

اثرات قارچ کشی چهار اسانس گیاهی روی قارچ *Botrytis cinerea* در شرایط آزمایشگاهی

ابوالفضل اصغری مرجانلو^۱، یونس مستوفی^{۲*}، مرضیه حیدری^۳، محمد جوان نیک خواه^۴، شهرام شعبی^۵

۱- کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم باغبانی و گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی

دانشگاه تهران، تهران

۲- دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده علوم باغبانی و گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، تهران

۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه باغبانی، دانشکده کشاورزی دانشگاه آزاد کرج، کرج

۴- دانشیار، گروه گیاهپزشکی، دانشکده علوم باغبانی و گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، تهران

۵- عضو هیأت علمی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، معاونت غذا و دارو، تهران

*آدرس مکاتبه: کرج، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران، دانشکده علوم باغبانی و گیاهپزشکی،

گروه علوم باغبانی، تلفن: ۰۹۱۲۵۰۱۰۴۹۵، نمابر: ۲۲۴۸۷۲۱ (۰۲۶۱)

پست الکترونیک: ymostofi@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۸۸/۴/۲۱

تاریخ تصویب: ۸۸/۵/۴

چکیده

مقدمه: اسانس‌های گیاهی که مخلوطی از ترکیبات بسیار پیچیده هستند، خواص بیولوژیکی متنوعی دارند. هدف: پژوهش حاضر با هدف بررسی تاثیر اسانس‌های ریحان، مریم گلی و زیره سبز در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ و اسانس آویشن در غلظت‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۵۰ میکرولیتر در جلوگیری از رشد قارچ بوتریس سینترا در شرایط درون شیشه‌ای انجام گرفت. روش بررسی: این آزمایش با دو روش ترکیب اسانس‌ها با محیط کشت (SM) و استفاده از روش دیسک کاغذی (PDM) مورد انجام شد.

نتایج: نتایج نشان می‌دهد که اثر بازدارندگی اسانس‌ها به نوع و غلظت اسانس و روش تیمار بستگی دارد. روش PDM در جلوگیری از رشد قارچ موثرتر از روش SM می‌باشد. اسانس‌های زیره سبز، ریحان و مریم گلی وقتی با روش PDM به کار رفتند، در همه غلظت‌ها به طور کامل از رشد قارچ جلوگیری کردند. در روش SM، اثر بازدارندگی اسانس‌ها به غلظت به کار رفته بستگی داشته به طوری که اسانس زیره سبز و آویشن در غلظت ۲۵۰ میکرولیتر بر لیتر از رشد قارچ جلوگیری نمودند. در حالی که اسانس ریحان و مریم گلی در این غلظت از رشد قارچ *B. cinerea* را جلوگیری نکردند. نتایج حاصل از بررسی حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی نشان داد که اسانس‌های استفاده شده در این آزمایش در غلظت‌های به کار رفته در هر دو روش قارچ ایستا هستند و تنها اسانس زیره سبز در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر در روش PDM توانست قارچ مزبور را از بین ببرد.

نتیجه‌گیری: اسانس‌ها ترکیبات طبیعی هستند که در مقایسه با سموم سنتتیک اثرات جانبی کمتری دارند و با انجام تحقیقات زیاد می‌توان به فرمولاسیونی دست یافت که این ترکیبات طبیعی به خصوص در نگهداری محصولات باغبانی جایگزین سموم سنتتیک گردد.

کل واژگان: قارچ بوتریس، مریم گلی، زیره سبز، ریحان، آویشن



مقدمه

پوسیدگی خاکستری ناشی از قارچ بوتریس سینرا، اکثر میوه‌ها و سبزی‌ها و همچنین تعداد زیادی از درختچه‌ها، درختان، گل‌ها و گیاهان علفی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. آلودگی اولیه در مرحله غنچه بودن گل‌ها اتفاق می‌افتد. علائم بیماری بسته به گیاه میزبان و قسمت مورد حمله فرق می‌کند. علائم عمومی شامل ظهور رنگ قهوه‌ای تا خاکستری که یک پوسیدگی کرک مانند به رنگ سفید خاکستری تا خرمایی به دلیل حضور میسلیموم‌ها و اسپورها تشکیل می‌دهد که نام بیماری هم از آن گرفته شده است. بافت‌های آلوده به رنگ تیره تا قهوه‌ای در آمده و همه میوه ممکن است بدون تجزیه شدن، پوسیده شود. اسپورهای قارچ جهت جوانه‌زنی به رطوبت آزاد یا سطوح مرطوب و دمای ۲۵ - ۱۵ درجه سانتی‌گراد نیاز دارد. قارچ بوتریس در دماهای پایین نیز فعال بوده و سبب پوسیدگی و خسارت در سبزی‌ها و میوه‌ها می‌شود. توده میکروسکوپی کنبدی‌ها روی سطح بافت‌های آلوده به صورت خوشه‌های شبیه انگور تشکیل می‌شوند [۶]. امروزه برای کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی از ترکیبات مصنوعی تحت عنوان قارچ‌کش‌ها به طور گسترده استفاده می‌شود. این ترکیبات مصنوعی اغلب روی سلامتی انسان اثرات زیان‌باری دارند که نتیجه استفاده از این مواد افزایش بیماری‌های سرطانی و قلبی عروقی در جوامع انسانی و حیوانی است. این مواد به دلیل ماندگاری زیادی که دارند اغلب محیط زیست را تهدید می‌کنند. از جمله روش‌های سالم و بی‌خطر برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت، استفاده از ترکیبات طبیعی تحت عنوان عصاره‌های طبیعی یا اسانس‌های گیاهی است [۱۱]. ساختمان اصلی اسانس‌های گیاهی را ایزوپرن تشکیل می‌دهد. این ترکیبات به گروه ترپنوئیدها و یا فینیل پروپانوئیدها تعلق دارند. زمانی که این ترکیبات حاوی اکسیژن باشند در گروه ترپنوئیدها قرار می‌گیرند [۱۶]. ترکیبات موجود در اسانس‌ها گستره وسیعی از متابولیت‌های ثانویه (Secondary metabolites) را شامل می‌شوند که توسط قسمت‌های مختلف گیاهان ساخته می‌شوند. بیشتر این ترکیبات در گروه ترپنوئیدها قرار گرفته و خواص دارویی زیادی مانند

آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی، ضدباکتری، ضدقارچی و زیست تنظیمی (Bioregulatory) برای آنها گزارش شده است. اسانس‌ها از نظر شیمیایی ترکیبات پیچیده‌ای هستند که اغلب بیش از صد جزو در ترکیب آنها وجود دارد و به نظر می‌رسد خاصیت میکروبی آنها در نتیجه فعالیت سینترژیستی ترکیبات موجود در آنها است. ترکیب شیمیایی اسانس‌های گیاهی بسته به شرایط محیطی که گیاهان دارویی در آن رشد کرده و برداشت می‌شوند، روش‌های خشک کردن، شرایط انباری که گیاه تا زمان استخراج اسانس در آن نگهداری می‌شود، روش‌های استخراج اسانس و آنالیز ترکیبات موجود در آن تغییر می‌کند [۳، ۱۹]. اسانس‌ها ترکیباتی هستند که در دمای فیزیولوژیک فشار بخار بالایی دارند و به شکل مایع و یا گاز میکروارگانیسم‌ها را کنترل می‌کنند [۶]. ترکیبات طبیعی حاصل از گیاهان به صورت سنتی در کشورهایی مثل هند، روسیه، ژاپن، جهت نگهداری مواد غذایی استفاده می‌شود [۲۰]. با توجه به این که روغن‌های حاصل از قسمت‌های مختلف گیاهان آلی خاصیت سم‌زدایی از خود نشان داده‌اند [۱۶]. بنابراین پودر و عصاره بعضی از گیاهان برای جلوگیری از رشد قارچ‌ها و ممانعت از تولید مواد سمی توسط عوامل قارچی استفاده می‌شوند [۲۰]. طبقه‌بندی اسانس‌های گیاهی در گروه مواد غذایی می‌تواند به استفاده از آنها به عنوان تیمارهای ضدقارچی و ضدباکتریایی روی اکثر محصولات غذایی تازه کمک کند [۵]. برای مثال آفلاتوکسین به عنوان یک سم قارچی خطرناک، سبب ایجاد سمیت حاد و مزمن در حیوانات و انسان شده و باعث صدمه به کبد و تولید غده می‌شود. روغن بالنگ از رشد و اسپورزایی قارچ آسپرژیلوس و تولید آفلاتوکسین در شرایط درون شیشه‌ای جلوگیری کرده بنابراین می‌توان با استفاده از ترکیبات سالم و طبیعی به مبارزه با این مشکل پرداخت [۱۷].

از بین ۲۵۰ گونه از ۳۷ تیره گیاهی بومی ایران، که فعالیت ضدقارچی آنها در برابر ۱۹ نژاد قارچ مورد بررسی قرار گرفته، ۱۸۵ نوع از آنها حداقل در برابر یک نژاد از قارچ فعالیت ضدقارچی نشان دادند [۱]. از بین ۴۹ اسانس گیاهی آزمایش شده، اسانس‌های حاصل از *Eugenia caryophyllata*، *Cynamomum zylanicum*



فعالیت ضدقارچی بالایی در برابر قارچ بوتریس سینرا داشته‌اند [5]. از بین ۳۴۵ عصاره گیاهی، ۱۳ عصاره فعالیت ضدقارچی بالایی از خود نشان داده‌اند که از بین آنها عصاره گونه‌های *Allium* و *Capsicum* اثرات برجسته‌ای در این زمینه داشته‌اند. فعالیت قارچ‌کشی این ترکیبات بیشتر به وجود موادی مانند D- لیمونن، سینئول، بتا- میرسین، آلفا- پینن، بتا- پینن و کامفور مربوط می‌شود که در ترکیب اسانس‌ها و عصاره‌های فوق‌الذکر حضور دارند [۲۰]. در پژوهش حاضر اثر بازدارندگی اسانس‌های زیره سبز، مریم‌گلی، ریحان و آویشن بر روی قارچ *B. cinerea* با دو روش ترکیب اسانس با محیط کشت و استفاده از دیسک کاغذی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

اسانس‌ها

اسانس‌های استفاده شده در این پژوهش شامل اسانس آویشن، ریحان، زیره سبز و مریم‌گلی می‌باشد که از شرکت تولید و فرآوری گیاهان دارویی زردبند خریداری شده و با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی (GC) و گاز کروماتوگرافی همراه با طیف سنجی جرمی (GC/MS) در موسسه جنگل‌ها و مراتع کشور آنالیز شدند. مدل دستگاه مورد استفاده در آنالیز اسانس‌ها، Shimadzu سری 9A ساخت کشور ژاپن بود که مجهز به ستون DB-5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر است. برنامه‌ریزی حرارتی ستون به این صورت بود که از دمای اولیه ۶۰ درجه تا دمای نهایی ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد که در هر دقیقه ۳ درجه به آن افزوده می‌شود و سپس از دمای ۲۱۰ تا ۲۴۰ درجه با سرعت ۲۰ درجه در دقیقه افزوده شده و به مدت ۸/۵ دقیقه در دمای ۲۴۰ درجه توقف می‌کند. آشکارساز FID با دمای ۲۸۰ و دمای محفظه تزریق ۳۰۰ درجه و گاز حامل شامل گاز هلیوم با درجه خلوص ۹۹/۹۹ درصد می‌باشد.

