

## بررسی تأثیر عصاره‌های سیر و آویشن شیرازی بر روی بیماری کپک سبز (*Penicillium digitatum*) و بعضی از مکانیسم‌های دفاعی در پرتقال

جلال غلام‌نژاد<sup>۱\*</sup>، شکیبا ارسلانی<sup>۲</sup> و مژده ملکی<sup>۳</sup>

۱ - نویسنده مسوول: استادیار، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه اردکان، اردکان، ایران (jgholamnezhad@ardakan.ac.ir)

۲ - دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری‌شناسی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ورامین، ایران

۳ - استادیار، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین، ورامین، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۲/۰۲

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۹/۱۴

### چکیده

استفاده از سموم شیمیایی در طی دهه‌ها باعث ایجاد آلودگی محیط‌زیست و همچنین ایجاد باقیمانده بر روی محصولات غذایی شده است. در این پژوهش از عصاره‌های آبی و متانولی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) و سیر (*Allium sativum* L.) جهت کنترل بیماری کپک سبز پرتقال با عامل *Penicillium digitatum* Sacc. در آزمایشگاه و در انبار ۱۵ درجه سلسیوس استفاده شد. نتایج آزمون دیسک‌گذاری در محیط کشت نشان داد که، عصاره آبی و الکلی سیر (غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۲۶ و ۳۲ میلی‌متر قطر ممانعت از قارچ بیمارگر، دارای بیشترین اثر کنترل‌کنندگی و عصاره آبی و الکلی آویشن شیرازی (غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۱۰ و ۱۴ میلی‌متر قطر ممانعت از قارچ بیمارگر، دارای کمترین اثر کنترل‌کنندگی بود. در آزمون اختلاط با محیط کشت، عصاره‌های آبی و الکلی سیر در غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر به ترتیب با ۶۵/۲۵ و ۷۵/۲۶ درصد ممانعت از قارچ بیمارگر بهترین کنترل‌کنندگی بیمارگر را نشان دادند. در آزمون انبار ۱۵ درجه سلسیوس، سطح لکه ایجاد شده در تیمار عصاره‌های آبی و الکلی سیر و آویشن شیرازی با غلظت شش در هزار،  $5/30 \text{ cm}^2$  (آبی) و  $3/26 \text{ cm}^2$  (الکلی) برای سیر،  $7/44 \text{ cm}^2$  (آبی) و  $4/15 \text{ cm}^2$  (الکلی) برای آویشن شیرازی، کمترین میزان خود را در مقایسه با سایر تیمارها و همچنین تیمار شاهد (با میزان  $30/47 \text{ cm}^2$ ) داشتند. نتایج بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز نشان داد که بیشترین فعالیت هر دو آنزیم نه روز بعد از نمونه برداری و در تیمار شش در هزار عصاره سیر مشاهده شد. میزان نسخه‌برداری سه ژن کدکننده آنزیم‌های پراکسیداز، پلی‌فنل‌اکسیداز و فنیل‌آلانیل‌آمونیاپاز روندی مانند میزان فعالیت سه آنزیم در طول ۱۲ روز نمونه برداری داشت و در روز نهم، بیشترین میزان نسخه‌برداری این سه آنزیم به ترتیب با مقدار عددی ۱۵/۲۳، ۱۱/۸۰ و ۱۲/۳۶ برابر شاهد سالم بودند. بر اساس نتایج آزمون‌های آزمایشگاهی و انباری، عصاره هر دو گیاه سیر و آویشن شیرازی به عنوان ترکیبات طبیعی با پتانسیل کنترل‌کنندگی معرفی می‌شوند.

کلیدواژه‌ها: عصاره گیاهی، کپک سبز، فعالیت آنزیم دفاعی، بیان ژن‌های دفاعی

### مقدمه

نظر میزان تولید مرکبات دنیا با ۱۸ تن در هکتار رتبه هشتم و از نظر صادرات مرکبات با ۵۵ هزارتن در رتبه بیست و پنجم قرار دارد (faostat.fao.org, 2015). پرتقال گیاهی

ایران جز هفت کشور تولیدکننده عمده مرکبات در جهان به شمار می‌رود. بر مبنای گزارش فائو کشور ایران از

مانند قارچکش بنومیل و تیابندازول استفاده می‌کنند. بنومیل به علت نفوذ در میوه برای سلامت مصرف کنندگان بسیار خطرناک است و مصرف آن برای این مورد غیر مجاز اعلام شده است (Burt, 2004). امروزه در سطح جهان سعی در جهت به حداقل رساندن استفاده از تیمارهای شیمیایی برای کاهش ضایعات و افزایش عمر نگهداری میوه‌های مرکبات پس از برداشت است (Agrios, 2005). استفاده از ترکیبات شیمیایی از یک طرف به دلیل نگرانی‌هایی که در مورد آلودگی محیط زیست و همچنین به مخاطره افتادن سلامت انسان وجود دارد و از طرف دیگر ایجاد مقاومت در جدایه‌های عوامل بیمارگر علیه این قارچکش‌ها، تحقیق در مورد یافتن روش‌های کم زیان‌تر و کم خطرتر را افزایش داده است (Gholamnezhad et al., 2017). در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی در استفاده از مواد با منشأ طبیعی برای کنترل بیماری‌های بعد از برداشت انجام شده است و تحقیقات زیادی در این زمینه انجام شده است (Gholamnezhad et al., 2009). راهکارهای متفاوتی به جای استفاده از ترکیبات شیمیایی مطرح و تحقیقات زیادی بر روی آن‌ها صورت گرفت، که استفاده از روش‌های کنترل بیولوژیک و همچنین ترکیبات با منشأ گیاهی از مهم‌ترین این روش‌ها می‌باشد و تحقیقات بسیار زیادی بر روی آن‌ها صورت گرفته است (Gholamnezhad et al., 2017).

استفاده از ترکیباتی که منشأ طبیعی دارند می‌تواند راه‌حل موثری برای کنترل این بیماری و به طور کلی بیماری‌های بعد از برداشت محصولات باشد. تا حالا گزارشی مبنی بر مقاومت بیمارگرها نسبت به اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی گزارش نشده است، که این موضوع را می‌توان به تعدد ترکیبات تشکیل‌دهنده‌ی اسانس‌ها و نیز عصاره‌ها و همچنین چند عملکردی بودن این عصاره‌ها در سلول‌های گیاهی مرتبط دانست (Gholamnezhad et al., 2017). از دیگر مزایای

بومی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری است. یکی از معضلات عمده در خصوص مرکبات عوارض فیزیولوژیکی، پاتوژنی و ضایعات قبل، حین و پس از برداشت بوده و در مجموع ۳۰ درصد محصول تولید شده را از بین می‌برد (Wijewardane and Guleria, 2009). بعد از برداشت، محصولات میوه‌ای به‌طور ویژه نسبت به آلودگی به عوامل بیماری‌زا حساس هستند زیرا مقاومت طبیعی که بر روی درخت داشتند را از دست داده‌اند. صدمات وارده در هنگام چیدن و بسته‌بندی، محل اصلی برای ورود عوامل بیماری‌زا، به خصوص در محیط‌هایی است که اسپور بیمارگرهای *Penicillium italicum*، *Botrytis cinerea* و *P. digitatum* حضور دارند، می‌باشد (Arras, 1996). پوسیدگی‌های آبی و سبز میوه مرکبات به ترتیب توسط قارچ‌های *P. italicum* و *P. digitatum* ایجاد می‌شوند. زخم‌ها و جراحاتی که بر روی میوه در حین برداشت ایجاد می‌شود، محل مناسبی برای ورود اسپورهای هوازا بیماری‌زا هستند و از راه این زخم‌ها اسپورها وارد بافت میوه شده و خساراتی را بر روی میوه مرکبات ایجاد می‌کنند که گاهی اوقات خسارات آن بالغ بر ۵۰ درصد گزارش شده است (Arras, 1996). ترکیبات فراری که از بافت پوست زخم شده میوه‌های مرکبات آزاد می‌شود، دارای تأثیر محرک روی جوانه زنی اسپور و رشد لوله جوانه‌زنی در عوامل بیمارگر می‌شود (Droby, 2002). بیمارگرهای *P. italicum* و *P. digitatum* باعث اسیدی کردن سطح میوه مرکبات شده و در نهایت باعث پوسیدگی آن‌ها می‌شوند (Prusky et al., 2004). پوسیدگی پنی‌سیلیومی باعث گسترش لکه‌ها شده و ظرف مدت کوتاهی باعث ایجاد لکه پوسیده عمیق در بافت میوه خواهد شد (Agrios., 2005). در حال حاضر بهره‌برداران مرکبات برای مقابله با رشد قارچ‌های انباری از روش‌های غیر دوستدار محیط‌زیست

## مواد و روش‌ها

### جمع آوری میوه پرتقال

میوه‌های پرتقال آلوده به بیمارگر کپک سبز از میادین تره بار استان البرز جمع‌آوری شدند و سپس به وسیله میله‌ای شیشه‌ای از مناطق حاوی قارچ کپک سبز ( *P. digitatum*) به طور جداگانه نمونه برداری شد و بر روی محیط PDA (Potato Dextrose Agar) کشت داده شد و به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. یک جدايه از این قارچ به روش تک اسپور کردن خالص سازی شد. با استفاده از صفات ریخت‌شناسی و منابع تاکسونومیکی، گونه‌ی این بیمارگر تشخیص داده شد. بر روی سطح محیط کشت آب مقطر سترون ریخته شد و به آرامی اسپورهای سطح محیط کشت جمع‌آوری شدند. غلظت اسپورهای مورد استفاده در این پژوهش با استفاده از لام هماسیتومتر  $10^6$  اسپور در میلی‌لیتر تنظیم شد (Gholamnezhad et al., 2010).

### مواد گیاهی (تهیه عصاره‌های گیاهی)

در این تحقیق، از عصاره گیاهان سیر (میوه) (*Allium sativum*) و آویشن شیرازی (اندام هوایی) (*Zataria multiflora*) استفاده شد. این گیاهان ابتدا شستشوی سطحی شده و سپس به وسیله هیپوکلریت ۲ درصد به مدت یک دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر سترون سه مرتبه شسته شدند (Alam et al., 2014). نمونه‌ها در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش مستقیم نور آفتاب خشک شدند. سپس اندام‌های هوایی به وسیله خردکن پودر شده و از الک یک مش عبور داده شدند (Gholamnezhad et al., 2016a).

تهیه عصاره‌های گیاهی به دو روش استفاده از متانول و آب انجام شد. در روش استفاده از متانول، پنج گرم از ماده خشک گیاهی در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول خالص (شرکت مرک<sup>۱</sup>) خیسانده شد و بعد از ۲۴ ساعت، ماده گیاهی همراه

استفاده از عصاره‌های گیاهی برای مدیریت بیماری‌های بعد از برداشت این است که pH اسیدی و دمای پایین و همچنین کم بودن سطوح اکسیژن فعالیت ضدقارچی و ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی را بهبود می‌بخشد و در واقع این شرایط مشابه شرایط نگهداری محصولات باغی به خصوص پرتقال است (Burt, 2004).

یکی از گیاهانی که اثر میکروب کشی وسیعی دارد و به دلیل خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی آن، مصرف زیاد دارد، گیاه *Allium sativum* L. است (Martinez et al., 2007). خواص ضدقارچی و ضدباکتریایی گیاه سیر بارها توسط محققان به اثبات رسیده و این گیاه واجد ترکیبات سولفور و سایر ترکیبات فنولیکی است (Belew et al., 2009). گیاه دیگر آویشن شیرازی است. مطالعات متعددی خاصیت ضد میکروبی عصاره و اسانس آویشن شیرازی را نشان داده‌اند. اثر آویشن شیرازی، آویشن کوهی و باغی روی تعدادی قارچ بیمارگر گیاهی مانند *Rhizoctonia solani* مطالعه شد. نتایج نشان داد که اسانس آویشن شیرازی در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر بر لیتر (محیط کشت) اثر صد در صد بازدارندگی داشت (Amini et al., 2012).

از آنجایی که پوسیدگی سبز پرتقال یکی از مهم‌ترین بیماری‌های بعد از برداشت پرتقال می‌باشد و از طرفی عصاره‌های گیاهی از جمله ترکیبات سازگار با محیط زیست با منشأ گیاهی است، در نتیجه در این پژوهش اثر عصاره‌های گیاهی شامل سیر و آویشن شیرازی در آزمایشگاه و در محیط انبار (دمای ۱۵ درجه سلسیوس) بر قارچ بیمارگر *P. digitatum* ارزیابی شد. سپس تأثیر این دو عصاره بر روی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی فنل اکسیداز و میزان ترکیبات فنلی بررسی شد و در قسمت آخر تحقیق تأثیر عصاره‌های گیاهی بر روی میزان بیان ژن‌های دفاعی با روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

قرارداده شد. بعد از قرار دادن پرگنه قارچ در ظروف پتری، درب ظروف پتری بسته و دور آن به وسیله پارافیلیم مسدود شد. سپس ظروف پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور قرار داده شد. قطر پرگنه قارچ بیمارگر بعد از ۴۸ ساعت به حدود دو سانتی‌متر رسید. پس از این مرحله دیسک‌های حاوی عصاره‌ها در فاصله دو سانتی‌متری حاشیه روئیده قارچ قرار داده شد. سپس در فواصل زمانی مختلف، شعاع هاله بازدارندگی از روبروی پتری یادداشت برداری شد و میانگین آن در محاسبات لحاظ شد. در این آزمایش، از حلال مورد نظر به عنوان شاهد منفی استفاده شد. آزمایش در چهار تکرار انجام شد. به منظور بررسی اثر قارچ‌کشی و یا قارچ‌ایستایی عصاره‌های موثر گیاهی قطعه کوچکی از میسلیم قارچ برداشته و روی محیط PDA قرار داده شد تا رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت جدید بررسی شود (Hadian et al., 2011).

#### تأثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت

در هر ظرف پتری که حاوی ۲۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA بود، عصاره‌های گیاهی در غلظت‌های ۰ (شاهد)، ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر به همراه ۰/۰۰۵ درصد توین ۸۰ به آن اضافه شد. پلاکی از حاشیه کشت هفت روزه قارچ بیمارگر *Penicillium* در مرکز ظروف پتری قرار داده شد و تا روز پنجم قطر میسلیمی آن اندازه‌گیری شد. تمامی مراحل در شرایط سترون و در سه تکرار صورت گرفت و همه آزمایشات دو بار انجام شد (Oxenham et al., 2005). درصد بازدارندگی رشد میسلیمی هر تیمار از فرمول زیر [۱] محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی رشد قارچ} = \frac{(A-B)}{A}$$

A: قطر پرگنه در شاهد

B: قطر پرگنه در تیمار

متانول در یک هاون چینی ساییده شد. محلول حاصل توسط پارچه ململ صاف شده و در ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. ۷۵ میلی‌لیتر از محلول رویی به یک استوانه مدرج منتقل شده، ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر سترون به آن اضافه شد تا حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر برسد، سپس هم‌حجم با آن هگزان اضافه شد. این مخلوط دو ساعت روی شیکر قرار داده شد. پس از این مرحله، بخش‌های مختلف به کمک دکاتور جدا شده و بخش متانولی جهت تبخیر متانول و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد (Bahraminejad et al., 2008).

در روش دوم بعد از ضدعفونی سطحی نمونه‌های گیاهی، پنج گرم از ماده خشک گیاهی در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر سترون خیسانده شد و پس از ۲۴ ساعت از پارچه ململ عبور داده شد و سانتریفوژ شد. در این مرحله به منظور سترون کردن عصاره آبی، از صافی میکروبیولوژیک دو میکرونی استفاده شد (Azimi et al., 2006).

#### تأثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش دیسک کاغذی

مقدار ۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم از هر عصاره در ده میلی‌لیتر از حلال مناسب حل شد و مورد استفاده قرار گرفت (Meliss et al., 2005). در مورد عصاره‌های آبی از آب مقطر و در مورد عصاره‌های متانولی از متانول ۴۵٪ به عنوان حلال استفاده شد. سپس ۵۰ میکرولیتر از هر نمونه (طی پنج مرحله، هر بار ۱۰ میکرولیتر) با استفاده از سمپلر روی دیسک‌های کاغذ صافی به قطر شش میلی‌لیتر بارگذاری شده و برای تبخیر حلال در فضای آزمایشگاه قرار داده شد. برای بررسی اثر آنتی‌میکروبیال عصاره‌های گیاهی از حاشیه پرگنه‌ی هفت روزه قارچ بیمارگر روی محیط PDA، قرص‌هایی به قطر شش میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ‌کن تهیه و در وسط پتری حاوی محیط PDA

(Ibtesam et al., 2009). میوه‌هایی که تیمار شده بودند در داخل کیسه‌های نایلونی قرار گرفتند و در دمای اتاق (۱۵ درجه سلسیوس و رطوبت ۹۰ درصد) تا زمانی نگهداری شدند که پرتقال‌های شاهد به طور کامل پوسیده شوند (در حدود ۱۵ روز). برای تأمین رطوبت داخل کیسه‌های آزمایشی، هر دو روز یکبار به وسیله آب مقطر سترون اسپری صورت گرفت. بعد از سپری شدن مدت زمان لازم، شدت بیماری (سطح لکه‌های بیماری) ارزیابی شد (Etebarian et al., 2005).

هر تیمار شامل چهار تکرار بود و هر تکرار از دو میوه تشکیل شده بود. تیمار شاهد شامل میوه‌های سالمی بود که در آب مقطر سترون غوطه‌ور شدند. این آزمایش به صورت آزمون فاکتوریل با دو فاکتور A و B در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار انجام گرفت. فاکتور A شامل عصاره‌های مختلف و فاکتور B نیز شامل غلظت‌های مختلف عصاره بود، که در آزمون‌های مختلف دارای تعداد سطوح مختلف بود.

### اندازه‌گیری فعالیت‌های آنزیم‌های دفاعی و ترکیبات فنلی

#### ارزیابی میزان پروتئین کل قابل حل در عصاره (Bradford, 1976)

برای محاسبه فعالیت اختصاصی آنزیم‌های مورد آزمون و تعمیم فعالیت آنزیم به میلی گرم پروتئین موجود در بافت، میزان پروتئین کل موجود در نمونه‌ها به روش برادفورد تعیین شد (Bradford, 1976). این روش بر مبنای اتصال رنگ کوماسی بریلیانت بلو موجود در معرف بردفورد به ملکول پروتئین استوار است.

#### تهیه محلول پایه پروتئین استاندارد

برای تهیه منحنی استاندارد ابتدا محلول پایه پروتئین تهیه شد. پنج میلی گرم از پروتئین استاندارد (ساخت کارخانه Fluka) در پنج میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۵۰

### بررسی اثر عصاره‌ها در کنترل بیماری کپک سبز پرتقال در انبار ۱۵ درجه سلسیوس

در این آزمون، از میوه‌های سالم و بدون زخم و یک اندازه تامسون ناول که از میادین میوه استان البرز تهیه شده بود، استفاده شد و نهایت دقت در استفاده از رقم مشابه به عمل آمد. از میوه‌هایی استفاده شد که حتی الامکان متعلق به یک منطقه بوده و از نظر رسیدگی تقریباً در یک سطح فیزیولوژیکی بودند (۷۵-۸۰ درصد). در این آزمایش‌ها سعی بر استفاده از میوه‌ها با اندازه یکسان بوده است. برای ضدعفونی سطحی، میوه‌ها در هیپوکلریت سدیم ۲ درصد غوطه‌ور و سپس دوبار با آب سترون شستشو داده شدند و در نهایت به مدت ۲۰ ثانیه در اتانول ۷۰ درصد غوطه‌ور شدند. برای پوشش‌دهی میوه‌ها با عصاره‌های گیاهی، میوه‌ها در این عصاره‌ها غوطه‌ور و سپس به وسیله موم تیمار شدند. موم زنبور عسل که در لوله‌های فلزی نگهداری می‌شدند، ابتدا ذوب و سپس میوه‌هایی که به وسیله عصاره‌های گیاهی پوشش داده شده بودند در این موم غوطه‌ور شدند. غلظت‌های مورد استفاده در این آزمون شامل یک، دو، چهار و شش گرم در یک لیتر آب مقطر می‌باشد. ۲۴ ساعت بعد از غوطه‌ور کردن میوه‌ها در تیمارهای ذکر شده، میوه‌ها زخم شدند و با سوسپانسیون اسپورقارچ با غلظت  $10^6$  اسپری شدند. برای این منظور، با استفاده از یک میخ سترون دو سوراخ به قطر ۱ mm و عمق ۲/۵ mm در هر پرتقال ایجاد شد. اسپورهای قارچ بیمارگر از کشت هفت روزه روی محیط کشت PDA تهیه شد. ابتدا یک لوپ از اسپور قارچ عامل بیماری از روی محیط کشت برداشته شد و بعد در ۱۰ میلی لیتر آب مقطر سترون حاوی ۰/۰۵ درصد (حجم به حجم) توئین ۲۰ غوطه‌ور گردیدند. از سوسپانسیون حاصل جهت تهیه غلظت‌های مورد نیاز استفاده شد. غلظت مورد نیاز با استفاده از لام هماسیتومتر و افزودن آب مقطر سترون به دست آمد

محاسبه شد)، با مقداری از بافر فسفات سدیم ۵۰ میلی مولار با  $\text{pH}=7$  به حجم دو میلی‌لیتر رسانده و سپس در دستگاه اسپکتروفتومتر قرار داده شد و دستگاه با آن کالیبره شد. سپس به میزان ۱۰۰ میکرولیتر از  $\text{H}_2\text{O}_2$  سه درصد به مخلوط واکنش اضافه و میزان جذب نور به مدت دو دقیقه اندازه‌گیری شد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس مقدار تجزیه شدن  $\text{H}_2\text{O}_2$  اندازه‌گیری می‌شود. جذب محلول‌ها در ۲۴۰ نانومتر نسبت به آب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد.

فعالیت کاتالاز بر اساس میلی‌مولار پراکسید هیدروژن در دقیقه در میلی گرم پروتئین (  $\Delta\text{OD} / \text{Min./mg.}$  protein) در چهار تکرار اندازه‌گیری شد.

#### ارزیابی میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز

دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای ۵۰ میلی‌گرم پروتئین باشد (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد محاسبه شد)، ۵ میلی‌مولار گوئیکول و مقدار کافی بافر فسفات ۲۵ میلی مول  $\text{pH}=7$  تا به حجم نهایی دو میلی لیتر برسد، در یک لوله آزمایش ریخته و دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط در طول موج ۴۷۰ نانومتر صفر گردید. سپس ۵ میکرولیتر پراکسید هیدروژن ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) ۳۰ درصد به این مخلوط اضافه شد و سریعاً تغییرات جذب نور به فواصل ۱۰ ثانیه، به مدت یک دقیقه اندازه‌گیری شد. مقدار فعالیت آنزیم بر حسب تغییرات جذب نور بر دقیقه بر میلی گرم پروتئین بیان شد (  $\Delta\text{OD} / \text{Min./mg.}$  protein) (Gholamnezhad et al., 2016b).

#### ارزیابی میزان فعالیت پلی فنل اکسیداز (روش Shi et al., 2001)

فعالیت آنزیم پلی فنل اکسیداز بر اساس روش ارائه شده به وسیله Shi et al. (2001) انجام شد. دو میلی‌لیتر مخلوط واکنش شامل مقداری از عصاره که دارای ۵۰ میلی‌گرم پروتئین باشد، و مقدار کافی بافر فسفات سدیم  $\text{pH}=7$  به

میلی مولار با  $\text{pH} 7$  حل شده و در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. پروتئین استاندارد مورد استفاده، آلبومین سرم گاوی<sup>۲</sup> فراکسیون BSA پنج بود.

در مرحله بعد با استفاده از محلول BSA در آب مقطر سترون منحنی استاندارد رسم و معادله رگرسیون بر اساس جذب نور هر کدام از غلظت‌ها محاسبه و ترسیم شد. برای تعیین میزان پروتئین کل عصاره مورد آزمایش، مقدار پنج میکرولیتر از عصاره هر نمونه با سه میلی‌لیتر محلول برادفورد کاملاً مخلوط شد و تغییرات جذب نور در طول موج  $\lambda \text{ max}=595$  توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل CECIL 9500، ساخت انگلیس) اندازه‌گیری شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد (Bradford, 1976).

#### استخراج پروتئین از بافت گیاه

به ۱۰۰ میلی‌گرم از بافت میوه پرتقال نمونه برداری شده طبق بند ۲-۵ (فقط از عصاره سیر استفاده شد) در یک ویال دو میلی‌لیتری، یک میلی‌لیتر بافر نمونه فسفات سدیم ۰/۱ مولار با  $\text{pH}=6$  اضافه و کاملاً مخلوط شد. مخلوط حاصل بلافاصله به میکروتیوب‌های دو میلی‌لیتری منتقل و توسط میکروسانتریفیوژ در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه در چهار درجه سلسیوس سانتریفیوژ شد. مایع رویی برای انجام آزمایش‌های جدا و تا قبل از انجام آزمایش در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Reuveni, 1995). از این عصاره استخراج شده جهت اندازه‌گیری فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و کاتالاز استفاده شد.

#### ارزیابی میزان فعالیت آنزیم کاتالاز (روش Gong et al., 1997)

فعالیت آنزیم کاتالاز بر اساس روش ارائه شده توسط گنگ و همکاران (Gong et al., 1997) به شرح زیر ارزیابی شد. مقداری از عصاره که دارای ۴۰ میکروگرم پروتئین باشد (این مقدار با استفاده از منحنی استاندارد

دنبال آن ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین به آن اضافه شد. پس از مختصری اختلاط، محلولی به رنگ سبز متمایل به زرد به دست آمد. سه دقیقه پس از افزودن معرف فولین، یک میلی لیتر محلول کربنات سدیم اشباع به آن اضافه و حجم نهایی آن با افزودن آب مقطر به ۱۰ میلی لیتر رسانده شد. پس از اختلاط رنگ خاکستری تیره به دست آمد. پس از یک ساعت میزان جذب نور در  $\lambda_{max}=725$  nm اندازه گیری شد. برای هر کدام از غلظت‌های مختلف اسید کافئیک، به طور جداگانه این مراحل انجام شد. برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. برای صفر کردن دستگاه اسپکتروفتومتر، از محلولی که فاقد اسید کافئیک بود و به همان میزان آب مقطر اضافه شده بود، استفاده شد. به منظور تهیه فنل کل، عصاره به دست آمده در آزمایش‌ها، همانند روش تهیه منحنی استاندارد عمل شد. با این تفاوت که از ۰/۵ میلی لیتر از عصاره استخراج شده از گیاه استفاده شد (Gholamnezhad et al., 2016c).

