کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی
دورهٔ ۷، شمارهٔ ۱، بهار و تابستان ۱۳۹۷ (۱۰۷-۱۰۳)
DOI: 10.22059/jbioc.2018.226807.184

فعالیت ضدقارچی عصاره اتانولی بره‌موم علیه چند قارچ بیماریزای پس از برداشت

رباب اعزازی[۱] و مهدی داوری[۲*]
۱. دکترای بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران، کرج.
۲. دانشیار بیماری‌شناسی گیاهی گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل.
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱۱/۱۵ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۶)

چکیده

بره‌موم یکی از فرآورده‌های جانبی با ارزش زنبورعسل می‌باشد که زنبورهای کارگر با جمع‌آوری صمغ گیاهان و مخلوط کردن آن با آنزیم‌های خود، ماده‌ای چسبناک، مومانند و معطر را تولید می‌کنند. برخی خواص بیولوژیکی از قبیل خواص ضدباکتریایی، ضدقارچی و آنتی‌اکسیدانی برای این ماده به اثبات رسیده است. در این پژوهش، فعالیت کنترل کنندگی عصاره اتانولی بره‌موم روی چهار قارچ بیماریزای پس از برداشت گیاهی شامل ***Aspergillus flavus*** (عامل کپک زرد پسته)، ***Botrytis cinerea***، ***A. tubingensis*** و ***Cladosporium cladosporioides*** (قارچ‌های عامل پوسیدگی میوه انگور) بررسی شد. ابتدا عصاره اتانولی بره‌موم در غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به محیط کشت **PDA** افزوده شد. سپس دیسک میسلیومی جوان قارچی در مرکز محیط کشت حاوی عصاره، مایه‌زنی و میزان رشد آنها اندازه‌گیری و میزان درصد بازدارندگی عصاره تعیین شد. نتایج نشان داد که بین گونه‌های قارچی، غلظت‌های عصاره و همچنین برهمکنش بین گونه‌های قارچی و غلظت‌های مختلف آن تفاوت معنی‌داری (**$P\leq0.01$**) وجود دارد. گونه‌های قارچی، میزان حساسیت متفاوتی در مواجهه با غلظت مشخص از عصاره مزبور نشان دادند ولی به‌طور کلی بیشترین درصد بازدارندگی در بیشترین غلظت مورد استفاده مشاهده شد. قارچ‌های ***A. tubengensis*** و ***C. cladosporioides*** به‌ترتیب با ٪۸۰/۸۸ و ٪۷۹/۱۱ بیشترین درصد بازدارندگی از رشد را در غلظت هزار میکروگرم بر لیتر عصاره مزبور نشان دادند. با توجه به نتایج این تحقیق می‌توان گفت که بره‌موم به‌عنوان فرآورده‌ای طبیعی، پتانسیل ضدقارچی دارد و می‌توان پس از تحقیقات تکمیلی از آن برای کنترل‌زیستی بیماری‌های پس از برداشت قارچی بهره برد.

واژه‌های کلیدی: بره‌موم، پوسیدگی میوه انگور، قارچ‌های بیماریزای پس از برداشت، کنترل زیستی.

Antifungal activity of ethanolic extract of propolis (EEP) against some postharvest fungi

Robab Ezazi [1] and Mahdi Davari [2*]
1. Ph.D. of Plant Pathology, University college of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran.
2. Associate Professor, Department of Plant Protection, College of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
(Received: February 3, 2017 - Accepted: January 6, 2018)

ABSTRACT

Propolis, a sticky waxy and aromatic material is a valuable bee-product synethesized by worker bees from plants and mixing it with their enzymes. Various biological properties e.g. antibacterial, antifungal and antioxidant activity had been proven for this substance. In this study, the inhibitory activity of propolis ethanolic extract was studied in vitro against four pathogenic fungi including *Aspergillus flavus* (causal agent of pistachio yellow rot), *Botrytis cinerea*, *A. tubingensis* and *Cladosporium cladosporioides* (causal agents of grape rot). First, the ethanolic extract of propolis was provided and then was added to PDA medium in 50, 100, 250, 500 and 1000 µg/ml. Mycelial disks of fresh fungi cultures were placed in the center of treated medium and the growth rate of fungi was measured to determine the inhibition percent. Results showed that there are significantly different ($P\leq0.01$) among the fungal species, concentrations and interaction between fungal species and concentration. The sensitivity of fungal species was different in contract to specified concentration of the extract, generally the highest inhibition was observed at the highest used concentration. *A. tubengensis* and *C. cladosporioides* showed the highest growth inhibition with 80.88% and 79.11% respectively. The results of this study showed propolis possesses high antifungal potential and it may be used for biological control of plants fungal diseases after further researches.