تیمار اسانس‌ها روی قارچ *B. cinerea* در شرایط درون شیشه‌ای

محیط کشت مورد استفاده برای کشت قارچ PDA (Potato dextrose agar) از شرکت مرک (Merk) بود که

برای تهیه آن ۳۹ گرم از پودر تجاری آن یک در لیتر در آب مقطر حل شد و به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو (دمای ۱۲۱ درجه و فشار ۱/۵ اتمسفر) سترون شد. بعد از اتوکلاو شدن به محیط کشت اجازه داده شد تا رسیدن به دمای ۴۵-۴۰ درجه خنک شود. در این دما به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر استرپتومایسین به عنوان آنتی‌بیوتیک جهت حذف هر گونه آلودگی باکتریایی به آن افزوده شد و محیط کشت به دو قسمت مساوی تقسیم شد. یک قسمت بلافاصله در پتری تشتک‌های ۸ سانتی‌متری توزیع شد و اجازه داده شد که جامد شود. این قسمت از محیط کشت برای اعمال تیمارها به روش استفاده از دیسک کاغذی استفاده شد. قسمت دوم از محیط کشت برای مخلوط شدن با اسانس‌های مورد آزمایش به این صورت آماده شد که در طی زمانی که محیط کشت خنک می‌شد اسانس‌های زیره سبز، ریحان و مریم‌گلی در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر و اسانس آویشن در غلظت‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۵۰ میکرولیتر بر لیتر ابتدا در توئین ۸۰ ۰/۰۵ درصد حل شد [۹] و وقتی دمای محیط ۴۵-۴۰ درجه بود به محیط کشت افزوده شد و بلافاصله در تشتک‌های یک‌بار مصرف سترون ۸ سانتی‌متری به ازای هر تشتک پتری ۲۰ میلی‌لیتر، توزیع شد. جدایه تک‌کنیدی شده قارچ *B. cinerea* که قبلاً از روی توت‌فرنگی جداسازی شده بود، برای کشت روی محیط کشت استفاده شد. کشت به این صورت بود که با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ کن دیسک‌هایی به قطر ۰/۵ میلی‌متر از میسیلیوم‌های قارچ، از پیرامون تشتک پتری برداشته و در وسط آن به صورت معکوس قرار داده شد [۱۵]. در روش ترکیب اسانس با محیط کشت، بلافاصله پس از کشت قارچ، دور تشتک با پارافیلیم مسدود شد در حالی که در روش استفاده از دیسک کاغذی برای اعمال تیمار اسانس‌ها، بعد از اینکه قارچ به شرح بالا کشت گردید، اسانس‌ها در غلظت‌های مورد استفاده روی دیسک‌هایی از جنس کاغذ صافی (واتمن ۱) به قطر ۲ سانتی‌متر قرار داده شده و کاغذ آغشته به اسانس در یک گوشه از تشتک قرار داده شد و بلافاصله دور تشتک با پارافیلیم مسدود شد. در این روش غلظت اسانس‌ها بر اساس حجم خالی تشتک محاسبه شد. تشتک‌های کشت شده در انکوباتور در دمای ۲۴ درجه



به صورت روزانه تا شش روز مورد ارزیابی قرار گرفتند. پژوهش حاضر به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تکرار انجام شد و آزمایش دو با تکرار شد. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار MSTATC تجزیه آماری شدند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از آنالیز اسانس‌ها با دستگاه گازکروماتوگرافی همراه با طیف سنجی جرمی (GC/MS) در جدول شماره ۱ آورده شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود اسانس‌های آویشن، مریم گلی، ریحان و زیره سبز به ترتیب حاوی تیمول (۴۶ درصد)، آلفا - توجان (۳۴/۲ درصد) استراگول (۷۳/۴ درصد) و گاما ترپینن (۲۵/۵) می‌باشد. البته علاوه بر ترکیبات فوق ترکیبات زیاد دیگری نیز در هر یک از اسانس‌ها وجود دارد که به طور کامل و دقیق در جدول شماره ۱ آورده شده است.

سانتی‌گراد قرار داده شد. میزان رشد قارچ به صورت روزانه تا شش روز که در تشتک‌ها در تیمار شاهد پر شدند، مورد بررسی قرار گرفت و درصد بازدارندگی اسانس با استفاده از فرمول به شرح زیر محاسبه شد:

$$IP = \frac{dc - dt}{dc} \times 100$$

IP = درصد بازدارندگی

dc = قطر هاله قارچ در شاهد

dt = قطر هاله قارچ در تیمار اسانس

بررسی قارچ کشی یا قارچ ایستا بودن اسانس‌های مورد آزمایش
با پر شدن پتری‌های شاهد، آزمایش اول به اتمام رسید. در تیمارهایی که هیچ‌گونه رشدی صورت نگرفته بود جهت مشخص کردن اینکه اسانس‌های تیمار شده از رشد قارچ جلوگیری کرده یا آن را از بین برده‌اند آزمایش دیگری ترتیب داده شد به این صورت که محیط کشت PDA که هیچ تیمار اسانسی روی آن اعمال نشده بود تهیه و دیسک‌های قارچ کشت شده در آزمایش اول که هیچ رشدی نشان نداده بودند، به محیط‌های جدید عاری از اسانس انتقال داده شده و دوباره

جدول شماره ۱- درصد اجزای تشکیل دهنده اسانس‌های مورد استفاده در این پژوهش

نام ترکیب	آویشن	مریم گلی	ریحان	زیره سبز
α -Thujene	۱/۲	۰/۲۷	۰/۱۱	۰/۴۳
Tricyclene	-	۰/۲۵	-	-
α -Pinene	-	۷/۲	-	۱/۴
Camphene	۰/۶	۷/۵	-	۰/۳
Sabinene	۱/۸	۰/۱۵	-	۰/۴۵
β -Pinene	۰/۱	۲/۵	۰/۱۳	۱۹/۷۴
Myrcene	۲/۴	۰/۹۴	۰/۱۴	۰/۶
α -Phellanderene	۰/۱	۰/۰۵	-	۱/۰۴
α -Terpinene	۲/۱	۰/۷	۰/۰۹	۰/۰۷۳
ρ -Cymene	۱۷/۶۹	۷/۳۳	۰/۱۳	۱۲/۹
γ -Terpinene	۱۴/۸	۰/۴	۰/۰۸	۲۵/۵
α -Thujone	-	۳۴/۲	-	-
β -Thujone	-	۱۴/۴۶	-	-
Camphor	-	۱۷/۰۵	-	-



