواکرون به ساختار شیمیایی این دو ترکیب مربوط است، در واقع ساختار تیمول و کارواکرون شبیه به یک‌دیگر بوده و کارواکرون ایزومر تیمول می‌باشد و آنچه به قدرت ضد میکروبی تیمول در مقایسه با کارواکرون افزوده است جایگاه گروه هیدروکسیل در ساختار دو ترکیب است (شکل ۵). در مطالعه‌ای دیگر، Gonçalves و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که اسانس گونه‌های آویشن با مقدار بالاتر کارواکرون قدرت قارچ‌کشی بیش‌تری داشتند (۲۸).

تیمول به دلیل ماهیت خود بیش‌تر از کارواکرون در باکتری‌ها و عموم قارچ‌ها اثر ضد میکروبی دارد اما در برخی موارد اثر ضد قارچی کارواکرون بیش‌تر از تیمول گزارش شده است (۲۹). کارواکرون ضمن مهار فعالیت آنزیم ATPase، موجب کاهش نفوذپذیری انتخابی غشاء سلولی ریزجانداران باکتری نسبت به ورود مواد خارجی می‌شود (۳۰). آثار ضد قارچی کارواکرون در گیاهانی مانند مُرد و مرزه خوزستانی نیز به اثبات رسیده است (۳۱). همچنین اسانس آویشن به دلیل تیمول بالا اثر قابل‌توجهی در بازدارندگی تولید آفلاتوکسین $\beta 1$ توسط زنجیره توکسیژنیک قارچ *Aspergillus flavus* داشته است (۳۲). بعضی پژوهش‌گران عقیده دارند که تنظیم تولید آفلاتوکسین و تولید اسپور به یکدیگر پیوسته بوده و علت عدم تولید آفلاتوکسین در سویه‌های غیرتوکسیژنیک *Aspergillus parasiticus* به تغییرات مورفولوژی کندی‌ها و یا عدم توانایی تولید کندی نسبت داده‌اند (۳۳، ۳۴). همچنین در پژوهش‌های گذشته گزارش شده است که مهار رشد قارچ‌ها توسط مونوترپن‌های تیمول و کارواکرون به دلیل دژنره شدن هیف‌های قارچ بوده است (۳۵، ۳۶). با توجه به اثرات سوء ترکیبات شیمیایی مصنوعی که همگی دارای عوارض، برای سلامتی انسان و محیط زیست هستند، استفاده از اسانس‌های طبیعی و ترکیبات فنلی تشکیل‌دهنده آن‌ها (باتوجه به تولید مواد اولیه آن‌ها در کشور) می‌تواند به عنوان ترکیبات نوین یا جایگزین در کنترل عوامل بیماری‌زای قارچی مورد استفاده قرار بگیرند (۲۹). در مورد مقادیر مصرف ترکیباتی مانند تیمول و کارواکرون سازمان بهداشت جهانی حد مجاز ترکیبات فوق در مواد غذایی ۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم اعلام نموده تا شرایط برای کنترل بیمارهای پس از برداشت مواد غذایی آسان شود (۲۲، ۲۴، ۳۷). همچنین در حال حاضر قیمت تمام شده اسانس‌ها و

پژوهش نشان داده استفاده از اسانس‌های گیاهی در کنترل بیماری قارچی ناشی از قارچ *V. dahliae* می‌تواند بسیار کارآمد باشد زیرا دو اسانس و دو ترکیب مونوترپنی مورد آزمایش در غلظت‌های بسیار اندک توانستند از رشد قارچ جلوگیری کنند. نتایج این پژوهش بیانگر آن بود که اسانس آویشن شیرازی و ترکیب مونوترپنی تیمول در غلظت‌های کم‌تر از ۳۰ میکرولیتر بر لیتر می‌توانند اثرات ضد قارچی از خود داشته باشند که در مقایسه با ترکیبات ضد قارچی موجود در بازار، از کارایی بالایی برخوردار هستند. در ضمن باید به این نکته نیز اشاره نمود که در مورد قارچ ورتیسلیوم بیماریزای درختان میوه از جمله پسته، تاکنون از طریق سازمان حفظ نباتات هیچ گونه قارچ‌کشی معرفی نشده است و در صورت پژوهش‌های بیش‌تر بر روی سازوکار اثر ترکیبات اسانسی، اجزاء تشکیل‌دهنده آن‌ها، توجیه‌پذیری اقتصادی و به‌کارگیری آن در شرایط باغ، این ترکیبات می‌توانند به عنوان قارچ‌کش‌های طبیعی و تجزیه‌پذیر به کشاورزان معرفی شوند.

ترکیبات مونوترپنی آن‌ها از ترکیبات شیمیایی گران‌تر می‌باشد ولی به دلیل اثر در غلظت‌های ناچیز این ترکیبات در صورت برنامه‌ریزی مدون جهت تولید ترکیبات اولیه می‌توانند توجیه اقتصادی داشته باشند (۲۹).