### بررسی میزان بیان بعضی از ژن‌های دفاعی در سطح نسخه برداری

در این قسمت، بررسی بیان ژن دو آنزیمی که میزان فعالیت آن‌ها اندازه گیری شده بود، انجام شد. میوه‌های پرتقال مانند بند ۲-۵ (فقط از عصاره سیر استفاده شد) تیمار شدند، و نمونه برداری در روزهای سه، شش، نه و دوازده روز بعد از آلودگی صورت گرفت. بعد از نمونه برداری، پوست میوه از قسمت گوشت جداسازی و بلافاصله قسمت گوشت تا زمان استفاده در نیتروژن مایع قرار داده و سپس به فریزر ۸۰- منتقل شد.

برای استخراج RNA کل، نمونه‌ها از فریزر خارج شده و بلافاصله در داخل ظرف حاوی نیتروژن مایع قرار گرفت و سپس در داخل هاون و نیتروژن مایع به خوبی کوبیده شدند. استخراج RNA توسط کیت RNXplus (سیناژن، ایران) و بر اساس دستورالعمل شرکت انجام پذیرفت.

طوری که حجم نهایی دو میلی لیتر باشد در یک لوله آزمایش کوچک کاملاً مخلوط شد و این مخلوط توسط ورتکس به مدت دو دقیقه هوادهی و سپس دستگاه اسپکتروفتومتر با استفاده از این مخلوط صفر گردید. سپس بلافاصله به مخلوط واکنش، ۴۰ میکرولیتر محلول پیروکتکول ۱۰۰ میلی مولار افزوده و پس از مخلوط نمودن، بلافاصله تغییرات جذب نور در طول موج ۴۲۰ نانومتر به مدت یک دقیقه با فاصله ۱۰ ثانیه اندازه گیری شد. فعالیت آنزیم بر اساس تغییرات جذب نور در دقیقه بر میلی گرم پروتئین محاسبه شد (  $\Delta OD / Min./mg.$  ) (Shi et al., 2001) (protein).

### ارزیابی میزان فنل کل (Total phenol) استخراج فنل از میوه سیب

در ابتدا مقدار یک گرم از بافت میوه پرتقال در هاون چینی که در ظرف دیگری دارای یخ قرار داده شده، در ۱۰ میلی لیتر متانول ۸۰ درصد، کاملاً له و عصاره گیری شد. مخلوط حاصل از پارچه مملول دولایه عبور داده شد و باقیمانده بافت له شده داخل هاون و بافت چسبیده به پارچه مملول دو بار و هر بار بوسیله سه میلی لیتر متانول ۸۰ درصد شستشو و صاف گردید و به عصاره اول اضافه شد. نهایتاً عصاره حاصل در ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. بخش رویی داخل لوله‌ها (Supernatant) حاوی ترکیبات فنلی است که از رسوب بافتی جدا شده و جهت آزمایشات بعدی در لوله‌های درب دار ۱۰ میلی لیتری در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد ( Etebarian et al., 2005).

### تهیه محلول پایه غلظت‌های فنل استاندارد

منحنی استاندارد فنل با استفاده از غلظت‌های مختلف اسید کافئیک تهیه شد (Etebarian et al., 2005). در لوله آزمایش ۱۰ میلی لیتری، هفت میلی لیتر آب مقطر ریخته شد. سپس مقدار ۰/۵ میلی لیتر از غلظت‌های مختلف آماده شده اسید کافئیک در مرحله قبل، به آن اضافه و به

شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰ درصد است و از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  به منظور بررسی تغییر بیان ژن استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001).

میزان بیان ژن‌های دفاعی منتخب بر اساس ژن  $EF1\alpha$  (ژن خانه دار) با بیان ثابت نرمال شده و سپس میزان تغییرات بیان ژن در همه تیمارها نسبت به شاهد سنجیده شد. میانگین مربوط به هر ژن در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار (دو تکرار زیستی و دو تکرار روشی) تجزیه واریانس شد. نتایج به دست آمده از Real time RT-PCR با استفاده از آزمون چند دامنه دانکن در سطح خطای ۰/۰۵ و با استفاده از نرم‌افزار SAS انجام گرفت. داده‌ها بر اساس آزمون Skewness و Kurtosis نرمال بودند.

## نتایج

### شناسایی قارچ عامل بیماری

طبق کلید قارچ‌های ناقص Barnett and Hunter (1998) هر دو جدایه‌ی قارچ استفاده شده در آزمایشات از جنس *Penicillium* شناسایی شدند. با استفاده از کلید Pitt and Hocking (1977) and مبتنی بر خصوصیات ریخت‌شناسی شامل شکل، رنگ، خصوصیات پرگنه روی محیط MEA، CYA، G25N و CSN، Pitt and Hocking (1997) این بیمارگر *P. digitatum* تشخیص داده شد.

### تأثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش دیسک کاغذی

نتایج جدول ۲ نشان می‌دهد که به احتمال ۹۹ درصد بین دو عصاره مورد بررسی، در هر دو روش استفاده از عصاره‌های آبی و متانولی، و غلظت‌های مختلف آن‌ها و همچنین بین اثرات متقابل این دو بر کاهش میزان رشد هاله قارچ، به روش آزمون دیسک اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در این آزمون، عصاره آبی سیر با غلظت ۶۰ میلی‌گرم

### ساخت cDNA توسط آنزیم رونویسی معکوس

ساخت رشته cDNA از روی mRNAهای کل سلول با استفاده از آغازگر 18 (dt)-Oligo تعیبه شده در کیت RevertAid Reverse Transcriptase (شرکت Thermo Scientific، آلمان) و بر اساس دستورالعمل ارائه شده در کیت انجام شد.

به منظور اطمینان از عدم آلودگی RNA به DNA ژنومی، قبل از ساخت cDNA با استفاده از آغازگرهای اختصاصی واکنش PCR با این RNA انجام شد و در مورد هیچ یک از RNAهای استخراجی، بانندی در واکنش PCR آن‌ها مشاهده نشد.

### بررسی الگوی بیان ژن‌های منتخب با روش Real time-PCR

الگوی بیان سه ژن شامل ژن‌های رمز کننده کاتالاز (CAT)، پراکسیداز (POX) و فنیل آلانین آمونیلایز (PAL) در سطح نسخه برداری با استفاده از آغازگرهای مناسب (جدول ۱) و روش PCR کمی از نوع کمیت‌سنجی نسبی بررسی شدند. ژن  $EF1\alpha$  به عنوان ژن خانه دار انتخاب شد. تکثیر cDNA و واکنش کمی PCR از نوع کمیت‌سنجی نسبی، بر طبق دستورالعمل کیت YTA SYBR Green qPCR Master Mix (2x) (یکتاتجهیز آزما، ایران) و با استفاده از ترموسایکلر ویژه PCR کمی (Corbett RG-6000) انجام گرفت. برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن‌ها در طی نقاط زمانی از روش Livak استفاده شد. در این روش فرض بر این است که بازده نمونه و کنترل داخلی برابر و ۱۰۰٪ است و از فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  به منظور بررسی تغییر بیان ژن استفاده شد (Livak and Schmittgen, 2001). بلافاصله بعد از انجام واکنش Real time PCR، محصول واکنش روی ژل ران شد و از کارکرد اختصاصی واکنش اطمینان حاصل شد (شکل ۱).

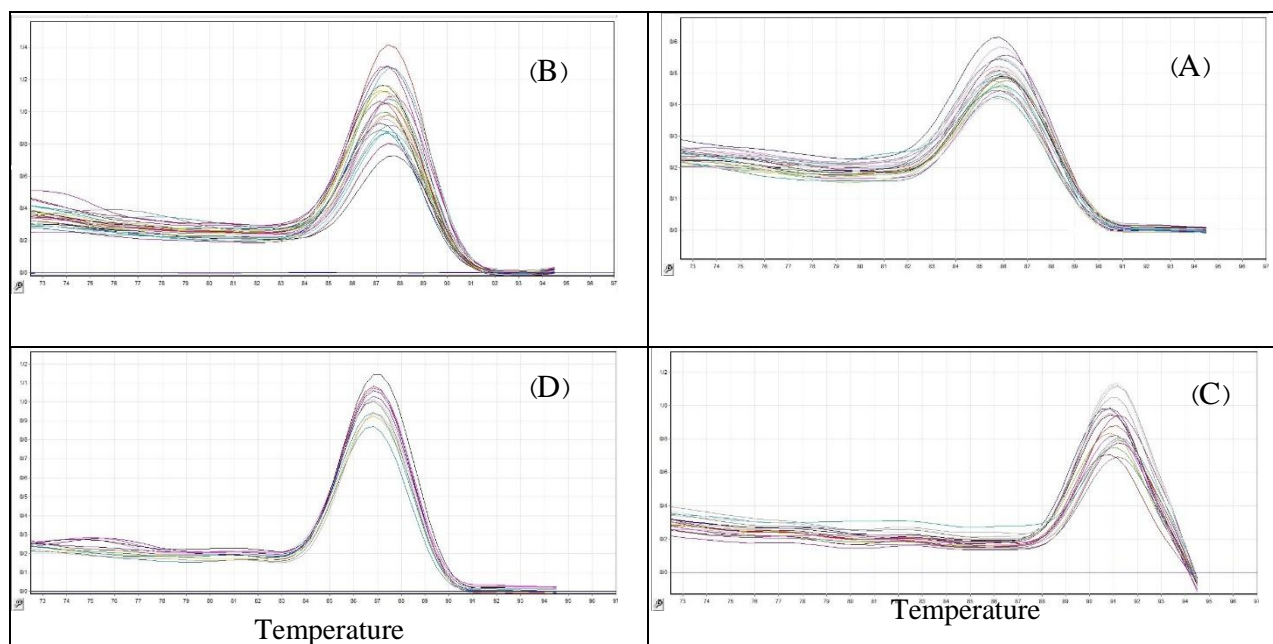
الگوی بیان ژن‌ها با استفاده از دستگاه ترموسایکلر زمان واقعی (Corbett RG-6000) بررسی شد. برای تعیین میزان تغییرات بیان ژن‌ها در طی نقاط زمانی از روش Livak استفاده



جدول ۱- آغازگرهای مورد استفاده در آزمایش Real time PCR

Table 1. Primers used in the Real Time PCR assay

Name of genes	Primers sequences
Catalase	TTGAACACGAACGTCGACACCT CTTGTACAGGAACGACAGCATC
Peroxidase	GATCTTCGTGCTCGTGTTCA TGCGAATGTTTTGCTGTCTC
Phenylalanine ammonia-lyase	TGGCCACCAAAATGGTTCGT ATGGCTTCTTACTGCTCTG
EF1 $\alpha$	GGTCAGACTCGTGAGCATGC CGTACCTAGCCTTTGAGTACTTG



شکل ۱- منحنی‌های ذوب قطعات تکثیری (Dissociation curves) ژن‌های پراکسیداز (الف)، EF1 $\alpha$  (ب)، کاتالاز (ج) و فنیل-آلانین آمونیا لیز (د)

Figure 1. Melting curves of Peroxidase (a), EF1 $\alpha$  (b), Catalase (c) and Phenylalanine ammonia-lyase (d)

جدول ۲- تجزیه واریانس مربوط به آزمون تأثیر عصاره‌های آبی و الکلی گیاهی بر میزان رشد قارچ بیمارگر *P. digitatum* به روش استفاده از دیسک کاغذی

Tables 2. Analysis of variance related to the effect of aqueous and methanolic plant extracts on the growth of *P. digitatum* pathogen with paper disk method

S.O.V	df	MS		F	
		Aqueous ex.	Methanolic ex.	Aqueous ex.	Methanolic ex.
Treatments(A)	1	826	221.1	453.14**	224.45**
Concentration(B)	4	350.10	421.63	736.65**	670.32**
A×B	4	3.85	31.63	32.65**	32.09**
Error	30	3.63	52.25		
Total	39				

\*\* There is a significant difference of 99 percent ( $P \leq 0.01$ )