ادامه جدول شماره ۱- درصد اجزای تشکیل دهنده اسانس‌های مورد استفاده در این پژوهش

نام ترکیب	آویشن	مریم‌گلی	ریحان	زیره سبز
Borneol	۱/۱	۲/۰۵	-	-
Cumin aldehyde	-	-	-	۲۴/۹
Terpinen-4-ol	-	۰/۳۱	-	-
α -Terpineol	-	۰/۵	-	-
Bornyl acetate	-	۰/۴۶	-	-
α -Gargunene	-	۰/۶۸	-	-
Carvacrol	۲/۵۹	-	-	-
Aromadendrene	-	۱/۱۵	-	-
Limonene	۱/۲۱	-	-	-
Caryophyllene oxide	-	۰/۴۶	-	-
Thymol	۴۶	-	-	-
β -Phellandrene	-	-	-	۱/۱۴
γ -Elemene	-	-	۰/۲	-
P-menth-1-en-7- al	-	-	-	۵/۳
Nonanal-dimethyl acetet	-	-	-	۱/۸
1,8- cineol	۰/۴	-	۰/۲۱	-
Linalool	۲/۳۸	-	۲۲/۲۴	-
Dihydro linalool	-	-	۰/۱۸	-
Linalool oxide	-	-	۰/۲۴	-
Estragol(Methyl chavicol)	-	-	۷۳/۳۸	-
Citronellol	-	-	۰/۲	-
Chavicol	-	-	۰/۳۷	-
Methyl eugenol	-	-	۰/۳۸	-
Cis- Bergamotene	-	-	۰/۴	-
δ -Cadinene	-	-	۰/۷	-
(Zand E)- β -Ocimene	-	-	۰/۱۶	-
Trans- sabinene	۱	-	-	-
Methyl carvacrol	۰/۴	-	-	-

بررسی اثر ضدقارچی اسانس‌ها

در روش استفاده از دیسک کاغذی همه اسانس‌های استفاده شده موثرتر از روش ترکیب اسانس با محیط کشت بودند به عبارت دیگر روش اعمال تیمار تاثیر معنی‌داری در اثر بازدارندگی اسانس‌ها از رشد قارچ داشت (شکل شماره ۱). هر چهار اسانس به کار رفته در این پژوهش در جلوگیری از رشد

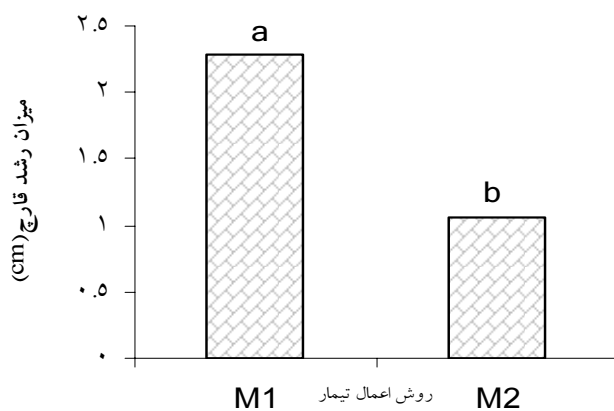
قارچ موثر بوده و به طور معنی‌داری از رشد قارچ بوترتیس سینرا جلوگیری کردند. البته اثر بازدارندگی اسانس‌ها تحت تاثیر روش اعمال تیمار قرار گرفته است به طوری که در روش ترکیب با محیط کشت، اسانس آویشن و زیره سبز نسبت به اسانس مریم‌گلی و ریحان کارایی بالایی از خود نشان داده‌اند. همان‌طور که در جدول شماره ۲ نشان داده شده است اسانس



چندان موثر نبود به طوری که در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر به ترتیب صفر، صفر، ۱۶ و ۳۰/۲۶ درصد از رشد قارچ جلوگیری نمود (جدول شماره ۳). ولی این اسانس در روش استفاده از دیسک کاغذی (M₂) در جدول شماره ۲ و ۳) در همه غلظت‌های به کار رفته از رشد قارچ جلوگیری کرد. وقتی اسانس ریحان روی قارچ *B. cinerea* با روش ترکیب با محیط کشت تیمار شد، قدرت بازدارندگی اندکی نشان داد (M₁) جدول شماره ۳ و ۲) به طوری که در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر به ترتیب صفر، صفر و ۸/۹ درصد از رشد قارچ جلوگیری نمود. در حالی که این اسانس در روش استفاده از دیسک کاغذی (M₂) در جدول شماره ۲ و ۳) در هر چهار غلظت به کار رفته به طور کامل از رشد قارچ *B. cinerea* جلوگیری کرد (جدول شماره ۳). اسانس آویشن در غلظت‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۵۰ میکرولیتر بر لیتر در روش ترکیب اسانس با محیط کشت (M₁) در جدول شماره ۲ و ۳) به ترتیب ۲۹/۸۶، ۳۶، ۶۲/۶ و ۸۰ درصد از رشد قارچ بوتریس سینرا جلوگیری کرد. در حالی که این اسانس در روش استفاده از دیسک کاغذی (M₂) در جدول شماره ۲ و ۳) در غلظت‌های فوق به ترتیب ۵۲/۵، ۶۴/۵، ۶۴/۵ و ۷۵/۶ درصد از رشد قارچ جلوگیری کرد (جدول شماره ۳).

آویشن در غلظت‌های ۳۰ و ۶۰ با اسانس زیره سبز در غلظت ۲۵۰ و اسانس مریم گلی در غلظت ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر در یک سطح آماری قرار گرفته‌اند. همچنین اسانس آویشن در غلظت ۲۵۰ با اسانس زیره سبز در غلظت‌های ۵۰۰ و ۷۵۰ میکرولیتر بر لیتر در یک سطح آماری قرار گرفته‌اند. اسانس ریحان در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر با اسانس مریم گلی در غلظت‌های ۲۵۰ و ۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر در یک سطح آماری قرار گرفته و با شاهد و توئین ۸۰ اختلاف معنی‌داری نشان ندادند (جدول شماره ۲). در کل در روش ترکیب با محیط کشت اسانس آویشن نسبت به سایر اسانس‌ها بهتر بوده و به طور معنی‌داری از رشد قارچ جلوگیری کرد (جدول شماره ۲ و ۳). اسانس زیره سبز در روش ترکیب با محیط کشت (M₁) در جدول شماره ۲ و ۳) در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر به ترتیب ۳۷/۸۶، ۸۲، ۸۶/۶ و ۱۰۰ درصد از رشد قارچ جلوگیری نمود (شکل شماره ۲). در حالی که این اسانس در روش استفاده از دیسک کاغذی (M₂) در جدول شماره ۲ و ۳) در هر چهار غلظت به کار رفته به طور کامل از رشد قارچ جلوگیری کرد.

