Archive of SID

نشریه دانش کشاورزی و تولید پایدار/ جلد ۲۹ شماره ۳ / پاییز ۱۳۹۸

فعالیت ضد قارچی اسانس زیره سبز و رزماری در گندم آلوده به قارچ *Bipolaris sorokiniana*

نیر محمدخانی[1*]، علی یکتا[2]

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۶

۱- استادیار مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه بنیاد ملی نخبگان
۲- فارغ التحصیل کارشناسی گیاهان دارویی، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه
* مسئول مکاتبه: Email: n.mohammadkhani@urmia.ac.ir

چکیده

پوسیدگی معمول ریشه ناشی از قارچ *Bipolaris sorokiniana*، یکی از مهم‌ترین بیماری های گندم می باشد که با توجه به خاک زی بودن این بیماری، به وسیله کنترل شیمیایی به راحتی خنثی نمی‌شود. در این تحقیق اثر اسانس زیره سبز، رزماری و اسانس ترکیبی این دو گیاه بر رشد گندم تحت تنش بیماری القا شده با قارچ *Bipolaris sorokiniana* مطالعه شد. اسانس بسیاری از گیاهان دارای اثرات ضد قارچی هستند. جهت استحصال اسانس از روش تقطیر با آب توسط کلونجر استفاده شد و پس از به دست آوردن اسانس، جداسازی ترکیبات توسط کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی (GC-MS) نشان داد که بیشترین ماده تشکیل دهنده اسانس زیره 3-Caren-10-al (٪ ۲۷/۱۳)، برای رزماری 1R-à-Pinene (۱٤/۸۲٪) و همچنین 3-Caren-10-al (٪ ۱۲) بیشترین ماده تشکیل دهنده اسانس زیره و رزماری در ترکیب باهم می باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اسانس ترکیبی زیره سبز و رزماری بیشترین تأثیر را در جلوگیری از کاهش طول ریشه، وزن خشک ریشه، سطح برگ و کاهش رشد قارچ داشت. البته اسانس زیره سبز اثر معنی‌داری در حفظ وزن تر و خشک شاخساره و همچنین محتوای آب نسبی برگ تحت تنش بیماری داشت. همبستگی مثبت معنی داری ($P <$ ۰/۰۵) بین فاکتورهای رشدی مختلف مشاهده شد.

واژه های کلیدی: اسانس، بیماری، ضد قارچ، رزماری، قارچ *Bipolaris sorokiniana*، گندم

www.SID.ir

Archive of SID

Antifungal Activity of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* Essential Oils on wheat infected by *Bipolaris sorokiniana*

Nayer Mohammadkhani[1*], Ali Yekta[2]

Received: October 18, 2018 Accepted: February 25, 2019

1-Assis. Prof., Shahid Bakeri High Education Center of Miandoab, Urmia University, and National Elites Foundation, Iran.
2-Graduated BSc Student, Shahid Bakeri High Education Center of Miandoab, Urmia University, Iran.
*Corresponding Author: n.mohammadkhani@urmia.ac.ir

Abstract

Common root rot, induced by *Bipolaris sorokiniana* fungi is one of the most important diseases in wheat, which due to terrestrial of this disease, is not easily neutralized by the chemical control. In this study the effects of cumin, rosemary and combined essential oil of both plants on growth of wheat plant under disease stress induced by *Bipolaris sorokiniana* was evaluated. Essential oil extraction was performed by hydro distillation method with Clevenger. After obtaining essential oil, the compounds were separated by mass spectrometry – chromatography (GC-MS), which the major component of the essential oil of cumin was 3-caren-10-al (13.27%), for rosemary was 1R-à-Pinene (14.82%), as well as 3-caren-10-al (12%) was the major essential oil of combine with each other. The results of present study showed that the combined essential oil of cumin and rosemary had the highest effect in prevention of decrease in root length, root dry weight, leaf area and decrease in fungal growth. However, essential oil of cumin had a significant effect in protection of shoot dry weight as well as relative water content (RWC) of leaves under disease stress. There was a significant positive correlation ($P<0.05$) between studied growth parameters.