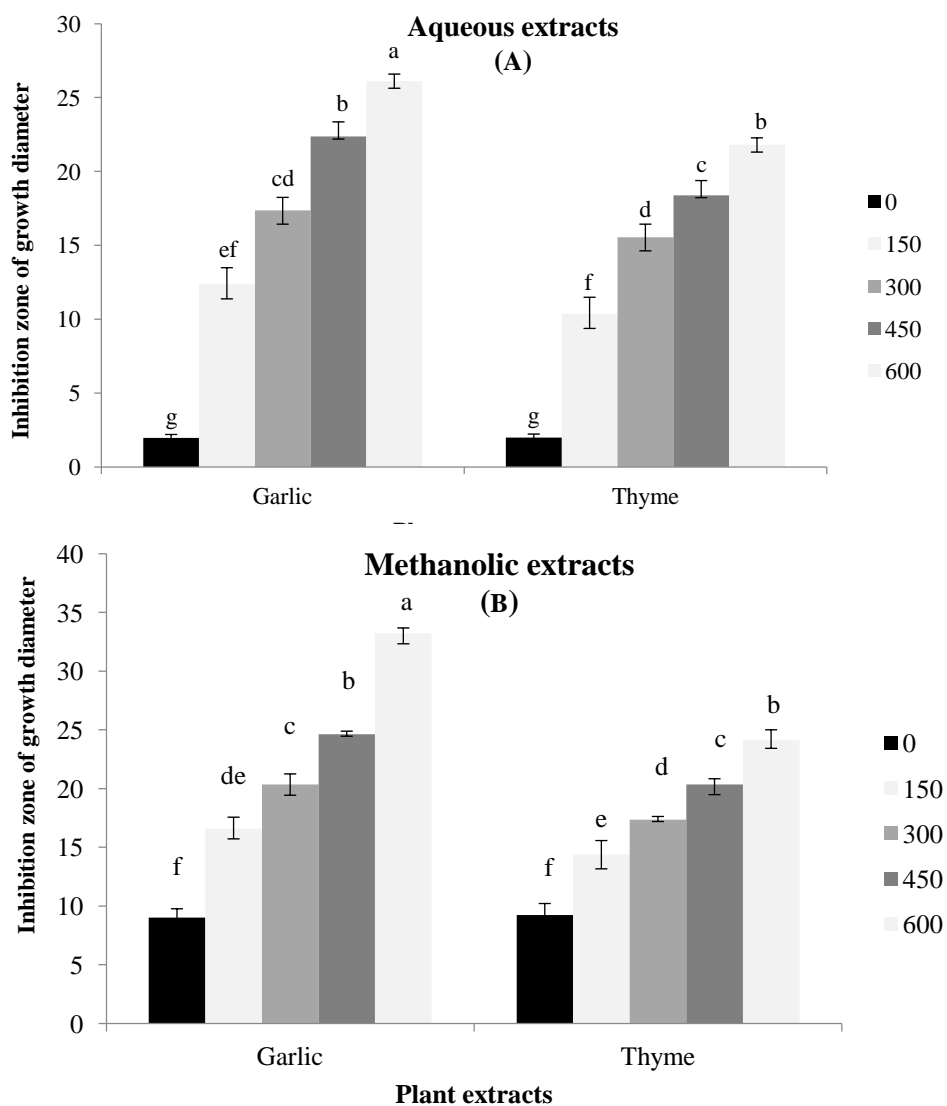
CV=6.21% for aqueous extracts and CV=6.13% for methanolic extract

کاهش میزان رشد قارچ اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در این آزمون، عصاره آبی سیر و آویشن شیرازی با غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۷۵/۲۵ و ۶۷/۱۲ درصد ممانعت از قارچ بیمارگر نسبت به شاهد به ترتیب بهترین عصاره‌ها بودند (شکل ۱). کمترین درصد ممانعت از رشد بیمارگر نسبت به شاهد، مربوط به غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر مرزه بود که میزان ۲۴/۳۶ درصد ممانعت از رشد نسبت به شاهد نشان داد. نتایج حاصل از عصاره‌های الکلی، دقیقاً مانند عصاره‌های آبی بود. عصاره‌های الکلی سیر با غلظت‌های ۶۰۰ و ۴۵۰ میلی‌گرم در لیتر و با ۷۵/۲۵ و ۶۸/۱۰ درصد و عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر و ۶۷/۱۲ درصد ممانعت از قارچ بیمارگر نسبت به شاهد به ترتیب بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین درصد ممانعت از رشد قارچ بیمارگر نسبت به شاهد، مربوط به غلظت ۱۵۰ میلی‌گرم در لیتر آویشن شیرازی بود که میزان آن ۳۴/۱۲ درصد ممانعت از رشد نسبت به شاهد بود (شکل ۳ و ۴ الف و ب).

در میلی‌لیتر، و ۲۶/۱۲ میلی‌متر قطر ممانعت از قارچ و عصاره آویشن شیرازی با غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، و ۲۱/۸۰ میلی‌متر قطر ممانعت از قارچ بیمارگر، بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین ممانعت‌کنندگی مربوط به شاهد، و در بین تیمار عصاره‌ها مربوط به غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آویشن شیرازی آبی بود که میزان آن به ترتیب ۱/۹۸ و ۱۰/۳۵ میلی‌متر قطر ممانعت از رشد قارچ بود. عصاره‌های الکلی سیر و آویشن شیرازی با غلظت ۶۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ترتیب با نشان دادن ۳۳/۲ و ۲۴/۱۲ میلی‌متر قطر ممانعت از قارچ بیمارگر، به ترتیب بهترین عصاره‌ها بودند. کمترین ممانعت‌کنندگی مربوط به غلظت ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، آویشن شیرازی بود که میزان آن به ترتیب ۹/۰۳ و ۱۴/۳۹ میلی‌متر قطر ممانعت از قارچ بود (شکل ۲ الف و ب).

### تأثیر عصاره‌های گیاهی بر رشد قارچ بیمارگر با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت

نتایج جدول تجزیه واریانس ۳ نشان می‌دهد که به احتمال ۹۹ درصد بین دو عصاره مورد بررسی، در هر دو روش استفاده از عصاره‌های آبی و متانولی، و غلظت‌های مختلف آن‌ها و همچنین بین اثرات متقابل این دو بر



شکل ۲ - تأثیر عصاره‌های آبی (شکل A) و متانولی (شکل B) آویشن شیرازی بر میزان ممانعت از رشد میسلیومی قارچ بیماری‌گر *P. digitatum* به صورت قطر ناحیه بازدارندگی (میلی‌متر) در روش استفاده از دیسک کاغذی. اعداد میانگین چهار تکرار است. عصاره‌های مختلف در غلظت‌های ۰، ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در ده میلی‌لیتر استفاده شدند

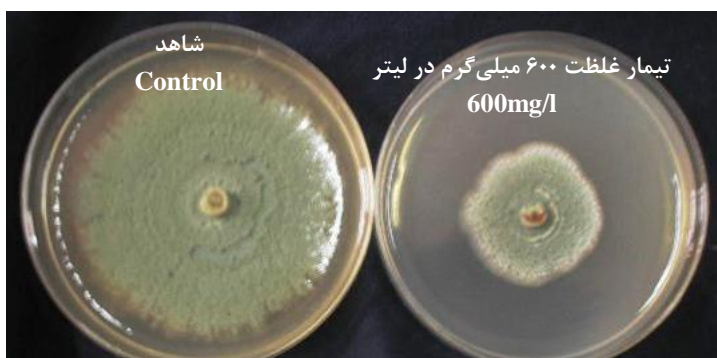
Figure 2. Effect of aqueous (A) and methanolic (B) extracts of thyme on the inhibition of mycelial growth of *P. digitatum* (diameter of the inhibitory zone mm) in the paper disc method. The numbers are four repetitions. Different extracts were used in concentrations of 0, 150, 300, 450 and 600 milligrams in per 10 milliliters

جدول ۳- تجزیه واریانس مربوط به آزمون تأثیر عصاره‌های آبی و الکلی گیاهی بر میزان رشد قارچ بیماری‌گر *P. digitatum* به روش استفاده از اختلاط با محیط کشت

Tables 3. Analysis of variance related to the effect of aqueous and methanolic plant extracts on the growth of *P. digitatum* pathogen with mixing with culture medium method

S.O.V	df	MS		F	
		Aqueous ex.	Methanolic ex.	Aqueous ex.	Methanolic ex.
Treatments(A)	1	985	235.84	520.17**	254.41**
Concentration(B)	4	421.52	635.21	945.65**	836.32**
A×B	4	2.56	28.42	47.15**	31.29**
Error	30	34.36	43.25		
Total	39				

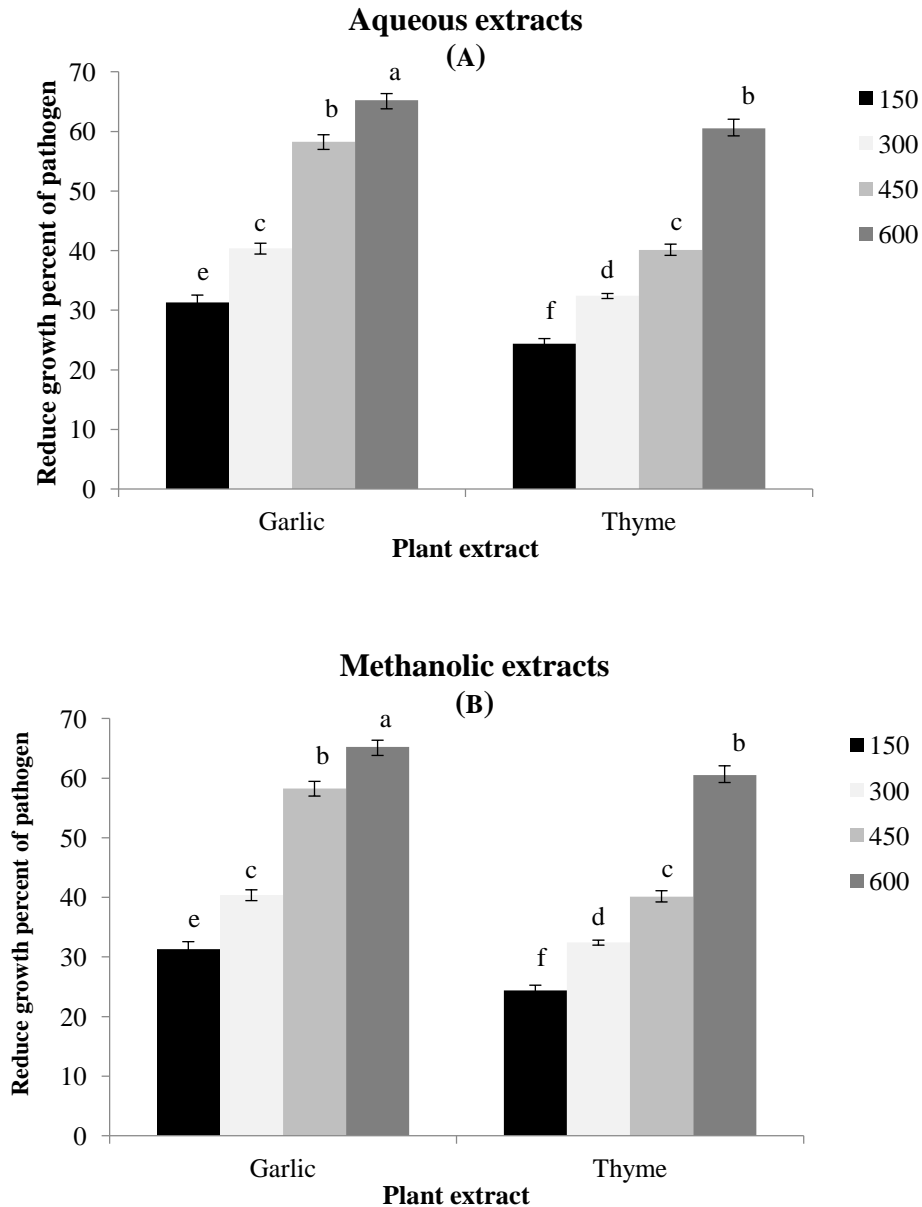
\*\* There is a significant difference of 99 percent ( $P \leq 0.01$ )  
CV=6.25% for aqueous extracts and CV=8.55% for methanolic extract



شکل ۳- تأثیر عصاره‌های آبی سیر (غلظت ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بر

کاهش رشد میسلیومی قارچ بیماری‌گر *P. digitatum* در مقایسه با شاهد

Figure 3. Effect of Garlic Aqueous Extract (600 mg / L) on the mycelial growth of the *P. digitatum* pathogen in comparison with the control



شکل ۴- تأثیر عصاره‌های آبی (شکل الف) و متانولی (شکل ب) بر کاهش رشد میسلیومی *P. digitatum* (درصد بازدارندگی) در روش اختلاط با محیط کشت؛ اعداد میانگین چهار تکرار است. عصاره‌های مختلف در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰، ۴۵۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم در لیتر استفاده شدند

**Figure 4.** Effect of aqueous (A) and methanolic (B) extracts on of thyme on the inhibition of mycelial growth of *P. digitatum* (diameter of the inhibitory zone mm) in the culture medium method. The numbers are four repetitions. Different extracts were used in concentrations of 150, 300, 450 and 600 milligrams in per 10 liter

بعد از شاهد مربوط به تیمار یک در ۱۰۰۰ عصاره آبی آویشن شیرازی به میزان ۲۸/۴۴ سانتی‌متر مربع در انبار بود. در مورد عصاره‌های الکلی، روند تقریباً مانند عصاره‌های آبی بود با این تفاوت که تیمار الکل تنها نیز، در مقایسه با تیمار آب مقطر تنها نیز باعث کاهش میزان سطح لکه‌ها شد. به طوری که میزان سطح لکه‌ها در تیمار الکل تنها ۲۷/۸۸ سانتی‌متر مربع بود. در صورتی که در تیمار شاهد (آب مقطر) ۳۳/۱۶ سانتی‌متر مربع بودند. سطح لکه‌های ایجاد شده در تیمار عصاره‌های الکلی و آویشن شیرازی با غلظت شش در ۱۰۰۰ به ترتیب ۳/۲۶ و ۴/۱۵ سانتی‌متر مربع، به عنوان بهترین عصاره‌ها، بودند (شکل ۵ الف و ب).