اسانس مریم گلی در کنترل قارچ *B. cinerea* در روش ترکیب اسانس با محیط کشت (M₁) جدول شماره ۲ و ۳)



شکل شماره ۱- تاثیر روش اعمال تیمار بر اثر بازدارندگی اسانس‌ها روی قارچ *Botrytis cinerea*
 M1= روش ترکیب اسانس با محیط کشت و M2= روش استفاده از دیسک کاغذی



جدول شماره ۲- نتایج حاصل از مقایسه میانگین داده‌های حاصل از بررسی اثر بازدارندگی چهار اسانس گیاهی روی قارچ *B. cinerea*

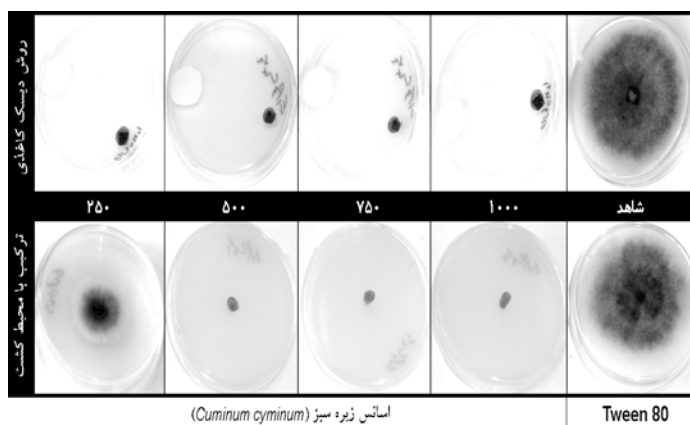
غلظت اسانس ($\mu\text{L.L}^{-1}$)	نوع اسانس	زیره سبز	ریحان	مریم گلی	آویشن
M ₁ C ₁		۴/۶۶cd	۷/۵a	۷/۵a	۵/۲۶bc
M ₁ C ₂		۱/۴۶fg	۷/۵a	۷/۵a	۴/۸۳c
M ₁ C ₃		۱gh	۷/۵a	۶/۳ab	۲/۸ef
M ₁ C ₄		۰ h	۶/۸۳a	۵/۲۳bc	۱/۵۳fg
M ₂ C ₁		۰ h	۰ h	۰ h	۳/۵۶de
M ₂ C ₂		۰ h	۰ h	۰ h	۲/۶۶ef
M ₂ C ₃		۰ h	۰ h	۰ h	۲/۷ef
M ₂ C ₄		۰h	۰h	۰h	۱/۸۳fg
شاهد		۷/۵a	۷/۵a	۷/۵a	۷/۵a
توئین ۸۰		۷/۵a	۷/۵a	۷/۵a	۷/۵a

M₁ = روش ترکیب اسانس با محیط کشت و M₂ = روش استفاده از دیسک کاغذی.

C₁, C₂, C₃ و C₄ به ترتیب ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر (برای اسانس‌های زیره سبز، ریحان و مریم گلی) و ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۵۰ میکرو لیتر بر لیتر برای اسانس آویشن

جدول شماره ۳- درصد بازدارندگی چهار اسانس گیاهی روی قارچ *Botrytis cinerea*

غلظت اسانس ($\mu\text{L.L}^{-1}$)	نوع اسانس	زیره سبز	ریحان	مریم گلی	آویشن
M ₁ C ₁		۳۷/۸۶	۰	۰	۲۹/۸۶
M ₁ C ₂		۸۲	۰	۰	۳۶
M ₁ C ₃		۸۶/۶	۰	۱۶	۶۲/۶
M ₁ C ₄		۱۰۰	۸/۶	۳۰/۲۶	۸۰
M ₂ C ₁		۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۵۲/۵
M ₂ C ₂		۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۴/۵
M ₂ C ₃		۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۶۴/۵
M ₂ C ₄		۱۰۰	۱۰۰	۱۰۰	۷۵/۶
شاهد		۰	۰	۰	۰
توئین ۸۰		۰	۰	۰	۰

شکل شماره ۲- تاثیر اسانس زیره سبز روی رشد قارچ *Botrytis cinerea*

بحث

قارچ *B. cinerea* یک بیمارگر مهم است که عامل کپک خاکستری روی میوه‌های توت‌فرنگی و انگور و سایر محصولات فسادپذیر می‌باشد که باعث از بین رفتن محصول در مرحله پس از برداشت می‌شود. استفاده از ترکیبات شیمیایی برای مبارزه با این بیمارگر روی محصولاتی که به صورت مستقیم مصرف می‌شوند، خطرناک است. به همین خاطر استفاده از ترکیبات سالم و ایمن به خصوص ترکیباتی که منشای گیاهی دارند، ضروری می‌باشد. این قارچ نسبت به سایر قارچ‌ها به اثرات قارچی‌کشی و قارچ ایستایی اسانس‌های گیاهی حساسیت بالایی دارد. اسانس‌های گیاهی از ترکیبات مختلفی تشکیل یافته‌اند و خاصیت ضدقارچی و ضدباکتریایی آنها در نتیجه فعالیت سینرژیستی ترکیبات موجود در آن می‌باشد [۳، ۱۹].