Keywords: Antifungi, Disease, Essential Oil, *Bipolaris sorokiniana*, Rosmary, Wheat

مقدمه

با وجود اهمیت اقتصادی و نیاز تغذیه‌ای زیاد جمعیت در حال رشد جهان به غلات، گندم و جو به عنوان یکی از منابع اصلی تامین انرژی، کاهش خسارت ایجاد شده توسط بیمارگرهای گیاهی در تولید این محصولات زراعی به افزایش بازده تولید منجر می‌شود (بوکوس و همکاران ۲۰۱۰). با ازدیاد جمعیت، نیاز غذایی بشر افزایش می‌یابد و با توجه به محدودیت سطح زیر کشت، افزایش عملکرد محصول در واحد سطح ضروری می‌باشد. یکی از عوامل کاهش عملکرد محصول آفات و بیماری‌ها می باشند که در این میان بیماری های قارچی از اهمیت خاصی برخوردارند. بیماری پوسیدگی معمولی ریشه ناشی از *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker از جمله بیماری‌های مهم گندم و جو می-باشد (بوکوس و همکاران ۲۰۱۰). کنترل شیمیایی بیماری‌هایی که توسط قارچ‌های خاکزی از جمله بیماری پوسیدگی معمولی ریشه ایجاد می‌شود مشکل و گاهی بی تاثیر است، از سوی دیگر کنترل شیمیایی مستلزم هزینه

www.SID.ir

Archive of SID

زیاد بوده و باعث برهم خوردن تنوع میکروبی خاک و تخریب زیست محیطی می‌گردد (اگریوس ۲۰۰۵). در اکثر موارد به علت مشکلات زیست محیطی بازمانده‌های سموم، ایجاد سمیت برای انسان، ایجاد نژادهای مقاوم و در برخی موارد هزینه‌های بسیار بالا، مصرف این گونه ترکیبات با محدودیت مواجه است (اگریوس ۲۰۰۵). با توجه به نیاز جهانی و تقاضا برای تامین غذای کافی و به منظور کاهش مصرف سموم شیمیایی، تحقیقات گسترده ای آغاز گردیده که نشان می‌دهد برخی متابولیت‌های ثانویه گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد قارچ ها مؤثر بوده و جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی هستند (هادیان و همکاران ۲۰۰۸).

اسانس‌ها مخلوطی از ترکیبات روغنی فرار بوده که به عنوان متابولیت ثانویه در گیاهان دارویی ساخته می شوند (بکالی و همکاران ۲۰۰۸). آنها با دو یا سه ترکیب اصلی در غلظت های نسبتاً بالا (٪۷۰-۲۰) در مقایسه با اجزای دیگری که در مقادیر ناچیز موجود هستند، توصیف می‌شوند. به طور کلی این اجزای اصلی، خواص زیستی اسانس‌ها را تعیین می‌کنند. اسانس ها یا تعدادی از اجزای سازنده آنها در واقع در مقابل واریته‌های گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها شامل باکتری‌ها، ویروس‌ها و قارچ‌ها مؤثر هستند (بکالی و همکاران ۲۰۰۸). خاصیت ضد قارچی برخی گیاهان دارویی از جمله دارچین، پونه کوهی، رزماری، مریم گلی، میخک، فلفل، ریحان، آویشن، مرزه، زیره، لیمو و نعناع در تحقیقات متعددی گزارش شده است. تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی به اجزاء تشکیل دهنده آنها بستگی دارد. یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضد قارچی اسانس را تشدید کنند (هادیان و همکاران ۲۰۰۸).

