

УДК 634.334

**НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ ЗАЩИТЫ ПЛОДОВ ЛИМОНА ПРИ ХРАНЕНИИ С ЭФИРНЫМИ
МАСЛАМИ МЕТОДОМ IN VITRO**

Салимзода А.Ф. – д.с.-х.н., профессор, член-корреспондент ТАСХН, Джурахонзода Р.Дж - докторант
PhD,

ТАУ им. Ш. Шотемур

Ключевые слова: мята, лаванда, базилик, эфирное масло, *Penicillium digitatum*, *in vitro*.

ВВЕДЕНИЕ

Овощи и фрукты имеют особое пищевое значение для человека, благодаря поступлению в организм витаминов, минералов, клетчатки, другими словами - фитонутриентов, легко усваиваемых организмом, поэтому большое значение имеют исследования, направленные на их длительное хранение без потери питательных свойств (Porat et al., 2018). Физиологические и патологические расстройства лимонов являются основными причинами потери качества на стадиях послеуборки, что приводит к высоким экономическим потерям, вызываемым видами *Penicillium*, *Penicillium italicum*, который ответственен за голубую гниль, и *Penicillium digitatum*, вызывающими зеленую гниль (Pérez-Alfonso et al., 2012), (Heet et al., 2011).

В связи с озабоченностью потребителей по поводу использования синтетических консервантов, в последние годы, все чаще проводятся исследования по вопросам эксплуатации органических соединений, обладающих меньшей токсичностью для потребителей и окружающей среды (Romanazzi et al., 2016). Инновации в этой области могут быть сосредоточены на трех категориях лечения: (1) биоконтрольные агенты в виде дрожжей и бактерий (Perez et al., 2017), (Ferraz et al., 2016), (Sperandio et al., 2015); (2) Использование эфирных масел (ЭМ) тимьяна, мяты, лемонграсса, Melissa, орегано, смачных (Sivakumar and Bautista-Baños., 2014), (Simas et al., 2017), (Elshafie et al., 2015), (Acevedo-Fani et al., 2017); и (3) физические методы, такие как фумигация, диоксидом серы, использование озона, холод (Romanazzi et al., 2016) (Uzal et al., 2016), (Regnier et al., 2014), (Simas et al., 2017).

Целью данного исследования было (1) оценить эффективность эфирного масла мяты *Mentha piperita*, (ЭММ), эфирного масла базилика *Ocimum basilicum*, (ЭМБ) и эфирного масла лаванды, *Lavandula angustifolia*, (ЭМЛ) для противогрибковой эффективности- *in vitro* тест (2) для проверки противогрибкового эффекта, направленного на снижение грибкового распада в плодах лимона искусственной прививки *P. digitatum*, на основе эфирных свойств улетучивания масла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительные материалы, извлечение ЭМ, и анализ газовой хроматографии/массового спектрометрии (GC/MS)

Исследование проводилось с апреля по август 2018 года в Университете сельскохозяйственных наук и ветеринарной медицины Банат (Румыния). Свежие растительные материалы мяты (*Mentha piperita*), лаванды (*Lavandula angustifolia*) и базилика (*Ocimum basilicum*), принадлежащие семейству Яснотковые, были собраны с экспериментальных полей кафедры «Ароматических растений» факультета «Сельскохозяйственного» г. Тимишоара. Растения собирались в стадии полного цветения (июнь-июль), в солнечные дни с умеренным дефицитом воды, когда содержание эфирного масла является самым высоким (Calo et al., 2015). Образцы растений очищали, сушили в тени, измельчали, а затем хранили в темноте до использования, для извлечения эфирного масла. Для этого применяли метод гидродистилляции с помощью аппарата Clevenger с использованием 300 г средней пробы для сбора эфирного масла.

Химическая характеристика ЭМ проводилась с использованием газохроматографического оборудования с масс-спектрометром (GS/MS) Shimadzu QP 2010 Plus с капиллярной колонкой с характеристиками: AT WAX 30 м X 0,32 мм X 1 мкм). В качестве газа-носителя использовался гелий со скоростью потока 1 мл / мин. Программа, используемая для разделения соединений: 40° C в течение 1 мин, скорость от 5° C / мин до 210° C в течение 5 мин. Температура инжектора и ионного источника составляла 250° C и 220° C, соответственно. Объем инъекции составил 1 мкл при соотношении 1: 50. База данных NIST использовалась для идентификации летучих соединений.