Keywords: biological control, grape rot, postharvest pathogenic fungi, propolis.

* Corresponding author E-mail: Mdavari@uma.ac.ir

تازه‌های تحقیق

عصاره اتانولی برەموم اثرات ضدقارچی مناسبی دارد. برەموم اثرات بازدارندگی معنی‌داری در مقابل چهار قارچ بیماریزای پس از برداشت انگور و پسته نشان داد.حساسیت گونه‌های مختلف قارچی در مقابل عصاره برەموم متفاوت بود.بیشترین اثر ضدقارچی برەموم روی عامل پوسیدگی میوه انگور *Aspergillus tubengensis* مشاهده گردید. برەموم قابلیت استفاده در کنترل زیستی برخی بیماری‌های قارچی پس از برداشت را دارد (پس از تحقیقات تکمیلی).

مقدمه

برەموم یکی از فرآورده‌های جانبی با ارزش زنبور عسل با منشا گیاهی می‌باشد که از گذشته در طب سنتی کاربرد وسیعی دارد. زنبورهای کارگر با جمع‌آوری صمغ از جوانه‌ها و سایر قسمت‌های گیاهان مختلف و مخلوط کردن آن با آنزیم‌های خود، ماده‌ای چسبناک، صمغ‌مانند و عموما به رنگ سبز زیتونی تولید می‌کنند (Burdock 1998) که از آن برای مسدود کردن شکاف‌های کندو و مومیایی کردن اجساد حشرات مرده در داخل کندو استفاده می‌کنند. برەموم اغلب به‌عنوان سد محافظتی در مقابل میکروارگانیسم‌های بیمارگر به‌کار می‌رود و از این‌رو از آن به‌عنوان سلاح شیمیایی یاد می‌شود (Falcão *et al.* 2010). بنابراین یکی از مهم‌ترین کاربردهای بالقوه برەموم استفاده از آن به‌عنوان ترکیب ضدمیکروبی ایمن علیه میکروارگانیسم‌های زیان‌آور می‌باشد. باوجود برخی مطالعات پیرامون خواص ضدقارچی برە-موم علیه قارچ‌های زیان‌آور (جانوری و گیاهی) در دنیا، این مطالعات در ایران بسیار محدود بوده و فقط چند مورد تحقیق در رابطه با خواص ضدباکتریایی و ضدقارچی آن علیه قارچ‌های بیماریزای انسانی صورت گرفته است.

قارچ‌های عامل پوسیدگی و کپک‌زدگی پس از برداشت، روی گستره وسیعی از محصولات کشاورزی و مواد غذایی رشد نموده و هر ساله، به‌ویژه در کشورهای در حال توسعه، خسارات قابل توجهی را به تولید کنندگان وارد می‌کنند (Bautista-Baños 2014). قارچ‌های متعلق به جنس‌های *Botrytis*، *Aspergillus*، *Rhizopus* و *Penicillium* از مهم‌ترین بیمارگرهای محدود کننده طول عمر پس از برداشت محصولات کشاورزی می باشند و در این بین، گونه‌های مولد زهرابه‌های خطرناک از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار هستند. قارچ *Aspergillus flavus* روی بسیاری از محصولات کشاورزی از جمله پسته و سایر خشکبارها و مواد غذایی رشد نموده و با تولید سم سرطانزای آفلاتوکسین موجب آلودگی آنها می‌شود. *A. tubingensis* به‌عنوان یکی از گونه‌های مولد اکراتوکسین، حبه‌های انگور و کشمش را کلنیزه می‌کند و پوسیدگی کلادوسپوریومی ناشی از *Cladosporium cladosporioides* از شایع‌ترین بیماری‌های انگور در بعضی از مناطق محسوب می‌شود (Briceño and Latorre 2008). قارچ *Botrytis cinerea* نیز عامل ایجاد کپک خاکستری در بسیاری از میوه‌ها از جمله سیب، انگور، گوجه‌فرنگی، کیوی، هلو و توت فرنگی محسوب می‌شود (Romanazzi and Feliziani 2014)

به‌دلیل محدودیت‌هایی که امروزه برای استفاده از سموم شیمیایی به‌ویژه در مورد محصولات انباری اعمال شده است، تحقیقات گسترده‌ای جهت یافتن روش جایگزین و ایمن برای حفاظت محصولات کشاورزی در مقابل عوامل بیماریزا شروع شده است. یکی از این روش‌ها، استفاده از ترکیبات طبیعی با خاصیت ضدمیکروبی مانند کیتوزان، گلوکوسینولات، اسانس‌های گیاهی و برەموم می‌باشد (Packer and Luz 2007).