گندم در ایران مهم‌ترین محصول راهبردی بوده که بیشترین سطح زیر کشت و میزان مصرف را به خود اختصاص داده است (آقه میری و همکاران ۲۰۱٤). طی بازدید های دو ساله از مناطق شمالی کشور بیماری لکه سوختگی با شدت بالا و بصورت همه گیر در اکثر مناطق گندم مشاهده شده است. بیماری لکه سوختگی با عامل *B. sorokiniana* از جمله بیماری های پوسیدگی ریشه و طوقه گندم است و در سال های اخیر در بیشتر نقاط کشور گزارش شده است (آقه میری و همکاران ۲۰۱٤). لکه سوختگی در بسیاری از مناطق مورد کاشت گندم در جهان نیز وجود داشته و موجب کاهش محصول و عمکرد می شود. در سالهای اخیر وسعت آلودگی مزارع کشت گندم به این بیماری در جهان به حدود ۲۵ میلیون هکتار می‌رسد (کومار و همکاران ۲۰۰۲). این قارچ روی گندم، جو، یولاف، چاودار، برنج و تعداد زیادی از گراس ها ایجاد پوسیدگی طوقه و ریشه می کند. عامل پوسیدگی معمولی ریشه، لکه قهوه ای برگ، سوختگی خوشه و سیاه شدن دانه های گندم و جو می‌باشد. رطوبت نسبی و درجه حرارت بالا باعث شیوع این بیماری بخصوص در مناطق جنوب آسیا که در آنجا سیستم متراکم آبی گندم ـ برنج وجود دارد، می شود (کومار و همکاران ۲۰۰۲).

زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) یک گیاه یک ساله و گلدار از تیره چتریان (Apiaceae) می باشد که در مناطق خشک و نیمه خشک رشد می کند و کشت می شود. همچنین حدود ٦/٤٤ درصد سطح زیر کشت گیاهان دارویی کشور مربوط به دو گونه زعفران *Crocus sativus* L.) و زیره سبز می‌باشد. دانه های زیره سبز از قدیم در طب سنتی ایران به عنوان داروی ضد تهوع، ضد اسپاسم و ضد آسم استفاده می شد (اسماعیلی ۲۰۱۵). فعالیت های دارویی متعددی برای زیره سبز مانند اثر پایین آورندگی قند خون، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی، ضد قارچی، مقوی معده، افزایش ترشح شیر، مهار تجمع پلاکت خون و افزایش فعالیت استروژنی ذکر شده است. مطالعات شیمیایی بر روی زیره سبز مبین وجود اجزایی همانند کومینول، کارون، اپی ژین و لوتئولین می باشد (راموس و همکاران ۱۹۹۵).

www.SID.ir

Archive of SID

رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) از تیره نعناعیان (Lamiaceae) یکی از گیاهان حاوی اسانس است که در بسیاری از مناطق جهان به عنوان گیاه دارویی و زینتی پرورش داده می شود. رزماری در برگ ها و سرشاخه های گل دار خود دارای اسانس های فرار می باشد که شامل استرهایی مانند بورنئول، استات، لینالول، کامفور، کامفته و سیئول همچنین شامل فلاونوئید هایی مانند دیوسمین، اپیژنین و غیره و همچنین دارای دی ترپن هایی مانند کارنوسیلیک اسید و تری ترپن هایی مثل اورسولیک اسید و اولئانیک اسید می باشد. در دو تحقیق متفاوت تأثیر مقادیر مختلف اسانس بر میزان رشد باکتری *Staphylococcus aureus* Rosenbach معنی دار بود و با افزایش غلظت اسانس میزان رشد باکتری کاهش یافت (عزیزخانی و همکاران ۲۰۱٤).

با توجه به اندک بودن مطالعات انجام شده و نبود درمان قطعی برای خنثی سازی قارچ *B. sorokiniana* هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر اسانس گیاهی رزماری و زیره و همچنین ترکیب رزماری – زیره در کاهش فعالیت قارچ *B. sorokiniana* می باشد.