Тестирование эфирных масел на противогрибковую эффективность-анализ *in vitro*

Гриб, используемый в анализе, был выделен из испорченного лимона на среде MEA (SIGMA) и идентифицирован морфологическими и культурными признаками (Pitt and Hocking, 2009) как *Penicillium digitatum*. Грибной изолят, отмеченный как Pd_0318_L, был введен в коллекцию микробных культур кафедры «Сельскохозяйственной микробиологии» факультета «Садоводства и лесоводства» г. Тимишоара (Румыния). Для проверки противогрибковой эффективности ЭМ две круглые мицелиевые пробки (8 мм Ø) собирали из молодой культуры *P. digitatum* и прививали на твердую среду CYA (Чапек дрожжевой экстракт агар), около 20 мл на чашку Петри (Ø=100 мм). Для того, чтобы создать атмосферу, обогащенную эфирным маслом в крышке Петри, стерильный диск фильтровальной бумаги был прикреплен, в который было добавлено количество испытанного эфирного масла. Варианты были: 0.0 (контроль), 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 мкл каждого ЭММ, ЭМБ и ЭМЛ. Согласно расчету:

$$VHS = VPD - VM \quad [1]$$

Где,

VHS- пространство чашки Петри с парами ЭМ VPD-
объем чашки Петри (70 см³)

VM-объем среды на чашке Петри (20 см³)

Это означает, что 50 см³ воздуха на чашку Петри было обогащено парами эфирных масел, в результате чего были получены следующие концентрации: 0.001%, 0.002%, 0.003%, 0.004, 0.005%, 0.006%, 0.007%, 0.008%, действительным

для каждого ЭМ.

Исследование выполнено в двух экземплярах. Для предотвращения выхода летучих соединений пластины герметизировали скотчем. Через 5 дней были взяты два перпендикулярных диаметра мицелия роста, поэтому у нас был средний (AD). Формула для расчета новых поверхностей выращивания мицелия (NMG):

$$NMG = [(AD^2 * 3,14 / 4) - AFI] / 100 \quad [2]$$

Где NMG - новый рост мицелия (см²);

AD - среднее двух перпендикулярных диаметров грибковой колонии (мм²); AFI - круглая пробковая область грибных инокулятов (50,24мм²);

РЕЗУЛЬТАТЫ

In vitro анализ паров ЭММ, ЭМБ и ЭМЛ на противогрибковые свойства

Наличие эфирного масла паров со свойствами улетучивания установлено ингибирование роста мицелия *P. digitatum*. Использованные в опыте количества ЭМ обеспечили обогащение атмосферы чашки Петри на 50 см³ воздуха по формуле [1]. От первого количества испытанных масел (50 мкл) при обогащении воздуха парами ЭМ наблюдалось снижение значения NMG, но только в случае ЭМБ и ЭМЛ (диаграмма 1). control 50 100 150 200 250 300 350 400