### بررسی اثر عصاره‌ها در کنترل بیماری کپک سبز پرتقال در انبار ۱۵ درجه سلسیوس

نتایج جدول تجزیه واریانس ۴ نشان می‌دهد که به احتمال ۹۹ درصد بین دو عصاره مورد بررسی، در هر دو روش استفاده از عصاره‌های آبی و متانولی، و غلظت‌های مختلف آن‌ها و همچنین بین اثرات متقابل این دو بر کاهش سطح لکه ایجاد شده بر روی پرتقال اختلاف معنی‌دار وجود داشت. در این آزمون، سطح لکه ایجاد شده در تیمار عصاره‌های آبی سیر و آویشن شیرازی (غلظت شش در هزار) به ترتیب با ۵/۳۰ و ۷/۴۴ سانتی‌متر مربع کمترین میزان خود را در مقایسه با سایر تیمارها و همچنین تیمار شاهد (با میزان ۳۳/۱۶ سانتی‌متر مربع) داشتند. بیشترین میزان سطح لکه

جدول ۴- تجزیه واریانس مربوط به آزمون تأثیر عصاره‌های آبی و الکلی (سیر و آویشن شیرازی) بر شدت بیماری (سطح لکه‌ها) ناشی از قارچ بیمارگر *P. digitatum* در انبار با دمای ۱۵ درجه سلسیوس

Tables 4. Analysis of variance related to the effect of aqueous and methanolic (Garlic and Thyme) plant extracts on the disease severity (spot area) in the storage with 15 °C

S.O.V	df	MS		F	
		Aqueous ex.	Methanolic ex.	Aqueous ex.	Methanolic ex.
Treatments(A)	1	985	235.84	520.17**	254.41**
Concentration(B)	4	421.52	635.21	945.65**	836.32**
A×B	4	2.56	28.42	47.15**	31.29**
Error	30	34.36	43.25		
Total	39				

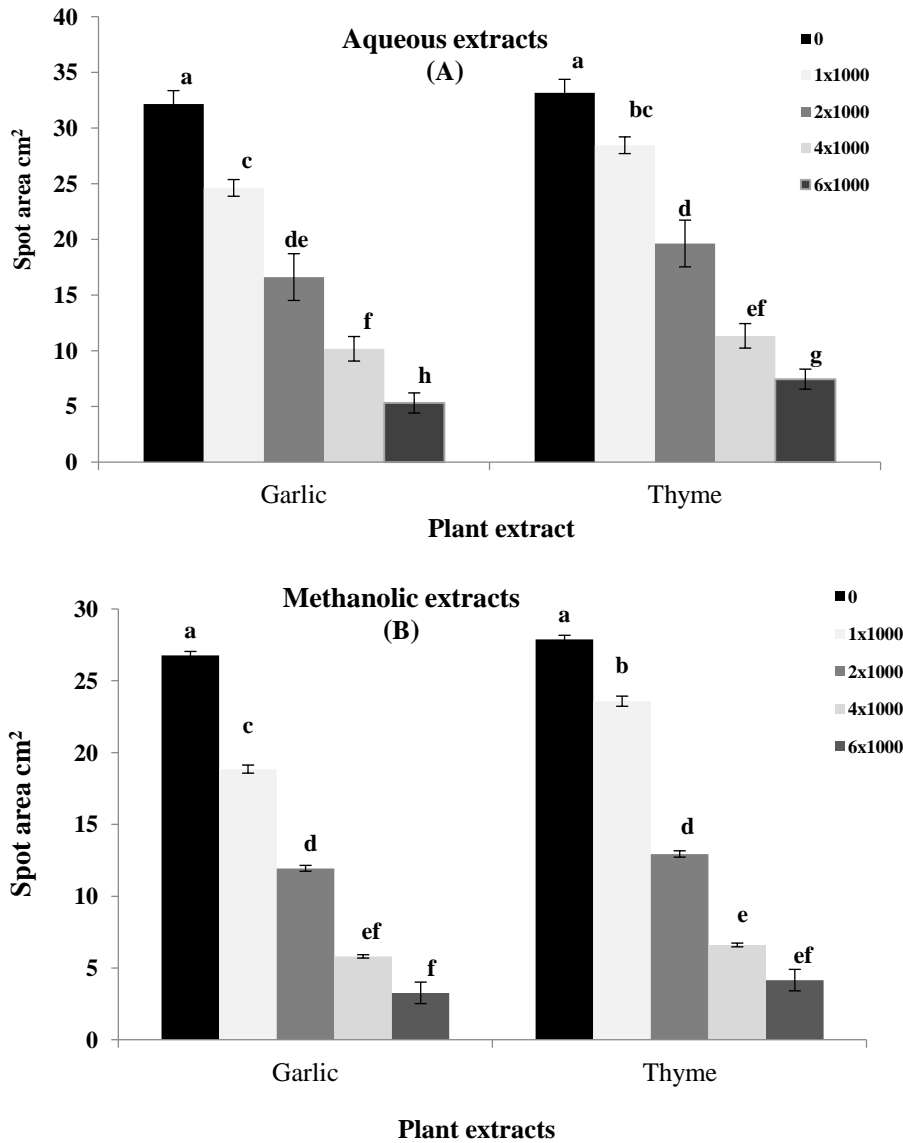
\*\* There is a significant difference of 99 percent ( $P \leq 0.01$ )

CV=8.25% for aqueous extracts and CV=9.69% for methanolic extract

پراکسیداز و پلی‌فنل اکسیداز در میوه پرتقال، بین روزهای نمونه برداری، غلظت‌های مختلف و اثر متقابل آنها با روزهای نمونه برداری تفاوت معنی‌دار ( $P \leq 0.01$ ) وجود داشت.

### بررسی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل-اکسیداز در سیب‌های تیمار شده در دمای ۱۵ درجه سلسیوس

جدول تجزیه واریانس ۵ نشان می‌دهد که در آزمون تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی روی فعالیت آنزیم



شکل ۵- تأثیر عصاره‌های آبی (شکل الف) و متانولی (شکل ب) بر کاهش شدت بیماری ناشی از *P. digitatum* (مساحت ناحیه آلودگی به سانتی‌مترمربع) در انبار. اعداد میانگین چهار تکرار است. عصاره‌ها در غلظت‌های ۰، ۱، ۲، ۴ و ۶ گرم در یک لیتر آب مقطر استفاده شدند

Figure 5. Effect of aqueous extracts (A) and methanol (B) on reducing the severity of disease caused with *P. digitatum* (area of infection area) in the storage. The data are average of four repetitions. The extracts were used in 0, 1, 2, 4 and 6 grams per liter of distilled water

جدول ۵- تجزیه واریانس مربوط به میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز و پلی‌فنل-اکسیداز (تغییرات جذب در دقیقه در میلی گرم پروتئین) در میوه پرتقال، مایه کوبی شده با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه و قارچ عامل بیماری *P. digitatum*

Tables 5. Analysis of variance related peroxidase and polyphenol oxidase (Changes in absorbance per minute in mg of protein) in the orange incubated with different concentrations of plant extracts and *P. digitatum*

S.O.V	df	MS	
		POX	PPO
Concentration (A)	5	0.672**	0.307**
Days (B)	4	0.165**	0.097**
A×B	20	0.027**	0.020**
Error	48	0.009	0.006
Total	77		

\*\* There is a significant difference of 99 percent ( $P \leq 0.01$ )  
 CV=9.40% for peroxidase and CV=8.29% for polyphenol oxidase

غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار وجود داشت. بیشترین میزان فعالیت این آنزیم در بین روزهای نمونه‌برداری مربوط به تیمار غلظت ۶ در هزار و روز نهم نمونه برداری بود. میزان فعالیت این آنزیم در روزهای نمونه‌برداری در میوه‌هایی که فقط با عامل بیمارگر تیمار شده بودند نشان داد که این عامل بدون حضور عصاره نیز قادر به بالا بردن میزان فعالیت آنزیم‌ها بود و در تمام روزهای نمونه برداری میزان فعالیت آن بیشتر از سایر تیمارها بود (شکل ۶-ب).

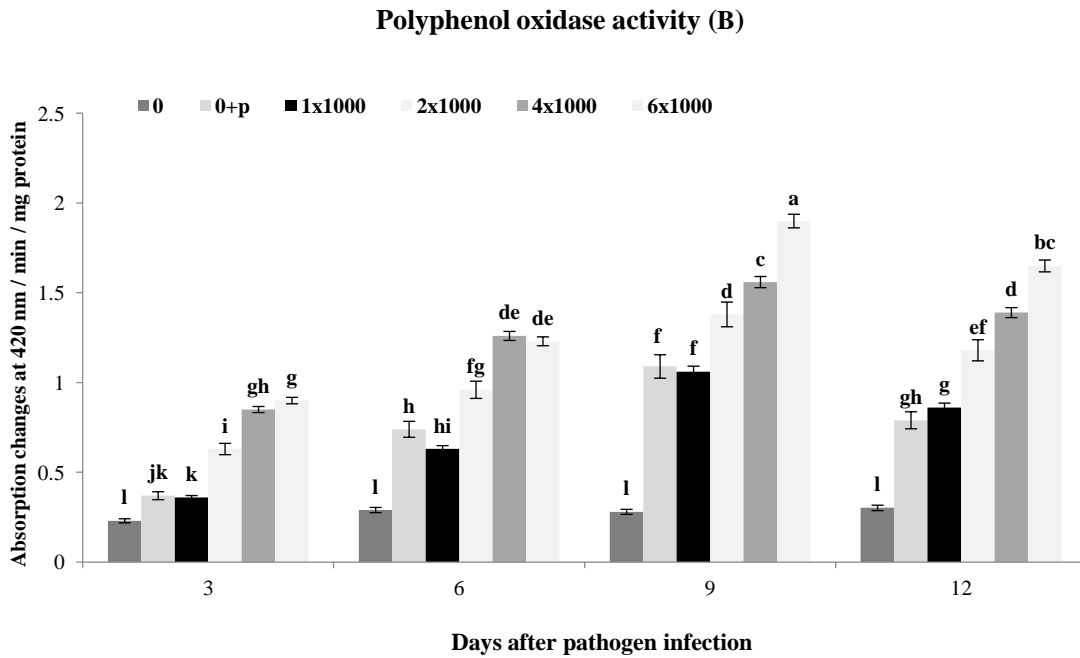
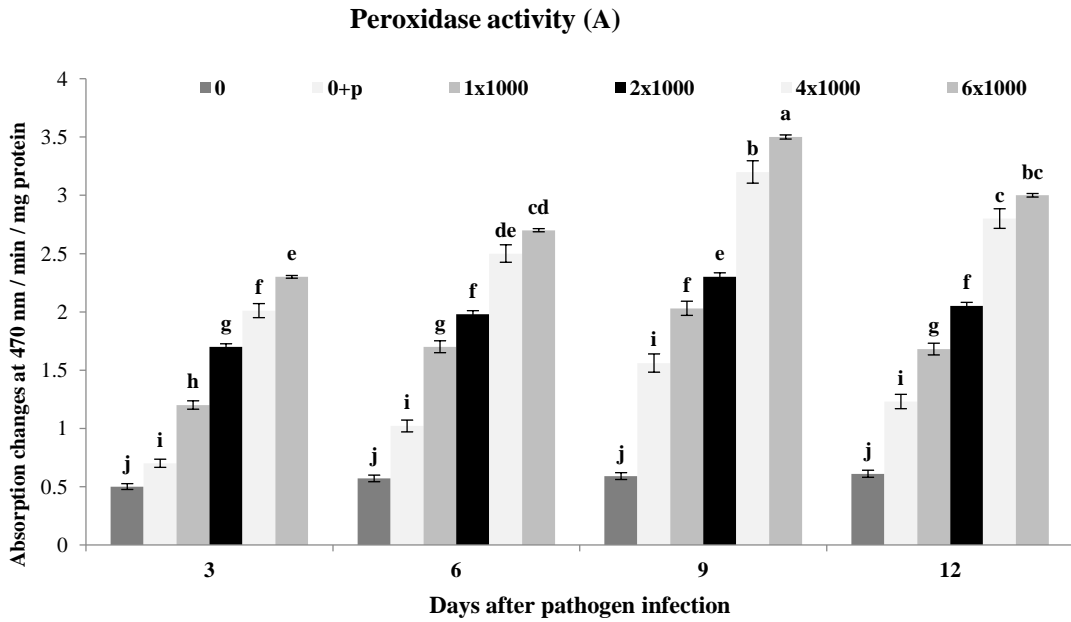
#### بررسی میزان تغییرات فنل کل در میوه پرتقال مایه‌زنی شده با غلظت‌های مختلف عصاره گیاهی و قارچ عامل بیماری در دمای ۱۵ درجه سلسیوس

جدول تجزیه واریانس ۶ در مورد غلظت‌های متفاوت عصاره گیاه بر روی میزان فنل کل در میوه پرتقال نشان می‌دهد، بین غلظت‌ها و بین روزهای نمونه‌برداری و همچنین اثرات متقابل آن‌ها از نظر میزان فنل کل تفاوت معنی‌دار ( $P \leq 0.01$ ) وجود داشت. در بین روزهایی که نمونه برداری صورت گرفت در مورد تقریباً همه غلظت‌ها، حداکثر میزان فنل کل در میوه‌های آلوده تیمار شده با عصاره در روز نهم مشاهده شد.