مواد و روش ها

قارچ عامل بیماری

برای جداسازی اولیه جدایه‌های قارچ *B. sorokiniana* از محیط کشت PDA (سیب زمینی–دکستروز–آگار) و آب آگار استفاده شد. جهت تهیه سوسپانسیون اسپور، جدایه‌های *B. sorokiniana* به محیط کشت PDA و دمای ۲۵°C و شرایط نوری متناوب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) به مدت دو هفته منتقل شد. اسپورها با آب مقطر سترون از سطح محیط کشت شسته شده و غلظت آن‌ها در ۱×۱۰^{۵} کنیدی در هر میلی‌لیتر از آب مقطر سترون با استفاده از لام هماسیتومتر تنظیم شد.

اسانس گیری

به منظور ارزیابی فعالیت ضد قارچی اسانس ها، بذر گیاه زیره سبز، برگ گیاه رزماری و ترکیب برابر زیره ـ رزماری توسط کلونجر (تقطیر با آب) استخراج شد. به منظور استخراج اسانس، دانه‌های زیره و برگ های خشک گیاه رزماری آسیاب و با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت اسانس آن به روش تقطیر توسط آب استخراج گردید و پس از آبگیری در ظرف های شیشه ای تیره در دمای ٤ درجه سانتی گراد تا محلول پاشی روی گیاهان نگهداری شد.

آزمایش های گلخانه ای

بذور سالم گندم بعد از ضدعفونی سطحی در گلدان-های پلاستیکی کاشته شد. در هر گلدان ۱۰ بذر کاشته شده و مراقبت‌های لازم تا رسیدن آن‌ها به مرحله ۲ برگی انجام شد. و عمل مایه‌زنی کنیدیوم های قارچ روی برگ-ها به صورت آب پاشی درمرحله‌ی ۲ برگی گیاهان گندم انجام شد. بعد ازخشک شدن سطح برگ‌ها، اسانس‌های گیاهی با غلظت های صفر، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر به صورت آب پاش روی برگ‌ها محلول پاشی شد. سپس گیاهان مایه‌زنی شده توسط کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شده و به مدت ٤۸ ساعت در دمای $۲۵\pm۲^{\circ}C$ درون گلخانه نگهداری شدند. کیسه‌های پلاستیکی بعد از ٤۸ ساعت از روی گیاهان برداشته شد و در دمای $۲۵\pm۲^{\circ}C$ و رطوبت نسبی بیش از ۷۵ درصد قرار گرفتند. بعد از ۱۰ روز از مایه زنی، تعداد لکه‌های بیماری روی برگ‌ها در واحد سطح ثبت شد.

آنالیزهای رشدی

پس از برداشت گیاهان، ویژگی های رشدی مثل طول و وزن خشک ریشه و اندام هوایی در گیاهان شاهد، تحت تیمار بیماری و تحت تیمار همزمان بیماری و اسانس مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین سطح برگ با نرم افزار

www.SID.ir

Archive of SID

Compueye (بکر ۲۰۰۵) و محتوای نسبی آب با رابطه $RWC = \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تر})}{(\text{وزن خشک} - \text{وزن آماس})} \times ۱۰۰$ تعیین شد.

بررسی خواص ضد قارچی اسانس ها

اثر ضد قارچی اسانس های استخراج شده روی قارچ *B. sorokiniana* به روش اختلاط اسانس با محیط کشت بررسی شد. به این منظور برای کشت قارچ مورد نظر از محیط کشت PDA (سیب زمینی- دکستروز- آگار) استفاده شد. غلظت‌های شاهد، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام اسانس در لیتر محیط کشت، به پتری‌دیش‌های حاوی محیط کشت PDA اضافه و به هم زده شده تا امولسیون یکنواخت به‌وجود آید و اجازه داده شد تا محیط جامد گردد. سپس دیسک‌های قارچی به قطر ۵ میلی‌متر توسط چوب پنبه سوراخ کن که قبلا استریل شده از کشت‌های جوان قارچ مذکور تهیه شده و هر کدام در وسط پتری-دیش‌های حاوی مواد غذایی قرار داده شد. سپس پتری-دیش‌ها در شرایط تاریکی کامل و در دمای ۲۴ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. رویشی هاله هر قارچ به طور روزانه و تا زمانی که سطح محیط کشت پتری‌های شاهد توسط قارچ بطور کامل اشغال شود اندازه‌گیری گردید. درصد بازدارندگی غلظت های مختلف اسانس‌ها با بهره-گیری از رابطه زیر تعیین شد (آبوت ۱۹۲۵):