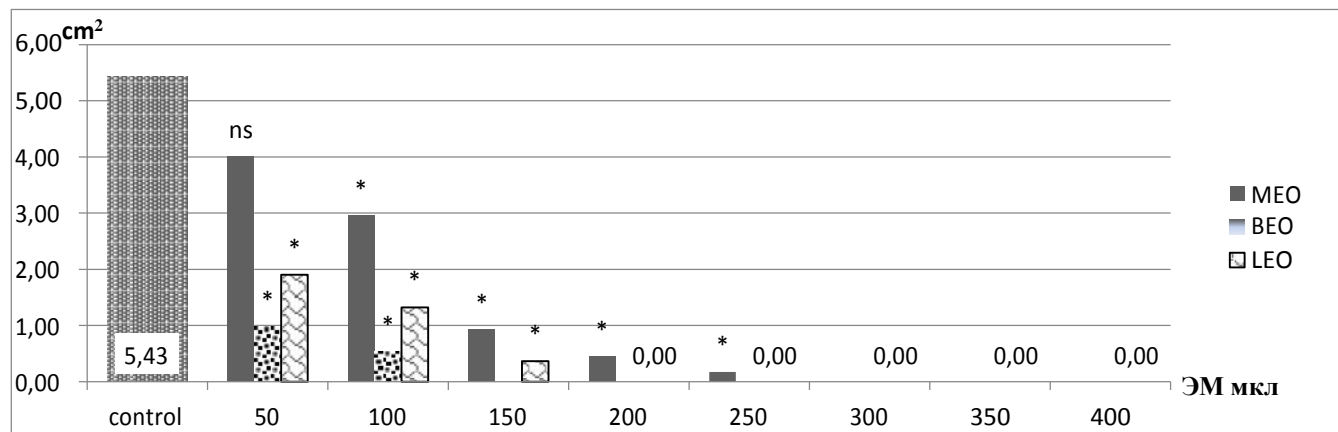


Диаграмма 1.- Рост нового мицелия *P. digitatum* при увеличении атмосферы с парами ЭМ, in vitro”.

ЭММ - Эфирное масло мяты; ЭМБ - эфирное масло базилика; ЭМЛ - эфирное масло лаванда; * со статистическими различиями по сравнению с контролем для P=0,5; НС - без статистической семнификации.

Таблица 1. Значения фунгистатических и фунгицидных концентраций масел, используемых для обогащения атмосферы парами ЭМ - исследование in vitro

Образец	Эффект	ЭМ (мкл)							
		50	100	150	200	250	300	350	400
ЭММ	MFsC ^a	+	+	+	+	+	-	-	-
	MFdC ^b						+	+	+
ЭМБ	MFsC ^a	+	+	-	-	-	-	-	-
	MFdC ^b			+	+	+	+	-	-
ЭМЛ	MFsC ^a	+	+	+	-	-	-	-	-
	MFdC ^b				+	+	+	-	-

^aминимальную концентрацию с эффектом фунгистатическое; ^bминимальные концентрации с фунгицидным действием;

Пары ЭММ в этом количестве ингибировали также рост мицелия, но различия, связанные с контролем, статистически не гарантированы. От 300мкл ЭММ добавил грибковый рост *P. digitatum* будет нул, поэтому эта концентрация подобна от используемых количества ЭМ.

ДИСКУССИЯ

Исследования, проведенные до настоящего времени, показали, что комплексная изменчивость ЭМ обусловлена как генетическим потенциалом растения, так и климатическими условиями, и условиями питания, которые способствуют синтезу в растении большого количества летучих жирных соединений (Fejér et al., 2017), (Opofrei et al., 2018), (Dambolena et al., 2010), (Sifola и Barbieri., 2006). Кроме того, время сбора урожая и способ хранения ароматических растений очень важны для качества ЭМ (Rusetal., 2015).

Эфирные масла, используемые в эксперименте, имеют широкий спектр составляющих, как качественно, так и количественно. Таким образом, противогрибковый потенциал ЭМБ обусловлен присутствием спиртовых соединений линалоола 41,49% и эстрагола 49,94% (аналогично метилхавиколу), что также доказало противогрибковую активность. Кроме того, эстрагол из ЭМБ, известный как метил чавикол, является основным нетерпеноидным соединением (49,904%), которое также обладает противогрибковой активностью (Oxenham et al., 2005). Свое присутствие в высокой пропорции, над значением линалоол, включает базилик, используемый в исследовании в хемотип эстрагола.

Что касается влияния паров ЭМ на рост *Penicillium digitatum* - in vitro, было обнаружено, что ЭМБ является наиболее эффективным маслом, потому что: (1) имеет самое низкое значение IC50, (2) значение MFsC достигается

при 150 мкл, и (3) до 300 мкл ЭМБ имеет фунгицидное значение. В соответствии с (Yahyazadeh et al., 2008), минимальное количество эфирного масла, для которого не был зарегистрирован рост мицелия, считается фунгистатическим эффектом (MFsC).

ВЫВОД

Благодаря улетучивающимся свойствам, эфирные масла представляют собой естественный способ с высоким потенциалом для использования в сохранении или хранении экологически чистых фруктов и овощей. Синергизм природных масляных соединений обеспечивает их эффективность при противогрибковом действии. Кроме того, показатели качества и подлинности ЭМ имеют важное значение для обеспечения противомикробной защиты, связанной с грибковым разложением при послеуборочном хранении садоводческой продукции.