نتیجه‌گیری کلی

از دوران باستان، گیاهان دارویی به واسطه داشتن ترکیبات مؤثره متفاوت در درمان بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفته‌اند. یکی از ترکیبات مؤثره اصلی این گیاهان، اسانس‌ها یا روغن‌های فراراند که دارای اثرات زیستی فراوانی می‌باشند. در چند دهه اخیر با کاربرد بیش اندازه سموم شیمیایی و مشخص شدن اثرات آن بر سلامت مصرف‌کننده و از سویی مقاومت عوامل بیماری‌زای قارچی به سموم رایج، استفاده از ترکیبات جایگزین سموم شیمیایی توجهات زیادی را به خود جلب کرده است. پژوهش‌های زیادی در مورد خواص ضد میکروبی و ضد قارچی اسانس‌های گیاهی انجام شده شده است (۱۸). از این‌رو حرکت در این مسیر می‌تواند به گسترش ترکیبات نوین ضد قارچی منجر شود. نتایج این

منابع

1. AL-Saghir, M.G. and Porter, D.M. 2012. Taxonomic revision of the genus Pistacia L. (Anacardiaceae). Am. J. Plant Sci. 3: 1. 12-32.
2. Taghizadeh-Alisaraei, A., Alizadeh Assar, H., Ghobadian, B. and Motevali, A. 2017. Potential of biofuel production from pistachio waste in Iran. Renew. Sustain. Energy Rev. 72: 510-522.
3. Eskalen, A., Küsek, M., Danıştı, L. and Karada, S. 2001. Fungal diseases in pistachio trees in East-Mediterranean and Southeast Anatolian regions. In '11 GREMPA Seminar on pistachios and almonds. Zaragoza, CIHEAM-IAMZ'. (Ed. BE Ak) pp. 261-264.
4. Jafary, H., Khanmohammadi, S. and Mehri, N. 2014. Detection of pathotypes of *Verticillium dahliae*, the causal agent of olive *Verticillium wilt* in olive orchards of Tarom using Nested-PCR technique. J. Appl. Res. Plant. Prot. 2: 2. 47-58. (In Persian)
5. Nasimi, Z., Bani Hashmi, Z. and Mostofizade, R. 2013. In vivo interaction of *Verticillium dahliae*, the causal agent of pistachio *Verticillium* with *Acremonium kiliense*. Iran. J. Plant Path. 49: 4. 127-129. (In Persian)
6. Mohammadi, A.H., Haghdel, M., Moghaddam, M.M. and Banihashemi, Z. 2006. Current status of *Verticillium wilt*

- disease of pistachio trees in Iran, IV International Symposium on Pistachios and Almonds.
7. Fotoohiyan, Z., Rezaee, S., Shahidi Bonjar, G.H., Mohammadi, A.H. and Moradi, M. 2015. Induction of systemic resistance by *Trichoderma harzianum* isolates in pistachio plants infected with *Verticillium dahliae*. *J. Nuts*. 6: 2. 95-111. (In Persian)
 8. Bajpai, V.V., Shukla, S. and Kang, S.C. 2008. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria* L. *Bioresource Tech*. 99: 18. 8903-8908.
 9. Aali, E., Mahmoudi, R., Kazeminia, M., Hazrati, R. and Azarpey, F. 2017. Essential oils as natural medicinal substances: review article. *Tehran Univ. Med. J.* 75: 7. 480-489. (In Persian)
 10. Kamatou, G.P. and Viljoen, A.M. 2010. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 87: 1. 1-7.
 11. Mansoori, S., Dakhili, M. and Zargar, M. 2014. The comparison of concentration in-vitro effects of *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha pulegium* essential oil plants composition with one of them Nystatin on *Candida albicans* isolates of vaginal candidiasis and comparing their with standard. *Appl. Biology*. 4: 2. 1-14. (In Persian)
 12. Pina-Vaz, C., Rodrigues, A.G., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L.R., Cavaleiro, C., Goncalves, M.J. and Martinez-de-Oliveira, J. 2004. Antifungal activity of Thymus oils and their major compounds. *J. Eur. Acad. Dermatol.* 18: 1. 73-78.
 13. Arslan, M. and Dervis, S. 2010. Antifungal activity of essential oil against three vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 1813-1821.
 14. Amini, J., Farhang, V., Javadi, T. and Nazemi, J. 2016. Antifungal effect of plant essential oils on controlling *Phytophthora* species. *Plant Path. J.* 32: 16-24.
 15. Hillocks, R.J. 1992. *Cotton Diseases*. CAB International, Wallingford, UK. 415p.
 16. Damjanović-Vratnica, B., Dakov, T., Sukovic, D. and Damjanovic, J. 2011. Antimicrobial effect of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech J. Food Sci.* 29: 3. 277-284.
 17. Sharifi-Rad, J., Miria, A., Hoseini-Alfatemic, S.M., Sharifi-Radd, M., Setzere, W.N. and Hadjiakhoondif, A. 2014. Chemical composition and biological activity of *Pulicaria vulgaris* essential oil from Iran. *Nat. Prod. Commun.* 9: 11. 1633-1636.
 18. Shariari, F., Tanhaeian, A., Akhlaghi, M. and Nazifi, N. 2018. Comparison of antimicrobial activity of essential oils and plant extracts with recombinant peptide in controlling of some pathogens of cultivated white button mushrooms. *J. Hort. Sci.* 32: 4. 615-628. (In Persian)
 19. Riccioni, L. and Orzali, L. 2011. Activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*, Cheel) and thyme (*Thymus vulgaris*, Linnaeus.) essential oils against some pathogenic seed borne fungi. *J. Essent. Oil Res.* 23: 6. 43-47.
 20. Ghezelbash, N., Abdolahi, M. and Shahriari, D. 2012. Evaluation of antifungal activity of Shirazi thyme and Chavil extracts on *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*, the causal agent of tomato wilt under laboratory and greenhouse conditions. *Plant Protec.* 36: 4. 53-65. (In Persian)
 21. Mehran, M., Hosseini, H. Hatami, A., Taghizadeh, M. and Safaei, A. 2015. Investigation of components of seven species of thyme essential oils and comparison of their antioxidant properties. *J. Med. Plants.* 58: 2. 134-140. (In Persian)
 22. Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A.R. and Abbaszadeh, A. 2014. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *J. Mycol. Med.* 24: 2. 51-56.