در این پژوهش، با عنایت به اهمیت پسته و انگور (و کشمش) از نظر صادرات برای کشور و خسارت‌های کمّی و کیفی قارچ‌های بیمارگر به‌ویژه از نظر آلودگی به زهرابه‌های قارچی ناشی از *A. flavus* و *A. tubengensis*، تاثیر عصاره اتانولی برەموم در کنترل بیولوژیک قارچ‌های *B. cinerea*، *A. tubingensis* و *C.*

cladosporioides که مهم‌ترین قارچ‌های بیماریزای پس از برداشت انگور در منطقه مشگین‌شهر استان اردبیل محسوب می‌شوند و همچنین قارچ *A. flavus* عامل کپک زرد و مولد آفلاتوکسین در پسته بررسی شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق، قارچ‌های *B. cinerea* و *C. cladosporioides* که در مطالعات قبلی نگارندگان از میوه‌های انگور در منطقه مشگین‌شهر جداسازی و شناسایی شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند (Davari and Ezazi 2016). جدایه‌ای از قارچ *A. tubingensis* نیز که از انگورهای آلوده آذربایجان‌شرقی جداسازی شده بود (اهدایی از کلکسیون قارچ‌شناسی دانشگاه تبریز)، برای این منظور انتخاب شد. همچنین قارچ *A. flavus* از آزمایشگاه کنترل بیولوژیک دانشگاه تهران دریافت شد. به‌منظور عصاره‌گیری، ابتدا بره‌موم‌های جمع‌آوری شده از کندوهای زنبور عسل استان اردبیل به قطعات ریز خرد شده، سپس سی گرم از آن با یکصد میلی‌لیتر اتانول هشتاد درصد مخلوط و به‌مدت ۴۸ ساعت در دمای ۲۵°C روی شیکر انکوباتور (۱۵۰ دور در دقیقه) تکان داده شد. پس از تبخیر الکل، با استفاده از دستگاه روتاری، عصاره خالص به دست آمد که ده درصد (وزن به حجم) اتانول هشتاد درصد به آن اضافه شده و تا زمان آزمون‌های بیولوژیک در شیشه تیره‌رنگ در دمای ۴°C نگهداری شد. آزمون تعیین حساسیت گونه‌های قارچی نسبت به عصاره بره‌موم با افزودن مقادیر مناسبی از عصاره (برای تهیه غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) به محیط کشت PDA انجام شد (از اتانول به‌عنوان حلال استفاده شد). تشتک‌های پتری حاوی غلظت‌های مختلف عصاره بره‌موم با دیسک‌های میسلیومی از کشت جوان قارچ‌های بیمارگر، مایه‌زنی شده و در دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس تا زمانی که پرگنه قارچ، تشتک پتری شاهد را پر کند، نگهداری شدند. میزان رشد قارچ بر اساس قطر پرگنه به‌طور روزانه اندازه‌گیری و درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف عصاره بر اساس فرمول MGI = (dc-dt)/dc ×100 (قطر پرگنه اندازه‌گیری شده در تیمار =dt؛ قطر پرگنه اندازه‌گیری شده در شاهد =dc) محاسبه شد. آزمایش در سه تکرار انجام شد و در تیمار شاهد از اتانول استفاده شد. تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS (V 16) و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح ۵٪ انجام شد.

نتایج و بحث

تجزیه و تحلیل آماری نتایج به‌دست آمده از تاثیر بیوکنترلی عصاره بره‌موم نشان داد که از نظر میزان بازدارندگی از رشد، بین گونه‌های قارچی، غلظت‌های مختلف این عصاره و همچنین برهمکنش بین گونه‌های قارچی و غلظت‌های مختلف آن تفاوت معنی‌داری ($P\leq0.01$) وجود دارد (جدول ۱). همچنین ملاحظه می‌شود که با افزایش غلظت عصاره، درصد بازدارندگی از رشد قارچ‌های بیمارگر افزایش می‌یابد؛ مقایسه تاثیر این عصاره علیه قارچ‌های مورد بررسی اختلاف آماری معنی‌داری را در سطح احتمال ۹۹ درصد آشکار می‌سازد. همچنین برهمکنش بین گونه‌های قارچی و غلظت‌های مختلف عصاره نیز تفاوت معنی‌داری نشان می‌دهد (جدول ۱) و این به معنای متفاوت بودن میزان حساسیت گونه‌های قارچی در مواجهه با غلظت مشخص از عصاره مزبور می‌باشد (شکل ۱).