همانطور که شکل ۶ (الف) نشان می‌دهد در روز سوم میوه‌های پرتقال آلوده تیمار شده با غلظت‌های مختلف عصاره، از نظر میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز در مقایسه با میوه‌های آلوده و سالم شاهد، افزایش معنی‌داری نشان دادند و این روند تا نهمین روز نمونه‌برداری ادامه داشت. و پرتقال‌های آلوده تیمار شده با غلظت شش در هزار در دوازده روز مورد بررسی، بیشترین فعالیت پراکسیدازی را نشان دادند. در دوازدهمین روز بعد از مایه‌زنی بیمارگر، تیمار پرتقال آلوده تیمار شده با غلظت شش در هزار عصاره، بیشترین فعالیت آنزیم را نشان داد و این اختلاف نسبت به بقیه تیمارها به جز تیمار چهار در هزار در این روز معنی‌دار بود. بر اساس شکل ۳-الف، روند کلی آنزیم تا نهمین روز بعد از نمونه‌برداری افزایشی بود و سپس کاهش شد (شکل ۶ الف).

بر اساس شکل ۶ (ب)، بیشترین فعالیت آنزیم پلی‌فنل-اکسیداز مربوط به پرتقال‌های آلوده تیمار شده با غلظت ۶ در هزار عصاره بوده که در نهمین روز بعد از آلوده‌سازی با بیمارگر این میزان فعالیت مشاهده شد. در روز دوازدهم بعد از آلوده سازی با قارچ بیمارگر نیز بین این غلظت و بقیه





شکل ۶- میزان فعالیت آنزیم پراکسیداز (الف) ( بر حسب تغییرات جذب نور در ۴۷۰ نانومتر / دقیقه / میلی گرم پروتئین) و آنزیم پلی فنل اکسیداز (ب) (بر حسب تغییرات جذب نور در ۴۲۰ نانومتر / دقیقه / میلی گرم پروتئین) هر عدد میانگین چهار تکرار است. میانگین هایی که در هر ستون از نظر آماری با یکدیگر اختلاف دارند با حروف مختلف مشخص شده اند. تفاوت ها با آزمون دانکن ( $P \leq 0.05$ ) ارائه شده اند

Figure 6. Peroxidase enzyme activity (A) (changes in light absorption at 470 nm / min / mg protein) and polyphenol oxidase (B) activity (changes in light absorption at 420 nm / min / mg protein) each four It is repeated. The averages that are statistically different in each column are marked with different letters. Differences are presented with Duncan's test ( $P \leq 0.05$ )

جدول ۶- تجزیه واریانس مربوط به محتوای کل ترکیبات فنل در میوه پرتقال در میوه پرتقال، مایه کوبی شده با غلظت‌های مختلف عصاره گیاه و قارچ عامل بیماری *P. digitatum*

Tables 6. Analysis of variance related total phenolic compounds content in the orange incubated with different concentrations of plant extracts and *P. digitatum*

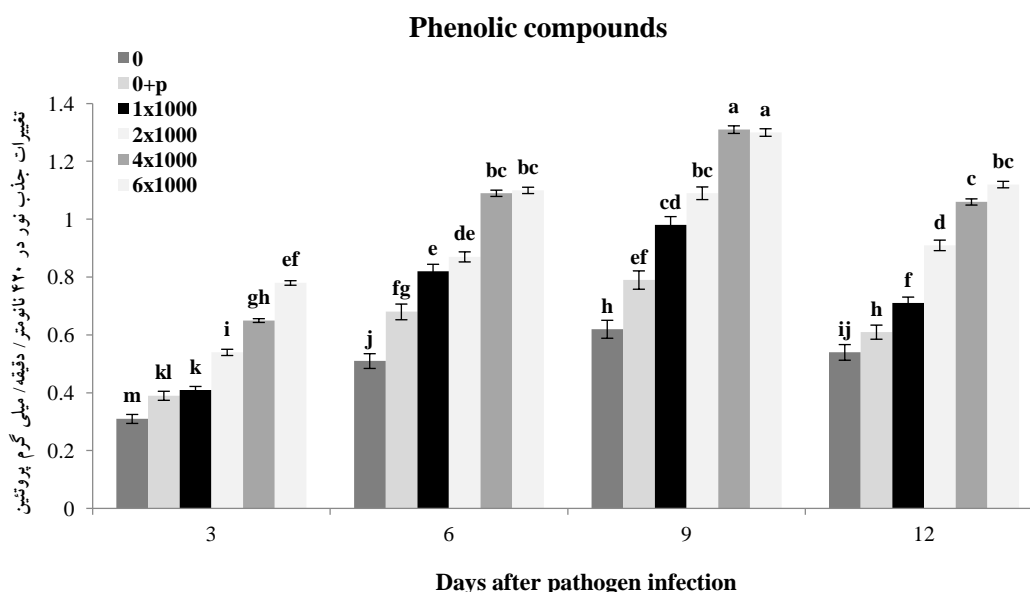
S.O.V	df	SS	MS
Concentration (A)	5	0.288	0.057**
Days (B)	4	0.196	0.065**
A×B	20	0.087	0.058 <sup>ns</sup>
Error	48	0.510	0.006
Total	77	1.08	

\*\* There is a significant difference of 99 percent ( $P \leq 0.01$ )

CV=12.86%

میزان ترکیبات فنلی در تیمار غلظت شش در هزار عصاره دیده شد. بعد از روز نهم، غلظت ترکیبات فنلی روزبه کاهش گذاشت و در روز دوازدهم مقدار این ترکیبات در اکثر تیمارها و غلظت‌ها کمتر از روز نهم بود (شکل ۷).

در روز سوم، بین همه تیمارها، به جز دو تیمار غلظت ۱ در هزار عصاره و تیمار قارچ بیمارگر تنها، اختلاف معنی دار وجود داشت. در روز نهم پس از نمونه برداری، افزایش میزان ترکیبات فنلی در همه تیمارها مشاهده شد و بیشترین



شکل ۷- تأثیر قارچ عامل بیماری و غلظت‌های متفاوت عصاره گیاه سیر بر روی محتوای کل ترکیبات فنل در میوه پرتقال. اعداد، میانگین چهار تکرار بوده و حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار تیمارها در سطح یک درصد است

Figure 7. Effect of pathogen and different concentrations of garlic extract on the total content of phenolic compounds in orange fruit. The data are four repetitions, and the different letters represent a significant difference in treatments at one percent level

ژن در بین همه تیمارهای غلظت‌ها بود. بعد از روز نهم میزان بیان نسخه‌برداری ژن کاهش پیدا کرد و این مقدار در همه تیمارها در روز دوازدهم کمتر از میزان روز نهم بود (۱۲/۳۶ در غلظت  $6 \times 1000$ )، اما نسبت به روز ششم بیشتر بود (۱۱/۹۶ در غلظت  $6 \times 1000$ ) (شکل ۸-ب).

روند نسخه‌برداری ژن رمز کننده آنزیم فنیل آلانین آمونیا لیاز (PAL) در طول ۱۲ ساعت مانند میزان نسخه‌برداری دو ژن قبلی بود. در مورد بیان این ژن، در همه غلظت‌ها تا روز نهم شاهد میزان افزایش نسخه‌برداری بودیم و سپس روز دوازدهم کاهش پیدا کرد. غلظت  $6 \times 1000$  عصاره بیشترین میزان نسخه‌برداری ژن رمز کننده این آنزیم را نه روز بعد از نمونه برداری در پی داشت (۱۲/۳۶ برابر تیمار آب مقطر) و این مقدار بیشترین میزان نسخه‌برداری نسبی ژن در بین همه تیمارهای غلظت‌های متفاوت عصاره گیاه بود. در مورد تیمار بیمارگر تنها نیز روند مشابه بقیه تیمارها بود و در مقایسه با تیمار غلظت  $1 \times 1000$  در روز ابتدایی نمونه برداری یعنی روزهای سوم و ششم بعد از نمونه برداری میزان بیان این ژن بیشتر بود ولی در روزهای نهم و دوازدهم بعد از نمونه برداری، میزان نسخه‌برداری ژن در تیمار  $1 \times 1000$  بیشتر از تیمار بیمارگر تنها بود (شکل ۸-ج).

## بررسی تأثیر عصاره‌های گیاهی بر میزان بیان ژن‌های دفاعی

با ارزیابی منحنی‌های ذوب قطعات تکثیر (شکل ۱) و مشاهده تنها یک پیک برای هر ژن، از اختصاصی بودن تولیدات سنجش شده در آزمون کمی اطمینان حاصل شد. نسخه‌برداری ژن رمز کننده آنزیم پلی فنل اکسیداز (PPO) در طول ۱۲ روز نمونه برداری در تمام تیمارها (بیمارگر تنها P و غلظت‌های مختلف از عصاره) روند مشابهی را داشت و تا روز نهم در تمام تیمارها افزایش و سپس روند کاهش در پیش گرفت. بیشترین میزان نسخه‌برداری ژن در بین تیمارها مربوط به تیمار  $6 \times 1000$  عصاره بود ( $11/80$  برابر تیمار شاهد) و مانند همه تیمارها در روز نهم میزان نسخه‌برداری در آن به اوج خود رسید. افزایش نسخه‌برداری این ژن با افزایش غلظت عصاره، نشان دهنده تأثیر مستقیم عصاره بر روی میزان بیان این ژن در سطح نسخه‌برداری می‌باشد. (شکل ۸-الف و جدول ۷).

نسخه‌برداری ژن رمز کننده آنزیم پراکسیداز (POX) در طول ۱۲ ساعت در تمام تیمارها (بیمارگر تنها P و غلظت‌های مختلف از عصاره) روند مشابهی داشت. غلظت  $6 \times 1000$  عصاره بیشترین میزان نسخه‌برداری این آنزیم را نه روز بعد از نمونه برداری در پی داشت (۱۵/۲۴ برابر تیمار آب مقطر) و این مقدار بیشترین میزان نسخه‌برداری نسبی

جدول ۷- تجزیه واریانس مربوط میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد بررسی در گیر در میوه پرتقال

، تحت تیمارهای مختلف عصاره گیاه و قارچ عامل بیماری *P. digitatum*

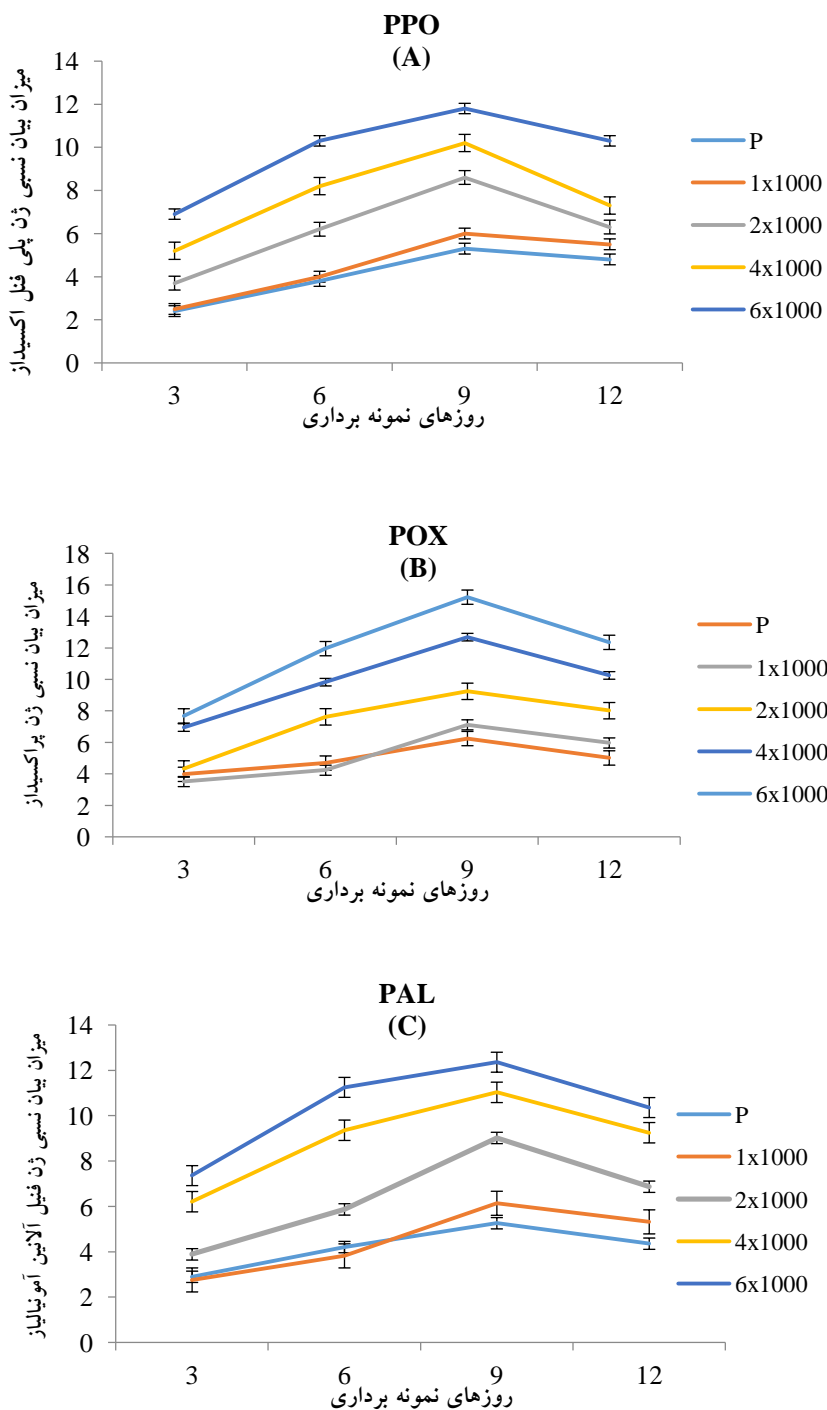
**Table 7. Analysis of variance related to changes in the genes expression involved in orange fruit under different treatments of plant extract and *P. digitatum***