IP[1]: درصد بازدارندگی

C[2]: میانگین قطر هاله قارچ در تیمار شاهد

T[3]: میانگین قطر هاله قارچ در تیمار مورد نظر

شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

آنالیز GC/MS با دستگاه کروماتوگراف گازی Thermo Finnigan که با سیستم مس اسپکترومتری (model GC TRACE; TRACE MS plus) جفت شده بود، انجام شد. ستون غیر قطبی HP-5MS (30 m X 0.250 mm, 0.25 µm film thickness) استفاده شد. پروفیل دمایی به صورت زیر بود: ابتدا دما به مدت ۲ دقیقه روی 40°C تنظیم شد و سپس تا 160°C با سرعت 3°C/min افزایش یافت و در نهایت دما با سرعت 5°C/min به 280°C افزایش یافت و ۲ دقیقه در این دما ماند. گاز حامل هلیم و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود و انرژی یونیزاسیون 70ev بود. بعد از تزریق اسانس به دست آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی، با توجه به الگوی خروج آلکان های نرمال، شاخص بازداری (Retention Index) برای ترکیبات محاسبه و در نهایت مقایسه آنها با شاخص های مرجع، ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس، شناسایی شدند.

تجزیه و تحلیل آماری

داده های بدست آمده با نرم افزار SPSS 24 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و آنالیز واریانس داده-ها با استفاده از ANOVA در سطح احتمال ۵٪ محاسبه شد. آنالیز مقایسات چندگانه با روش توکی ($P<۰/۰۵$) محاسبه شد.

نتایج و بحث

در این تحقیق اثر ضد قارچی اسانس دو گیاه زیره و رزماری و اسانس ترکیبی آنها روی گیاه گندم بررسی گردید. نتایج نشان داد در گیاهان شاهد آلوده به قارچ *B. sorokiniana* که باعث پوسیدگی ریشه گیاه گندم گردید، به‌طور قابل توجهی وزن تر، خشک و طول ریشه کاهش یافت (شکل ۷). نعیمی و همکاران (۲۰۱۱) برای اولین بار وجود قارچ *B. sorokiniana* را روی گیاه برنج گزارش کردند و اشاره کردند که این قارچ عامل ایجاد پوسیدگی ریشه، لکه برگی، بلایت گیاهچه و سنبله می باشد. در مطالعه حاضر این قارچ به عنوان یک

1Inhibitory percentage
2check
3 Treatment

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری باعث کاهش خصوصیات مورفولوژیکی ریشه و شاخساره گیاه گندم شد. هتزلر و همکاران (۱۹۹۱) اعلان کردند که به نظر می رسد که تنوع و شدت تهاجم این بیمارگر با گذشت زمان در حال افزایش است. نتایج این تحقیق در خصوص بیماری زایی قارچ *B. sorokiniana* در گیاه گندم نیز در تأیید مطالعه هتزلر و همکاران (۱۹۹۱) با گذشت زمان حالتی صعودی داشت.

اثر اسانس زیره سبز

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر اسانس زیره سبز بر خصوصیات اندازه گیری شده در گندم شامل طول ریشه، طول شاخه، وزن خشک ریشه، وزن خشک شاخه، محتوای نسبی آب و سطح برگ معنی دار شد (جدول ۱).