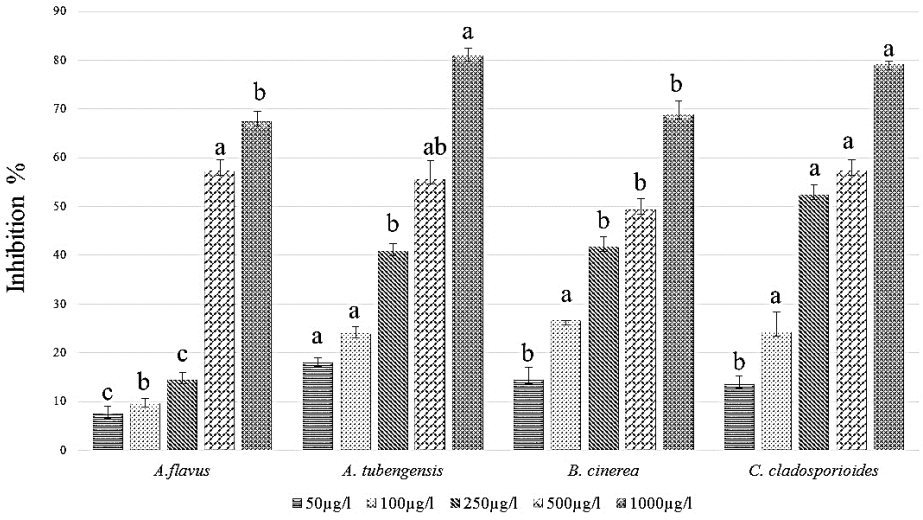
نتایج حاصل از مقایسه میانگین بازدارندگی از رشد چهار قارچ بیماریزای مورد بررسی توسط غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی بره‌موم با استفاده از آزمون توکی نشان داد که قارچ‌های *A. tubengensis* و *C. cladosporioides* به‌ترتیب با ٪۸۰/۸۸ و ٪۷۹/۱۱ بیشترین درصد بازدارندگی از رشد را در غلظت هزار میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره مزبور نشان می‌دهند. البته درصد بازدارندگی از رشد *B. cinerea* (٪۶۸/۸۸) و *A. flavus* (٪۶۷/۵۵) در بیشینه غلظت مورد استفاده این عصاره نیز قابل توجه است (شکل ۱).

جدول ۱- تجزیه واریانس داده‌های حاصل از بررسی قابلیت بیوکنترلی عصاره اتانولی بره‌موم بر قارچ‌های مورد بررسی.

Table 1. Analysis of variance of data resulted from assessment of biocontrol abilities of ethanolic extract of propolis on the fungi.

treatment	source	Df	Mean square
	fungi	3	594.36**
	concentration	4	7330.178**
	concentration× fungi	12	150.583**
Error		40	4.296

**: معنی‌دار در سطح احتمال یک درصد. **: Significant in 1% level.



شکل ۱- درصد بازدارندگی حاصل از کاربرد غلظت‌های مختلف عصاره اتانولی بره‌موم در جلوگیری از رشد چهار قارچ بیماریزا به روش اختلاط با محیط کشت PDA.

حروف غیرمتشابه در هر ستون‌های مشابه بیانگر اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در $p \leq 0.05$ می‌باشد.

Fig 1. The inhibition percent resulted from the application of different concentration of ethanolic extract of propolis against four pathogenic fungi by mixing with PDA media.

Values followed by the different letter within the same column have not significant differences in $P > 0.05$.

مطالعات متعدد نشان داده‌اند که بره‌موم به‌میزان زیادی خاصیت ضدباکتریایی، ضدویروسی و ضدقارچی دارد (Kalogeropoulos *et al*. 2009). تحقیقات زیادی در رابطه با خاصیت ضدقارچی بره‌موم علیه قارچ‌های بیماریزای انسانی از جمله *Candida albicans* (Haghdoost *et al.* 2016) و قارچ‌های درماتوفیت صورت گرفته است. اثرات ضدقارچی بره‌موم علیه برخی قارچ‌های بیماریزای گیاهی مانند *Penicillium italicum* (Yang *et al.* 2011)، *Alternaria alternata*، *Fusarium* sp.، *Botrytis cinerea* (Curifuta *et al.* 2012)، *Aspergillus fumigatus* در کشورهای دیگر به اثبات رسیده است، اما تاکنون پژوهشی در خصوص اثرات بازدارندگی بره‌موم ایرانی روی قارچ‌های بیماریزای گیاهی صورت نگرفته است. در تحقیق حاضر، برای اولین بار، اثرات ضدقارچی این فرآورده طبیعی علیه چهار قارچ عامل بیماری پس از برداشت محصولات کشاورزی شامل کپک زرد پسته (مولد آفلاتوکسین)، کپک خاکستری انگور و بسیاری از محصولات باغی دیگر و عوامل پوسیدگی سیاه انگور و کشمش بررسی و اثبات شد. خواص ضدقارچی بره‌موم به‌طور عمده ناشی از ترکیبات فلاونوئیدی موجود در آن است (Ozan *et al*. 2009). از طرفی نوع حلال مورد استفاده جهت استخراج عصاره بره‌موم در میزان خاصیت ضد میکروبی و ضد قارچی آن نقش