S.O.V	df	SS	MS
Concentration (A)	4	9.5	2.37**
Days (B)	3	6.65	2.21**
A×B	12	1.15	0.095 <sup>ns</sup>
Error	22	15.56	0.69
Total	41	1.08	

\*\* There is a significant difference of 99 percent ( $P \leq 0.01$ )

<sup>ns</sup> There is a significant difference

CV=8.30%



شکل ۸. تأثیر عصاره سیر و بیمارگر بر روی بیان ژن آنزیم‌های الف: پلی فنیل اکسیداز (PPO) ب: پراکسیداز (POX) و فنیل

آلانین آمونیا لیا ز (PAL) در میوه پرتقال. P: بیمارگر. داده‌ها میانگین چهار تکرار هستند

Figure 8. Effect of Garlic and Patient Extract on gene expression of enzymes A: Polyphenol Oxidase (PPO) B: Peroxidase (POX) and Phenylalanine ammonilase (PAL) in orange fruit. P: Pathogen. Data are average for four replications. Duncan test ( $P \leq 0.01$ )

## بحث

خاصیت تجزیه پذیری عصاره های گیاهی در طبیعت و سمیت پایین آن ها برای انسان و سایر پستانداران و همچنین اثرات مخرب کمتر آن ها بر محیط زیست، این ترکیبات را به عنوان ترکیبات جایگزین سموم شیمیایی مطرح کرده است. عصاره های گیاهی با داشتن مواد و عناصر غذایی در افزایش رشد گیاه مفید بوده و برای انسان و محیط زیست بی خطر هستند (Bakkali et al., 2008). در تحقیقات متعدد، اثرات ضدقارچی عصاره گیاهانی مانند سیر و آویشن شیرازی به اثبات رسیده است (Kamangar et al., 2014; Martinez et al., 2007). در تحقیقی اثرات بازدارندگی عصاره های هگزانی، کلروفرمی، دی اتیل اتری و اتانولی هفت گونه گیاهی علیه دو قارچ بیماری زای گیاهی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد فاز هگزانی عصاره های گیاه آویشن کوهی و بونه موثرترین عصاره ها بر علیه هر دو بیمارگر عمل بودند (Kamangar et al., 2014). اثرات ضدقارچی اسانس های زیره سیاه و آویشن با قارچکش های کربوکسین و تیابندازول روی قارچ بیماری زای *R. solani* مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که اثرات بازدارندگی آویشن نسبت به زیره سیاه و هر دو قارچ کش بیشتر بود (Khaleedi et al., 2015). اسانس سیر فعالیت ضد میکروبی خوبی روی *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* و *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* و *Candida albicans* داشت و باعث جلوگیری از رشد آن ها شد (Mnayer et al., 2014; Johnson et al., 2013). در آزمون های ضدقارچی این مطالعه، دیسک کاغذی و استفاده از عصاره ها در محیط کشت، با افزایش غلظت هر دو عصاره، میزان فعالیت ضدقارچی افزایش پیدا کرد. بیشترین میزان فعالیت قارچکشی مربوط به عصاره گیاه سیر بود. عصاره این گیاه همراه با گیاه آویشن شیرازی

تأثیر قارچکشی قابل قبولی علیه قارچ بیمارگر *P. digitatum* از خود نشان دادند. در مورد مقایسه دو روش استفاده از حلال آبی و الکلی، عصاره الکلی در مورد هر دو روش دیسک کاغذی و اختلاط با محیط کشت، اثر بازدارندگی بیشتری از خود نشان داد که این موضوع را می توان با تغییر در نوع حلال مرتبط دانست. زمانی که از عصاره الکلی استفاده می شود احتمالاً مواد ضدقارچی بیشتری از هر دو گیاه قابل استحصال خواهد بود. نتایج این مطالعه با نتایج مطالعه Khalil and Dababneh (2007) مطابقت داشت. در این مطالعه اثر دو گونه گیاهی آویشن شیرازی و سیر بر قارچ بیمارگر *P. digitatum* مشهود بود. بررسی ها نشان داده است که آویشن شیرازی یک منبع غنی از ترپنوئیدهای فنلی و کارواکروئول می باشد. کارواکروئول در گیاه آویشن موجب از بین رفتن غشا پلاسمایی، نشت دورن سلولی ATP و یون های پتاسیم و در نهایت از بین رفتن سلول بیمارگر می شود، بنابراین شاید بتوان فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره آویشن را به حضور این ترکیبات نسبت داد (Yaghoubi et al., 2015).

در مورد آزمون انباری، هر دو عصاره تأثیر معنی داری در کاهش این بیماری داشتند و همانطور که انتظار می رفت عصاره الکلی تأثیر بیشتری داشت. که این موضوع را می توان با اثر قارچکشی خود الکل که در اینجا به عنوان حلال به کار رفته و همچنین به توانایی بیشتر الکل در استخراج ترکیبات ضدقارچی مرتبط دانست.

در یک مطالعه که در مورد تأثیر عصاره های گیاهی بر روی رشد قارچ بیمارگر *Rhizoctonia solani* صورت گرفت عصاره های گیاهان مرزه، آویشن شیرازی و آویشن دناپی به صورت قابل توجهی این بیمارگر را کنترل کردند (Foroughi et al., 2013).

در مطالعه ای اثر بازدارندگی آویشن شیرازی، نعنا فلفلی، رازیانه و اکالیپتوس علیه دو عامل اصلی پوسیدگی

گرفت. در این آزمون، با افزایش میزان غلظت استفاده از عصاره گیاهی، میزان نسخه‌برداری ژن و میزان فعالیت آنزیم‌ها افزایش پیدا کرد. با توجه به این مطالب می‌توان به این نتیجه رسید که عصاره بعضی گیاهان می‌تواند بر روی بیان ژن‌های دفاعی تأثیر بگذارد و با تحریک آنها باعث افزایش بیان آن‌ها شده که این افزایش بیان نهایتاً افزایش فعالیت آنزیم‌ها را در پی خواهد داشت. در این مطالعه، میزان فعالیت فنیل‌آلانین‌آمونیلایز بررسی نشد، ولی با توجه به اینکه روند میزان بیان ژن این آنزیم (افزایش و کاهش آن) هم مانند دو آنزیم دیگر است و نیز از آنجایی که این آنزیم نقش بسیار مهمی در ساخت ترکیبات فنلی دارد (Vogt, 2010)، پس نتیجه می‌گیریم که میزان فعالیت این آنزیم هم افزایش یافته است. لازم به ذکر است که میزان ترکیبات فنلی در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، و روند افزایش و کاهش آن مانند فعالیت آنزیم‌های مورد بررسی بود. آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیلایز یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های حدواسط بین متابولیسم اولیه و ثانویه در گیاهان است و آغازگر مسیر فنیل‌پروپانویید است که L فنیل‌آلانین را با دی‌آمیناسیون به ترانس سینامیک اسید تبدیل می‌کند. این مسیر اصلی بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه در سلول است که سبب تولید متابولیت‌های ثانویه در سلول می‌شود و این موضوع که سبب تولید متابولیت‌هایی مانند کومارین‌ها، اسانس‌ها، فلاونوئیدها، لیگنین، تانن و سایر ترکیبات فنلی می‌شود. این ترکیبات نقش مهمی در دفاع علیه عوامل بیمارگر و حفاظت مکانیکی دارند (Taiz and Zeiger, 2006).

آنزیم فنیل‌آلانین‌آمونیلایز نقش اساسی در تشکیل ترکیبات فنیل‌پروپانوییدی که یکی از مکانیسم‌های دفاعی غیر آنزیمی در گیاهان است داشته و به‌عنوان یکی از شاخص‌های حساس به تغییرات محیطی و همچنین یکی از نشانگرهای بیوشیمیایی دفاعی گیاه در برابر تشنه‌های محیطی مطرح می‌شود (Boudet, 2007).

ریشه و طوقه لوبیا (*Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*)، آویشن شیرازی و نعنا فلفلی بیشترین اثر بازدارندگی (۱۰۰٪) را در مورد هر دو بیمارگر در هر چهار غلظت به کار رفته در آزمون "ظرف پتری معکوس"، نشان دادند (Zandi et al., 2017).

تأثیرات ضدقارچی اسانس گیاه سیر و دو قارچ کش متالاکسیل - مانکوزب و مانکوزب علیه سه گونه *P. melonis* و *P. drechleri* و *Phytophthora capsici* عوامل بوته میری گیاهان خیار، فلفل و طالبی در شرایط آزمایشگاه و گلخانه مورد ارزیابی قرار گرفتند. بر اساس نتایج، اسانس سیر خاصیت قارچ ایستایی و تأثیر چشمگیری بر روی کاهش رشد پرگنه گونه‌های فیتوفتورا داشت. نتایج گلخانه ای در این تحقیق حاکی از کاهش شدت بیماری ۷۳/۷-۸۱/۵٪ در مقایسه با شاهد بود به طوری که تأثیرات آن از قارچ کش مانکوزب بیشتر و کمتر از متالاکسیل - مانکوزب بود (Farhang et al., 2015).

در این بررسی، عصاره‌های گیاهی فعالیت آنزیم‌های پراکسیداز و پلی‌فنل‌اکسیداز و نیز میزان ترکیبات فنلی را تا روز نهم افزایش دادند و از روز نهم تا دوازدهم دوباره فعالیت این آنزیم‌ها و همچنین میزان ترکیبات فنلی کاهش پیدا کرد. تحریک فعالیت آنزیم‌های دفاعی و همچنین ترکیبات فنلی، به وسیله عصاره ارتباط مستقیم با فعالیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی دارد. بر اساس نتایج یک تحقیق که از عصاره برگ کرفس علیه بیماری سفیدک پودری با عامل استفاده شد، این عصاره توانست باعث القای مقاومت به این بیماری شود (Sirus and Jamali Zavare, 2014).

در آزمون بررسی تغییرات بیان ژن‌های پراکسیداز، کاتالاز و فنیل‌آلانین‌آمونیلایز، میزان نسخه‌برداری نسبی این سه ژن دقیقاً روندی مانند میزان فعالیت دو آنزیم مورد بررسی داشتند. در مورد هر سه ژن میزان فعالیت در روز نهم به بیشترین مقدار خود رسید و سپس روند کاهشی را در پیش

## REFERENCES

- Abdolmaleki, M., Bahraminejad, S., Abassi, S., and Mahmodi, SB. 2010. Inhibitory effect of some plant extracts on mycelia growth of *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora drechsleri*, sugar beet root rot agent. *Journal of Sugar Beet*, 5:193- 205.
- Abdul Aziz, H., Omran, A., and Zakaria, W.R. 2010. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidation of pre-coagulated semi aerobic leachate. *International Journal of Environmental Research*, 4 (2), 209-216.
- Agrios, G.N. 2005. Plant disease caused by fungi: disease caused by Ascomycetes and imperfect fungi. *Science*, 25<sup>th</sup>, 922.
- Alam, P., Mohammad, A., Ahmad, M.M., Khan, M.A., Nadeem, M., Khan, R., Akmal, M., Ahlawat, S., Abdin, M.Z., 2014. Efficient method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Artemisia annua* L. *Recent Patents Biotechnology*, 8: 102-107.
- Amini, M., Safaie, N., Salmani, M.J. and Shams-Bakhsh, M., 2012. Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. *Trakia Journal of Sciences*, 10: 1-8.
- Arras, G. 1996. Inhibitory action of microorganisms isolated from citrus fruit against *Penicillium digitatum*. *Proceeding of the International Society of Citriculture*, 456-460.
- Arras, G. and Vsai, M. 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils against four postharvest citrus pathogens: chemical analysis of *Thymus capitates* oil and its effect in subatmospheric pressure condition. *Journal of Food Protection*, 64:1025-1029.
- Azimi, A.A., Delnavaz H.B. and Mansour G.A. 2006. Antifungal effect of aqueous alcoholic and phenolic extracts of seed and leaves of *Sorghum bicolor* against *Fusarium solani*, *Fusarium poae*. *Journal of Medicinal Plants*, 6 (1): 26 – 32. (in Persian with English abstract)
- Bahraminejad, S., Asenstorfer, R.E., Riley, I.T. and Schultz, C.J. 2008. Analysis of the antimicrobial activity of flavonoids and saponins isolated from the shoots oats (*Avena sativa* L.). *Journal of Phytopathology*, 156: 1-7.
- Bakkali, F., Averbeck, S. and Averbeck, D. 2008. *Idaomar M. Biological effects of essential oils. A review. Food and Chemical Toxicology*, 46: 446–475.
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B., 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi*. Published by Amer Phytopathological Society.
- Batta, Y.A. 2004. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. *International Journal of Food Microbiology*, 96 (3): 281–288.