اسانس‌ها از نظر شیمیایی ترکیبات پیچیده‌ای هستند که اغلب انواع مختلف مواد شیمیایی در ترکیب آنها وجود دارد که شامل هیدروکربن‌ها (*Myrcene*, *p-Cymene*, *γ-Terpinene*), الکل‌های و فنل‌ها (*Thymol*, *Linalool*), *Estragol* (*Methyl chavicol*) که در اسانس‌های ریحان و آویشن وجود دارند اما در اسانس‌های زیره سبز و مریم‌گلی یافت نشده‌اند. تیمول یک منوترپن الکیلی است که از *Cymene* مشتق شده و به نام هیدروکسی سیمین هم خوانده می‌شود این ترکیب خاصیت ضدعفونی‌کنندگی قوی دارد و از آویشن استخراج شده است، کتون‌ها (*Thujone*) که برای سلول‌های زنده سمی بوده و در غلظت‌های بالا باعث تشنج و آشوب سلولی می‌شود. دارای دو ایزومر آلفا و بتا است که ایزومر آلفا از نظر سمیت برای سلول‌های زنده از ایزومر بتا فعال‌تر است، آلدئیدها (*Cumin aldehyde*) که یک بنزآلدئید است که یک گروه ایزوپروپیل در موقعیت ۴ جایگزین شده است با فرمول ($C_{10}H_{12}O$), اترها و ... می‌باشد که در هر اسانس یک یا چند گروه از این مواد نقش اصلی را در خواص اسانس بازی می‌کند. منوترپن‌های هیدروکربنی نظیر بتامیرسن که ۲/۴ درصد در آویشن، ۰/۹۴ درصد در مریم‌گلی، ۰/۶ درصد در زیره سبز و ۰/۱۴ درصد در ریحان مورد

آزمایش وجود دارد و لیمونن که ۱/۲۱ درصد در آویشن وجود دارد، به علت حلالیت پایین و نفوذ کم در دیواره سلولی اثر بازدارندگی کمتری در برابر عوامل بیماری‌زای قارچی دارند [۷]. اسانس زیره سبز دارای عامل آلدئیدی ($CH = O$) است که این عامل فعالیت ضد میکروبی زیادی دارد. به نظر می‌رسد اثر کنترل‌کنندگی اسانس زیره سبز مورد استفاده در این پژوهش (جدول شماره ۳) وجود کومین آلدئید (۲۴/۹ درصد)، گاما ترپینن (۲۵/۵ درصد)، *p-Cymene* (۱۲/۹ درصد) و یا هر کدام از ترکیبات شناخته شده باشد که به میزان اندک در ترکیب آن وجود دارند. مکانیسم عمل آلدئیدها به این صورت است که در پیوند به کربن، بار الکتریکی منفی زیادی پیدا می‌کنند و در فرآیندهای بیولوژیک، ترکیبات دارای بار منفی به عنوان یک عامل محافظت‌کننده عمل کرده و با انتقال الکترون به نیتروژن موجود در ساختمان پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک میکروارگانیسم‌ها، مانع رشد آنها می‌شوند [۱۰]. اسانس مریم‌گلی در روش ترکیب با محیط کشت کارایی نسبتاً کمی در جلوگیری از رشد قارچ داشته ولی در روش استفاده از دیسک کاغذی اثر بازدارندگی کامل دارد. ویلکوویچ و همکاران (۲۰۰۲) اعلام کردند که اسانس مریم‌گلی در روش استفاده از دیسک اثر ضد میکروبی ندارد [۱۸] که با نتایج این پژوهش همخوانی ندارد. عوامل زیادی در این اختلاف نتایج می‌تواند دخالت داشته باشد. از جمله اختلاف در شرایط آزمایش و نوع مهمتر از آن مونه شیمیایی مریم‌گلی که استفاده شده است. نوع و میزان مواد موثره گیاهان دارویی تحت تاثیر عوامل گوناگونی قرار دارد و بسته به شرایط آب و هوایی، خاکی و حتی عرض جغرافیایی محل رشد آنها فرق می‌کند و به احتمال زیاد اختلاف بین نتایج به دست آمده در این پژوهش با نتایج ویلکوویچ و همکاران (۲۰۰۲)، استفاده از مونه‌های شیمیایی متفاوت مریم‌گلی می‌باشد. ماده موثره اسانس مریم‌گلی مورد استفاده در پژوهش حاضر یک منوترپن به نام آلفا-توجن است که به میزان ۳۴/۲ درصد در ترکیب آن وجود دارد. همان‌طور که در بالا هم اشاره شد توجن برای سلول‌های زنده سمی می‌باشد و در غلظت‌های بالا می‌تواند سبب تشنج و آشوب سلولی شود. توجن در ساختمان خود دارای عامل کتونی است



با فرمول ($C_{10}H_{16}O$) که دارای دو ایزومر آلفا و بتا است که ایزومر آلفا از نظر سمیت برای سلول‌های زنده نسبت به ایزومر بتا فعال‌تر است. در اسانس مریم گلی استفاده شده در این پژوهش هر دو ایزومر آلفا (۳۴/۲ درصد) و بتا (۱۴/۴۶ درصد) وجود دارند [۱۸].

الکل‌های ترپنوئیدی از طریق تجزیه پروتئین‌ها و دهیدراته کردن آنها باعث توقف رشد میکروارگانیسم‌ها می‌شوند [۱۳]. نتایج این پژوهش که نشان می‌دهد اسانس ریحان در جلوگیری از رشد قارچ *B. cinerea* کارآیی کمی دارد، با نتایج پلوتو و همکاران (۲۰۰۳) همخوانی ندارد. آنها گزارش کرده‌اند که اسانس ریحان رشد قارچ *B. cinerea* را تا ۹۰ درصد کنترل می‌کند [۱۱]. آن‌ها نشان دادند وقتی آلدئید آلیفاتیک ترانس-۲-دسنال به محیط کشت PDA اضافه می‌شود، اثر خود را در برابر قارچ بوتریس از دست داده ولی وقتی به شکل بخار به کار می‌رود در برابر آن قارچ کش می‌باشد [۱۱]. اسانس ریحان حاوی لینالول (۲۲/۲۴ درصد با فرمول $C_{10}H_{18}O$) و استراگول (۷۳/۳۸ درصد با فرمول $C_{10}H_{12}O$) می‌باشد که ترپن الکل (ترپنوئید با ساختار الکی) بوده و فعالیت ضدقارچی بالایی دارند [۱۱]. طبق گزارش اتحادیه اروپا استراگول احتمالاً سرطان را است. الکل‌های موجود در اسانس‌ها حلالیت ترپنوئیدهای موجود در اسانس را در آب افزایش می‌دهد. به نظر می‌رسد دلیل اصلی کارآیی پایین اسانس ریحان، ساختار الکی آن است که از طریق ایجاد پیوندهای هیدروژنی با ترکیبات سازنده محیط کشت (PDA) و اجزای سازنده اسانس، غیرفعال می‌گردد. ولی وقتی به شکل بخار به کار می‌رود از طریق تجزیه و دهیدراته کردن پروتئین‌های موجود در ساختمان قارچ اثر خود را به جا گذاشته و کاملاً از رشد قارچ جلوگیری می‌کند. لینالول به میزان ۲/۲۸ درصد در آویشن مورد آزمایش نیز وجود دارد. پژوهش‌های انجام شده در مورد خواص ضد میکروبی ترکیبات شیمیایی نشان داده که فنل‌ها نسبت به الکل‌ها، آلدئیدها و اترها فعالیت ضدقارچی بالایی دارند. برای مثال تیمول موجود در اسانس آویشن که به میزان ۴۶ درصد در اسانس آویشن مورد استفاده در این پژوهش وجود دارد، یک ترکیب فنلی می‌باشد [۳].