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس فاکتورهای رشدی تحت تیمار بیماری و غلظت اسانس زیره

منابع تغییر	درجه آزادی	طول ریشه	طول شاخه	وزن خشک ریشه	وزن خشک شاخه	محتوی آب نسبی	سطح برگ
تیمار بیماری	۱	۹۵/۶۸**	۷۲/۰۰**	۱۰۳/۶۶**	۰/۳۰**	۱۷۱/۳۲	٤/۱٦**
غلظت اسانس زیره	۲	۲۲/۰۲*	٥٦/۳۳*	۷۹/۱٤**	۰/۳۰**	۸۹۳/۱۱**	۰/۷۹*
اثر متقابل تیمار بیماری و غلظت اسانس زیره	۲	۱٦/۳٦	۱۷۰/۳۳**	۲/٤٤	۰/۸۲*	۳۱۳/۰۱*	۳/۳٤*
خطا	۱۲	۱۳/۱٦	۲۹/۳۳	۱۲/۲۳	۰/٤۹	۱۸٦/۲۷	۰/۹۰

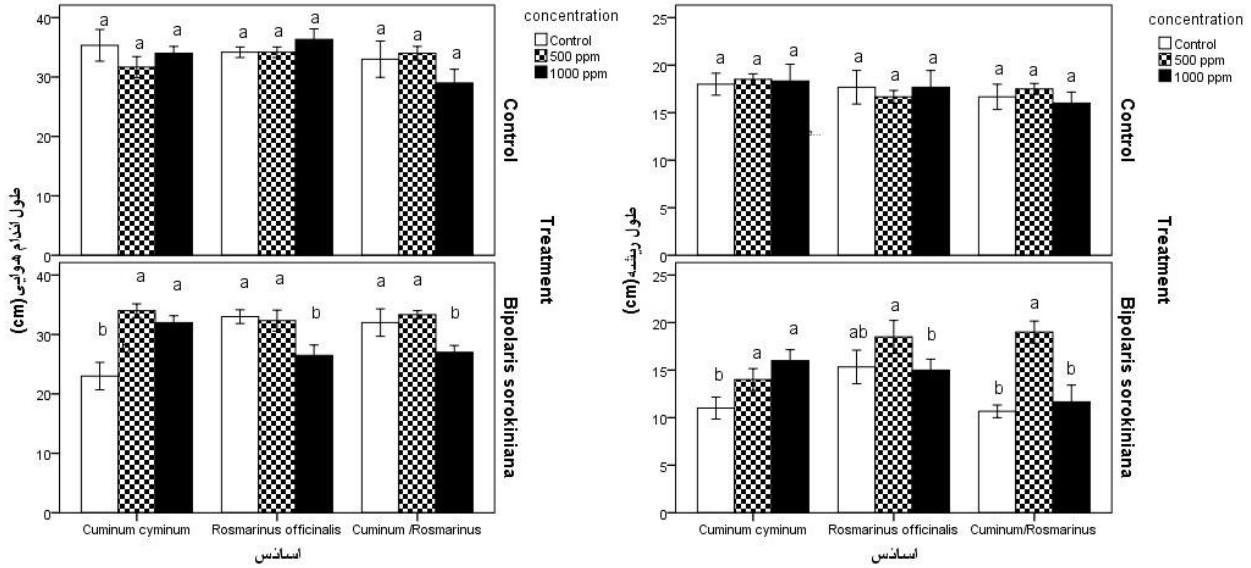
** و* به ترتیب در سطح ۱ درصد و ۵ درصد معنی دار می‌باشد.

نمودارهای شکل۱ اثر همزمان تنش بیماری و اسانس های مختلف در میزان طول ریشه و شاخه گندم نشان داده شده است. با توجه به گروه شاهد (بدون قارچ) و بیماری (آلوده به قارچ)، به طور کامل می توان به این نتیجه رسید که قارچ *B. sorokiniana* در مقدار طول ریشه و طول شاخه اثر منفی داشته است. بعد از محلول پاشی اسانس زیره، رزماری و ترکیبی با یکدیگر، اسانس زیره روی طول شاخه اثر معنی داری روی طول شاخه تیمار بیماری داشت، ولی در غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس زیره تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