Литература

1. Acevedo-Fani A., Soliva-Fortuny R., Martín-Belloso O., 2017. Nanoemulsions as edible coatings. *Curr. Opin. Food Sci.* 15, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.06.002>
2. Dambolena J.S., Zunino M.P., López A.G., Rubinstein H.R., Zygadlo J.A., Mwangi J.W., Thoithi G.N., Kibwage I.O., Mwalukumbi J.M., Kariuki S.T., 2010. Essential oils composition of *Ocimum basilicum* L. and *Ocimum gratissimum* L. from Kenya and their inhibitory effects on growth and fumonisin production by *Fusarium verticillioides*. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 11, 410–414. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2009.08.005>
3. Elshafie H.S., Mancini E., Camele I., Martino L. De, De Feo V., 2015. In vivo antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. *Ind. Crops Prod.* 66, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.12.031>
4. Fejér J., Grul'ová D., De Feo V., 2017. Biomass production and essential oil in a new bred cultivar of peppermint (*Mentha × piperita* L.). *Ind. Crops Prod.* <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.034>
5. Ferraz L.P., Cunha T., da Silva A.C., Kupper K.C., 2016. Biocontrol ability and putative mode of action of yeasts against *Geotrichum citri-aurantii* in citrus fruit. *Microbiol. Res.* 188–189, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2016.04.012>
6. He L., Liu Y., Mustapha A., Lin M., 2011. Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*. *Microbiol. Res.* 166, 207–15. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2010.03.003>
7. Onofrei V., Benchennouf A., Jancheva M., Loupassaki S., Ouaret W., Burducea M., Lobiuc A., Teliban G.C., Robu T., 2018. Ecological foliar fertilization effects on essential oil composition of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) cultivated in a field system. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.05.021>
8. Oxenham S.K., Svoboda K.P., Walters D.R., 2005. Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). *J. Phytopathol.* <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2005.00952.x>

АННОТАЦИЯ

НОВЫЕ ПЕРСПЕКТИВЫ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ ЗАЩИТЫ ПЛОДОВ ЛИМОНА ПРИ ХРАНЕНИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭФИРНЫХ МАСЕЛ МЕТОДОМ IN VITRO

В данной статье представлены противогрибковые свойства трех эфирных масел *Mentha piperita*, *Lavandula angustifolia* и *Ocimum basilicum* против роста *Penicillium digitatum*. Результаты показали, что все эфирные масла ингибировали рост мицелия и плодоношение грибов в in vitro тест, причем наибольшую эффективность показал *Ocimum basilicum*.

Ключевые слова: мята, лаванда, базилик, эфирное масло, GC/MS анализ, *Penicillium digitatum*, противогрибковое действие.

АННОТАЦИЯ

ПЕШОМАДИ НАВОИД БА ҲИФЗИ ЗИДДИЗАНБҮРУҒИИ ЛИМУ ҲАНГОМИ НИГОҲДОРӢ БО ИСТИФОДА АЗ РАВҒАНИ ЭФИРӢ ДАРШАРОИТИ IN VITRO

Дар мақола иқтидори зиддизанбӯруғии равғанҳои эфирӣ аз *Mentha piperita*, *Lavandula angustifolia* ва *Ocimum basilicum* бар муқобили афзоиши *Penicillium digitatum* мавриди таҳқиқоти илмӣ қарор дода шудааст. Ҷи тавре ки аз натиҷаи ба даст омада маълум гардид, равғанҳои эфирӣ афзоиши занбӯруғро дар намуди таҳқиқоти in vitro бо натиҷаи баланди *O. basilicum* ба таъхир гузошт.

Калидвожаҳо: нӯдина, лаванда, райҳон, равғани эфирӣ, таҳқиқи GC/MS, *Penicillium digitatum*, хусусияти зиддизанбӯруғӣ.

ANNOTATION

NEW PERSPECTIVES IN ANTIFUNGAL PROTECTION OF LEMON FRUITS IN STORAGE USING ESSENTIAL OILS BY IN VITRO METHOD

This article presents the antifungal capacities of three essential oils from *Mentha piperita*, *Lavandula angustifolia* and *Ocimum basilicum* against *Penicillium digitatum* growth. The results showed that all essential oils inhibited the mycelial growth and fungal fructification in vitro test, with the highest efficacy displayed by *Ocimum basilicum*.

Keywords: mint, lavender, basil, essential oil, GC/M Sanalysis, *Penicillium digitatum*, antifungal effect'