ترکیبات فنلی روی غشای سلولی تاثیر گذاشته و در کار آن اختلال ایجاد می‌کنند و در بعضی موارد باعث تغییر در ساختار آن می‌شود که باعث افزایش آماس و نفوذپذیری غشای سیتوپلاسمی در اثر پراکندگی و از دست دادن شیب pH سلولی شده و سبب کاهش سطح ATP و از دست دادن نیروی محرک پروتون و در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود [۱۴]. بیشترین آسیب وارد شده به بافت قارچ به جذب مواد غذایی، سنتز اسیدهای نوکلئیک و فعالیت ATP-ase مربوط می‌شود. گلوکز نقش مهمی در تعادل pH سلول بازی می‌کند و سلول از این ماده به عنوان منبع انرژی برای ATP-ase و پمپ پروتونی H^+ -ATP-ase استفاده می‌کند. غشای سلول اولین هدف ترکیبات طبیعی فرار هست به طوری که شکسته شدن دیواره سلولی در باکتری‌ها و قارچ‌ها توسط ترپن‌ها مشاهده شده است.

خصوصیات چربی دوستی از خواص مهم اسانس‌ها در بازدارندگی از رشد عوامل بیماری‌زا می‌باشد [۲]. به طوری که ویژگی چربی دوستی مونوترپن‌های حلقوی باعث جدا شدن آنها از فاز آبی غشای درون سلول می‌شود. ترکیبات فرار حلقوی با گروه‌های هیدروکسیل فنلی، باندهای هیدروژنی تشکیل داده که جایگاه‌های فعالی آنزیمی عوامل بیماری‌زا را هدف قرار می‌دهند [۱۹]. میزان فعالیت ضدقارچی ترکیبات فنلی بستگی به گروه هیدروکسیل و محل قرار گرفتن آنها روی ساختار فضایی شان دارد [۱۳]. به نظر می‌رسد دلیل کارآیی کم اسانس‌ها در روش ترکیب با محیط کشت نسبت به روش استفاده از دیسک کاغذی این باشد که در روش ترکیب با محیط کشت مقداری از اسانس یا مواد موثره آن در ساختمان محیط کشت PDA به دام افتاده و نمی‌تواند روی قارچ‌ها تاثیر بگذارد یا این که به دلیل واکنش ترکیبات آب دوست موجود در اسانس با آب یا اجزای دیگر تشکیل دهنده محیط کشت می‌باشد که کارآیی اسانس‌ها را کاهش می‌دهد [۱۱]. در هر حال دلیل اصلی اثر بازدارندگی اسانس‌ها از رشد قارچ، ترکیبات معطر موجود در اسانس‌ها می‌باشد که در فضای خالی پتری دیش جمع می‌شوند [۸]. بعضی اسانس‌ها که کارآیی بیشتری در جلوگیری از رشد قارچ دارند، ولی با گذشت زمان



تا نتیجه مطلوب حاصل شود. البته با توجه به این که تیمار میوه‌ها با اسانس‌های گیاهی طعم آنها را تحت تاثیر قرار می‌دهد بنابراین احتمال دارد پذیرش میوه‌هایی که تیمارهای اسانسی روی آنها اعمال شده است از سوی مصرف‌کننده با مشکل مواجه شود ولی باید سعی شود با استفاده از روش‌های مناسب حداقل غلظت از اسانس‌ها استفاده شود تا اثراتی که روی کیفیت میوه می‌گذارد به حداقل برسد. البته تا رسیدن به این امر مهم راه زیادی در پیش است و می‌بایست تحقیقات زیادی انجام شود تا امکان استفاده از اسانس‌های گیاهی در فرمولاسیون‌های مناسب برای هر کدام از محصولات فراهم شود.

قارچ شروع به رشد می‌نماید که این بنا به پیشنهاد زیکا (۱۹۸۸) می‌تواند به این دلیل باشد که ترکیبات معطر از طریق تبخیر در مدت زمان طولانی انکوباسیون ناپدید شده و اجازه رشد مجدد قارچ را می‌دهند [۲۱].

نتیجه‌ای که از این پژوهش می‌توان گرفت این است که اسانس‌های حاصل از گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد قارچ بوتریس موثر هستند و می‌توانند جایگزین مواد شیمیایی مصنوعی در کنترل این قارچ بیماری‌زای مهم شود. به خصوص در روی میوه‌هایی که روی آنها فرآیندی صورت نگرفته و به مصرف مستقیم انسان می‌رسند. علاوه بر این روش اعمال تیمار در اثر بازدارندگی اسانس‌ها در برابر این قارچ خیلی اهمیت دارد و باید بهترین روش اعمال تیمار به کار گرفته شود