23. Abdolmaleki, M., Bahraminejad, S., Salari, M., Abbasi, S., Panjeke, N. 2011. Antifungal activity of peppermint (*Mentha piperita* L.) on phytopathogenic fungi. *J. Med. Plants*. 10: 38. 26-34.
24. WHO. <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/28.html> 2012.
25. Jukic, M., Politeo, O., Maksimovic, M., Milos, M. and Milos, M. 2007. In vitro acetylcholinesterase inhibitory properties of thymol, carvacrol and their derivatives thymoquinone and thymohydroquinone. *Phytother. Res.* 21: 3. 259-61.
26. Didry, N., Dubreuil, L. and Pinkas, M. 1994. Activity of thymol, carvacrol, cinnamaldehyde and eugenole on oral bacterial. *Pharm. Acta. Helv.* 69: 1. 25-8.
27. Akbarinia, A., Sharifi Ashoorabadi, E. and Mirza, M. 2011. Study on drug yield and essential oil content and composition of *Thymus daenensis* Celak. under cultivated condition. *Iranian J. Med. Arom. Plants*. 26: 2. 205-212. (In Persian)
28. Gonçalves, G.M.S, Srebernich, S.M., Bragagnolo, N., Madalozzo, E.S., Merhi V.L. and Pires, D.C. 2013. Study of the composition of *Thymus vulgaris* essential oil, developing of topic formulations and evaluation of antimicrobial efficacy. *J. Med. Plant Res.* 7: 2. 1736-1745.
29. Lahoogi, A., Mirabolfathi, M. and Karami Osboo, R. 2010. Effect of *Zataria multiflora* and *Satureja hortensis* essential oils, Thymol and carvacrol on growth of *Fusarium graminearum* isolates and deoxynivalenol production. *J. Plant Pathology*. 46: 1. 37-50. (In Persian)
30. Najb-Zadeh, T., Yadegari, M., Nagdi Badi, H. and Salehnia, E. 2011. Antifungal efficacy of *Myrtus communis* essential oils on oral candidiasis in immunosuppressed Rats. *J. Med. Plants*. 10: 38. 102-116. (In Persian)
31. Sharifian, M., Bolhari, B., Nosrat, A. and Aligholi, M. 2009. The effect of carvacrol on *Enterococcus faecalis* as an intracanal medicament-Invitro study. *J. Dent. Med.* 22: 1. 35-40.
32. Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., Prasad, C.S. and Dubey, N.K. 2008. Assessment of *Thymus vulgaris* L. essential oil as a safe botanical preservation against post-harvest fungal infestation of food commodities. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 9: 4. 575-580.
33. Kale, S., Cary, J.W., Bhatnagar, D. and Bennett, J.W. 1996. Characterization of experimentally induced, non aflatoxigenic variant strain of *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 9. 3399-404.
34. Rasooli, I. and Owlia, P. 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*. 66: 24. 28-36.
35. Zambonelli, A.D., Aurelio, A.Z., Bianchi, A. and Albasini, A. 1996. Effect of essential oils on phytopathogenic fungi. *J. Phytopathol.* 144: 9. 491-4.
36. Ultee, A., Kets E.P.W. and Smid, E.J. 1999. Mechanism of action of carvacrol on the food borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 10. 46-10.
37. Meepagala, K.M., Sturtz, G. and Wedge, D.E. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracunculus* L. var. *dracunculus*. *J. Agric. Food Chem.* 50: 24. 6989-6992.