مهمی دارد و مطالعات مختلف نشان می‌دهد که اتانول، حلال مناسبی برای این منظور می‌باشد (Quiroga *et al*. 2006).

نتیجه‌گیری کلی

خسارت‌های ناشی از بیماری‌های قارچی پس از برداشت به لحاظ کاهش کیفیت محصول، تولید زهرابه‌های قارچی خطرناک برای سلامتی و عدم موفقیت در صادرات محصولات کشاورزی، از مشکلات عمده پیش روی گیاهپزشکی در عصر حاضر است. با توجه به نیاز جهانی و تقاضا برای تامین غذای سالم بر اساس استانداردهای بهداشتی، کنترل این بیماری‌ها با استفاده از روش‌های ایمن و غیرشیمیایی امری اجتناب ناپذیر می‌باشد. استفاده از مواد با منشا طبیعی در کنترل بیماری‌های گیاهی به‌عنوان روشی بیولوژیک در چند سال اخیر مطرح گردیده و به‌عنوان روشی مؤثر و در عین حال ایمن، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. این ترکیبات نه تنها فاقد اثرات جانبی بوده بلکه به‌علت خواص آنتی‌اکسیدانی، کیفیت و طول دوره انبارداری میوه‌ها را نیز افزایش می‌دهند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره اتانولی بره‌موم از خاصیت ضدقارچی خوبی برخوردار بوده و می‌تواند به حفاظت از محصولات کشاورزی کمک کند. البته نیاز به انجام مطالعات تکمیلی آزمایشگاهی و میدانی برای به‌کارگیری نتایج پژوهش وجود دارد.

REFERENCES

Bautista-Baños S (2014) Postharvest decay, control strategies. Academic Press. London, UK. 383p.

Briceño EX, Latorre BA (2008) Characterization of *Cladosporium* rot in grapevines, a problem of growing importance in Chile. Plant Disease 92: 1635-1642.Burdock, G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee Propolis (Propolis). Food and Chemical Toxicology 36: 347-63.

Curifuta M, Vidal J, Sánchez J, Contreras A, Salazar LA, Alvear M (2012) The *in vitro* antifungal evaluation of a commercial extract of Chilean propolis against six fungi of agricultural importance. Ciencia e investigación agraria 39(2): 347-359.

Davari M, Ezazi R (2016) Study on the effects of four medicinal plant essential oils and two *Trichoderma* species on biocontrol of grape fruit rot fungi. Biological Control of Pests and Plant Diseases 5 (1): 1-12. (In Persian).

Haghdoost NS, Salehi TZ, Khosravi A, Sharifzadeh A (2016) Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of Candida albicans. Journal de Mycologie Médicale 26: 298-305.

Falcão SI, Vilas-Boas M, Estevinho LM, Barros C, Domingues MR, Cardoso S (2010) Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. Analytical and Bioanalytical Chemistry 396: 887-897.

Khodaei A, Arzanlou M, Babai-Ahari A, Darvishi F (2014) Identification of black Aspergilli species on grape and raisin in Southern regions of East and West Azerbaijan Provinces. Applied Researches in Plant Protection 3(1): 49-64. (In Persian with English abstract).

Packer JF, Luz MMS (2007) Evaluation and research method for natural products inhibitory activity. Revista Brasileira de Farmacognosia 17(1): 102-7.

Quiroga EN, Sampietro DA, Soberon JR, Sgariglia MA, Vattuone MA (2006) Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. Letters in Applied Microbiology 101: 103-10.

Romanazzi G, Feliziani E (2014) *Botrytis cinerea* (Gray Mold). Pp: 131-146. In: Postharvest Decay Control Strategies. Ed., Bautista-Baños, S. Academic Press.

Yang SZ, Peng LT, Su XJ, Chen F, Cheng YJ, Fan G, Pan SY (2011) Bioassay-guided isolation and identification of antifungal components from propolis against *Penicillium italicum*. Food Chemistry 127: 210-215.