منابع

1. Amin G, Sharifabadi AD, Salehi surmaghi MH, Yasa N, Emani M, Shidfar MR, Amin M, Moghadami M, Kordbacheh P and Zeini F. Screening of Iranian plants for antifungal activity: 2004, part 1. Available in: <http://www1.tums.ac.ir/daru/DaruVolume10-No1-2002/Amin1.htm>. Page 1 - 12.
2. Bayrak, A and Akgul A. Composition of Essential oils from Turkish *Salvia* species. *J. Photochem.* 1987; 26 (3): 846 - 7.
3. Cauladis M, Tzakou O, Kujundzic S, Sokovic M and Mimica-dukic N. Chemical analysis and antifungal activity of *Thymus striatus*. *J. Phototherapy Res.* 2004; 18: 40 - 2.
4. Dellacasa AD, Bailac PN and Ponzi MI. *In vitro* activity of essential oils from San Luis-argentina against *ascosphaera apis.*, *J. Essential Oil Res.* 2003; 15: 282 - 5.
5. Kader AA. A perspective on postharvest horticulture (1978 - 2003). *J. Hort. Sci.* 2003; 30 (5): 1004 - 8.
6. Kulakiotu EK, Thanassouloupoulos CC and Sfakiotakis, EM. Biological control of *Botrytis cinerea* by volatiles of *Isabella* grape. *J. Phytopathol.* 2004; 94 (9): 924 - 31.
7. Lanciotti R, Gianotti A, Patrignani F, Belletti N, Guerzoni ME. and Gardini F. Use of natural aroma compounds to improve shelf life and safety of minimally processed fruits. *Trends in Food Sci. & Technol.* 2004; 15: 201 - 8.
8. Noleyan V and Narasimhan P. Antifungal activity of some essential oil components. *Food Microbiol.* 1986; 3 (4): 331 - 6.
9. Oxenham SK, Svoboda KP and Walters DR. Antifungal activity of the Essential Oil of Basil (*Ocimum basilicum*). *J. Phytopathol.* 2005; 153: 174 - 80.
10. Paranagama PA, Abeysekera KHT, Abeywickrama K and Nugaliyadde L. Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.)



- Stapf. (Lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link isolated from stored rice. *J. Letters in Applied Microbiol.* 2003; 37: 86 – 90.
11. Plotto A, Roberts RG, Roberts DD. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Acta Hort.* 2003; 628: 737 - 45.
 12. Rasooli I, Rezaee MB, Moosavi ML and Jaimand K. Microbial sensitivity to and chemical properties of the essential oil of *Artemisia annua* L., *J. Essential Oil Res.* 2003; 15: 59 - 62.
 13. Shekarforoush SS, Nazar AHK, Firuzi R and Rostami M. Effects of storage temperatures and essential oils of oregano and nutmeg on the growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 in barbecued chicken used in Iran. *J. Food Control.* 2007; 18: 1428 - 33.
 14. Simpson T, Bikoba V and Mitcham EJ. Effects acetdehyde on fruit quality and target pest mortality for harvested strawberries. *J. Postharvest. Boil. Technol.* 2003; 28: 405 - 16.
 15. Singh G, Marimuthu P, S de Heluani C and Catalan C. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potential of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *J. Sci. of Food and Agri.* 2005; 85: 2297 - 306.
 16. Tainter DR. Spiced and seasoning. 2nd ed. John Wiley and Sons. New York. 2001, pp: 38 - 81.
 17. Thanaboripat D, Mongkontanawut N, Suvathi Y and Ruangrattanamatee V. Inhibition of aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by Citronella oils. Available in www.kmitl.ac.th/ejkmitl/vol4no1/InhibitionAflatoxin.pdf. 2004.
 18. Velickovic D, Ristic MS, Randjelovic NV, Smelcerovic AA. Chemical composition and antimicrobial characteristic of the essential oils obtained from the Flower, Leaf and Stem of *Salvia officinalis* L. originating from Southeast Serbia., *J. Essential Oil Res.* 2002; 14: 453 - 8.
 19. Wang CY and Buta JG. Maintaining quality of fresh-cut kiwifruit with volatile compounds. *J. Postharvest Biol. Technol.* 2003; 28: 181 - 6.
 20. Wilson CL, Solar JM, El Ghaouth A and Wisniewski ME. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *J. Plant Disease* 1997; 81 (2): 204 - 10.
 21. Zaika LL. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determination. *J. Food Safety* 1988; 9: 97 - 118.



Antifungal Effects of Four Plant Essential Oils on *Botrytis cinerea* in Laboratory Conditions

Asghari Marjanlo A (M.Sc. Student)¹, Mostofi Y (Ph.D.)^{1*}, Heydari M (M.Sc. student)², Javan Nik Khah M (Ph.D.)³, Shoeibi Sh (Ph.D.)⁴

1- Department of Horticultural Science, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

2- Department of Horticultural Science, College of Agriculture & Natural Resources, Islamic Azad University-Karaj Branch, Iran

3- Department of Horticultural Science, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

4- Food and Drug Laboratory Research Center (FDLRC), Deputy for Food and Drug, MOH, Tehran, Iran

*Corresponding author: Postharvest Physiology Lab, Department of Horticultural Science, College of Agriculture and Natural Sciences, University of Tehran, Karaj, Iran

Tel: +98 – 261 – 2248721, Mobile: +98 – 912 – 5010495

Email: ymostofi@ut.ac.ir

Abstract

Background: Essential oils are very complex mixtures of compounds with variety of biological properties

Objective: In the present study, the effect of Cumin (*Cuminum cyminum*), Sage (*Salvia officinalis*), Basil (*Ocimum basilicum*) essential oil at 250, 500, 750 and 1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ and Thyme essential oil at 30, 60, 120, 250 $\mu\text{L.L}^{-1}$ on growth of *Botrytis cinerea* was investigated in *in vitro* condition.

Methods: This experiment was carried out with two different methods: mixing of essential oil with fungal culture medium (SM) and Pisk Diffusion Method (PDM).

Results: The results showed that inhibitory effect of essential oils on fungal growth is related to type and concentration of essential oils and treatment methods. The PDM is more efficient in controlling of *B. cinerea* growth than SM. Cumin, Sage and Basil essential oils inhibited the fungal growth completely in PDM at all applied concentrations. In SM, inhibitory effect was related to applied concentration. Cumin and Thyme essential oils at 250 $\mu\text{L.L}^{-1}$ concentration inhibited the fungal growth, but Basil and Sage oils at the same concentration have no inhibitory effect against *B. cinerea*. The results of MIC (Minimum Inhibitory Concentration) and MLC (Minimum Lethal concentration) showed that essential oils used in this study at all applied concentrations with two different methods were fungi static, except Cumin at 1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ in disk diffusion method that was fungicide.

Conclusion: Essential oils are natural products that have fewer side effects than synthetic pesticides. More research is necessary to replace synthetic pesticides with new formulations of these natural compounds especially for maintaining of the horticultural product quality.

Keywords: Botrytis Fungus, Sage, Cumin, Basil, Thyme