Belewu, M.A., Olatunde, O.A. and Giwa, T.A. 2009. Underutilized medicinal plants and spices: chemical composition and phytochemical properties. *Journal of Medicinal Plant Research*, 3(12): 1099 -1103.

Boudet, A. 2007. Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68, 2722–2735.

Bradford, M.M. 1976. A rapid sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223– 253.

Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K. and Bakhrouf, A. 2017. The chemical composition and biological activity of clove essential oil *Eugenia caryophyllata* (*Syzigium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research*, 21: 501-506.

Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 564 - 82.

Droby, S., Vinokur, V., Weiss, B., Cohen, L., Daus, A., Gold-Schmidt, E.E. and Porat, R. 2002. Introduction of resistance to *Penicillium digitatum* in grapefruit by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila*. *Phytopathology*, 92:393-399.

El-Ghaouth, A., Wilson, C.L. and Wisniewski, M. 1998. Ultrastructural and cytochemical aspects of the biological control of *Botrytis cinerea* by *Candida saitoana* in apple fruit. *Phytopathology*, 88: 282-291.

Ellis, M.B., Walker, J.M. 1974. *Sclerotinia fuckelina* (conidial state: *Botrytis cinerea*). CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. No. 431, CMI, Kew, Surrey, England.

Etebarian, HR, Sholberg, PL, Eastwell, KC, Sayler, RJ. 2005a. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Microbiology*, 51: 591-598.

Etebarian, H.R., Sholberg, P.L., Eastwell, K.C. and Sayler, R.J. 2005b. Biological control of apple blue mold with *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology*, 51: 591-598.

Farhang, V., Amini, J. and Javadi, T. 2015. The effect of garlic essential oil plants, Mancozeb and Metalaxyl-Mancozeb on damping-off diseases caused by *Phytophthora* spp. *Biological Control of Pests and Plant Diseases*, 4 (1): 47-56.



Foroughi, M., Mohammadi, S. and Ghasemi, A. 2013. Antifungal activity of five medical herbs on the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Journal of Microbial World, 5(4): 115-121.

Gholamnezhad, J., Etebarian, H. R. and Sahebani, N. 2010. Biological control of apple blue mold with *Candida membranifaciens* and *Rhodotorula mucilaginosa*. African Journal of Food Science, 4: 001-007.

Gholamnezhad, J., Etebarian, H.R., Roustae, A. and Sahebani N. 2009a. Biological control of apple blue mold by isolates of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Plant Protection Research, 49: 270-275.

Gholamnezhad, J., Etebarian, H.R., Sahebani, N.A. and Roustae, A. 2009b. Characterization of biocontrol activity of two yeast strains from Iran against blue mould of apple in order to reduce the environmental pollution. Journal of International Environmental Application and Science, 4(1): 28-36.

Gholamnezhad, J. 2017. Effect of plant extracts against apple gray mold caused by *Botrytis cinerea*. Applied Microbiology In Food Industries, 3(1): 53-66.

Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi goltapeh, E., Safaei, N. and Razavi, Kh. 2016a. Study of defense genes expression profile pattern of wheat in response to infection by *Mycosphaerella graminicola*. Iranian Journal of Plant Biology, 8(30): 43-55.

Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi goltapeh, E., Safaei, N. and Razavi, Kh. 2016b. Effect of salicylic acid on enzyme activity in wheat in immediate early time after infection with *Mycosphaerella graminicola*. Plant Science, 47(1): 1-8.

Gholamnezhad, J., Sanjarian, F., Mohammadi goltapeh, E., Safaei, N. and Razavi, Kh. 2016c. Evaluation of housekeeping gene expression of wheat interaction against *Mycosphaerella graminicola* with Reverse northern dot blot method. Crop Biotechnology, 12:1-10. (In Farsi with English abstract).

Gong, M., Li, Y., Dai, X., Tian, M. and Li, Z. 1997. Involvement of calcium and calmodulin in the acquisition of HS induced thermotolerance in maize seedling. Journal of Plant Physiology, 150: 615-621.

Hadian, S., Rahnama, K., Jamali, S. and Eskandari, A. 2011. Comparing Neem extract with chemical control on *Fusarium oxysporum* and *Meloidogyne incognita* complex of tomato. Advances in Environmental Biology, 5(8):2052-2057.

Ibtesam Badawy, F.M., Nashwa Sallam, M.A. Ibrahim A.R. and Asran, M.R. 2009. Efficacy of Some Essential Oils on Controlling Green Mold of Orange and their Effects on Postharvest Quality Parameters. Plant Pathology Journal, 10: 168-174.

Johnson, O.O., Ayoola, G.A. and Adenipekun, T. (2013). Antimicrobial activity and the chemical composition of the volatile oil blend from *Allium sativum* (Garlic Clove) and *Citrus reticulata* (Tangeeine Fruit). *International Journal of Pharmaceutical Science and Drug Research*, 5(4): 187-193.

Kamangar, H., Hemmati, R., Yazdinejad, A.R. and Movahedi Fazel, M., 2014. Study on antifungal effects of five plant species extracts against *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* on bean. *Iranian Plant Protection Science*, 49: 49-58.

Khalil, A., and Dababneh, B.F. 2007. Inhibition of Phytopathogenic Fungi by Extracts from Medicinal Plants in Jordan. *Journal of Biological Sciences*, 7 (3): 579-581.

Khaledi, N., Taheri, P. and Tarighi, S., 2015. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, 118: 704-717.

Livak, K.L., and Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methodes*, 25: 402-408.

Martinez, M.C., Crozo, N. and Vilamiel M. 2007. Biological properties of onion and garlic. *Trend in Food -Science and Technology*, 18: 609-625.

Meliss, T.G.S., Sponia, M.S., Terezinha, G.F.M.B., Cardarelli, P. and Therezinha, C.B.T. 2005. Studies on antimicrobial activity in vitro of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Mem inst Oswaldo Cruz Rio de Janerio*, 100 (7): 779 - 82.

Mnayer, D., Sylvie, A., Tixier, F. and Petitcolas, E. 2014. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essential oils from the *Allium* family. *Molecules*, 19: 20034-20053.

Nakhaei, M., Moin-Vaziri, V., Fata, A., Haghghi, A., Iranshahi, M., Abadi, A.R., Sartavi, K. and Jaffari, M.R. 2010. Effect of topical exudate and gel of *Aloe vera* in the course of *Leishmanial major* infection in susceptible Balb/C mice. thnational and the second regional congress of Parasitology and parasitic diseases in Iran. physical properties, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18: 35-66.

Nikpour, F., Mohammadi goltapeh, E. and Safaei, N. 2012. The effect of some essential oils of medicinal plant for control of *Trichoderma* disease of mushrooms. M.Sc. Thesis, Tarbiat Modares University.

Oxenham, S.K., Svoboda, K.P. and Walters, D.R. 2005. Antifungal Activity of leaf extracts and essential Oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. *Journal of Phytopathology*, 148: 483-7.

Pitt, J. I. and Hocking, A. D. 1977. 'Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relations of some xerophilic fungi', Journal of General Microbiology, 101: 35- 40.

Prusky, D., Mcevoy, J. L., Saftner, R., Conway, W. S. and Jones, R. 2004. Relationship between host acidification and virulence of *Penicillium* spp. on apple and citrus fruit. Phytopathology, 94: 44-51.

Reuveni, R. 1995. Biochemical marker of disease resistance. p. 99-114. In: "Molecular Methods in Plant Pathology" (R.P. Singh, U.S. Singh, eds.). Boca Raton, CRC Press, Florida, USA. P. 507.

Razaghpars, A., Shams Ghahfarokh, M., Yadegari, M.H. and Razaghi Abyaneh, M. 2009. Antifungal effect of aqueous extract of garlic (*Sativum allium*) in isolation and in combination with fluconazole, israconazole and ketoconazole on pathogenic yeasts. Journal of Gorgan University of Medical Sciences, 11(1): 49-56.

Shi, C., Dai, Y., Bingle, X., Xu, X., Xie, Y. and Liu, Q. 2001. The purification and spectral properties of polyphenol oxidase I from *Nicotiana tabacum*. Plant Molecular Biology Reporter, 19: 381-382.

Sirus, A. and Jamali Zavare, A.H. 2014. Effectiveness of celery leaf extract on the induction of resistance against cucumber Powdery Mildew. Plant Pathology, 50(2):151-161.

Taiz, L. and Zeiger, E. 2006. Plant Physiology. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Massachusetts, USA. P. 690. 3rd edn.

Tripathi, P. and Dubay, N.K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables review. Postharvest Biology and Technology, 32: 235-245.

Viret, O., Keller, M., Jaudzems, V.G. and Cole, M. 2004. *Botrytis cinerea* infection of grape flowers: light and electron microscopical studies of infection sites. Phytopathology, 94(8): 850-857.

Vogt, T. 2010. Phenylpropanoid biosynthesis. Journal of Molecular Plant, 3: 2-20.

Wijewardane, R.M.N.A. and Guleria, S.P.S. 2009. Combined effect of Pre-cooling, application of natural extracts and packaging on the storage quality of Apple (*Malus domestica*) cv. Royal Delicious. Tropical Agricultural Research, 21: 10-20.

Wilkins, K.A., Bancroft, J., Bosch, M., Ings, J., Smirnoff, N. and Franklin-Tong, V.E. 2011. Reactive oxygen species and nitric oxide mediate actin reorganization and programmed cell death in the self-incompatibility response of Papaver. Plant Physiology, 156: 404-416.

www. faostat.fao.org, 2015.

Yaghoubi, S. M. J., Ghorbani, G. R., Rahmani, H. R. and Nikkhah, A. 2007. In vitro manipulation of rumen fermentation by propolis flavonoids and monensin. *Journal of Dairy Science*, 90(Suppl. 1):105-106. (Abstract)

Zandi, Sh., Hemmati, R., Rezaee, S. and Movahedi Fazel, M. 2017. Study on the effect of some plant essential oils on two fungal causal agents of bean root rot, *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* in Zanzan Province. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 33(3): 411-422.



© 2019 by the authors. Licensee SCU, Ahvaz, Iran. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International (CC BY-NC 4.0 license) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

## Investigation on the effect of garlic and thyme extracts on orange green mold (*Penicillium digitatum*), defense enzymes and genes expression

J. Gholamnezhad<sup>1\*</sup>, Sh. Arsalani<sup>2</sup> and M. Maleki<sup>3</sup>

1. \*Corresponding Author: Assistant professor, Faculty of agriculture and natural resources, Ardakan University, Ardakan, Iran (jgholamnezhad@ardakan.ac.ir)
2. M.Sc. Student of Plant pathology, Islamic Azad University of Varamin-Pishva, Varamin, Iran
3. Assistant professor, Faculty of department of plant protection, Islamic Azad University of Varamin-Pishva, Varamin, Iran

(DOI): 10.22055/PPR.2019.14495

Received: 25 September 2018

Accepted: 13 February 2019

---

### Abstract

#### Background and Objectives

The use of chemical pesticides has caused environmental hazards as well as the creation of residues on food products. In this research, the extracts of *Zataria multiflora* Boiss. and Garlic (*Allium sativum* L.) were used for controlling the green mold of orange caused by *Penicillium digitatum*, *invitro* and *invivo* at 15 °C.

#### Materials and Methods

In this study, the effect of plant extracts against the pathogen was evaluated using two methods, included the paper disc and mixing with culture media. Then, the effect of these extracts on the fruit was studied against the pathogen. The activity levels of the enzymes including peroxidase, catalase and polyphenol oxidase, as well as total phenol content were measured. Finally, the expression of catalase, peroxidase and polyphenol oxidase genes was evaluated using the Real time PCR method.

#### Results

The results of disc test showed that aqueous and alcoholic extracts of garlic had the highest effect on fungal mycelium growth with 60 mg at ml concentration and 32.20 mm and 26.12 mm diameter of inhibition zone, respectively. The mixing culture test showed that aqueous and alcoholic extracts of garlic with 65.25 and 75.26 percent of the inhibitory effect on the pathogen, respectively, showed the best control compared to the control in 600 mg at L concentration. The results of *invivo* assays indicated that 6×1000 concentration of aqueous and alcoholic garlic and thyme extracts had the lowest of decay area with 5.3 and 3.26 cm<sup>2</sup>, respectively (for garlic) and 7.44 and 4.15 cm<sup>2</sup> for thyme. Results of enzyme activity of peroxidase and polyphenol oxidase showed that the highest activity of both enzymes was 9 days after sampling and in the treatment of 6×1000 garlic extract.

#### Discussion

Based on the results of laboratory and storage tests, the extract of both garlic and thyme are introduced as natural constituents with controlled potentials. The genes expression levels of enzymes as peroxidase, polyphenol oxidase, and phenylalanine ammonialis had the same trend to the activity of two enzymes over a period of 12 days. Based on the results of *invivo* and *invitro* tests, the extract of garlic and thyme are introduced as natural compounds with high controlling potentials.

**Keywords:** Plant extracts, Green mold, Defense enzymes activity, Defense gene expression