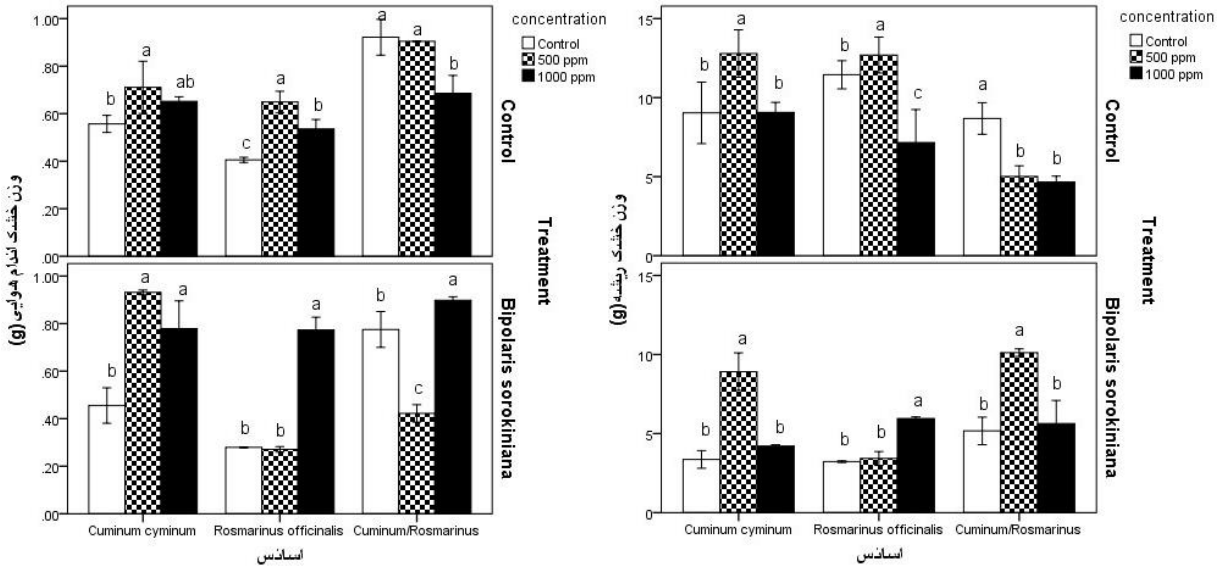
با توجه به شکل ۲، غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس زیره به طور قابل توجهی روی وزن خشک شاخه اثر گذاشته است. نتایج بررسی اثر بازدارندگی اسانس از طریق آب پاشی روی برگ های گیاه گندم، روی محتوی آب نسبی و سطح برگ گیاه گندم در شکل ۳ ارائه شده است. چنان‌که ملاحظه می شود، اسانس های گیاهی استخراج شده با روش تقطیر با آب روی قارچ *B. sorokiniana* اثر داشته و اسانس زیره با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر بیشترین اثر بازدارندگی قارچ بیماری زای مورد آزمایش داشته است. شکل ٤ نشان داد که غلظت های ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر تمام اسانس های مورد آزمایش اثر بازدارندگی از خود نشان داده است اما بین غلظت ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر زیره تفاوت معنی داری مشاهده نشد ولی نسبت به اسانس رزماری اثر بهتری را نشان داد. شکل ۵ اثر غلظت‌های مختلف اسانس رزماری، زیره و ترکیب این دو را بر میزان بازدارندگی قارچ *B. sorokiniana* نشان می‌دهد. در پتری‌دیش های شاهد قارچ بیشترین هاله رشدی را نشان داد، در حالی‌که غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر زیره باعث کاهش معنی‌دار هاله رشدی شد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- اثر همزمان تنش بیماری و اسانس در میزان طول ریشه (راست) و طول شاخه (چپ) گندم (در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی داری بر اساس آزمون توکی هستند).



شکل ۲- اثر همزمان تنش بیماری و اسانس در میزان وزن خشک ریشه (راست) و شاخه (چپ) گیاه گندم (در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی داری بر اساس آزمون توکی هستند).

اثر اسانس رزماری

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر اسانس رزماری بر خصوصیات اندازه گیری شده در گندم شامل طول ریشه، طول شاخه، وزن خشک ریشه، وزن خشک شاخه، محتوای نسبی آب و سطح برگ معنی دار شد (جدول ۲).

www.SID.ir

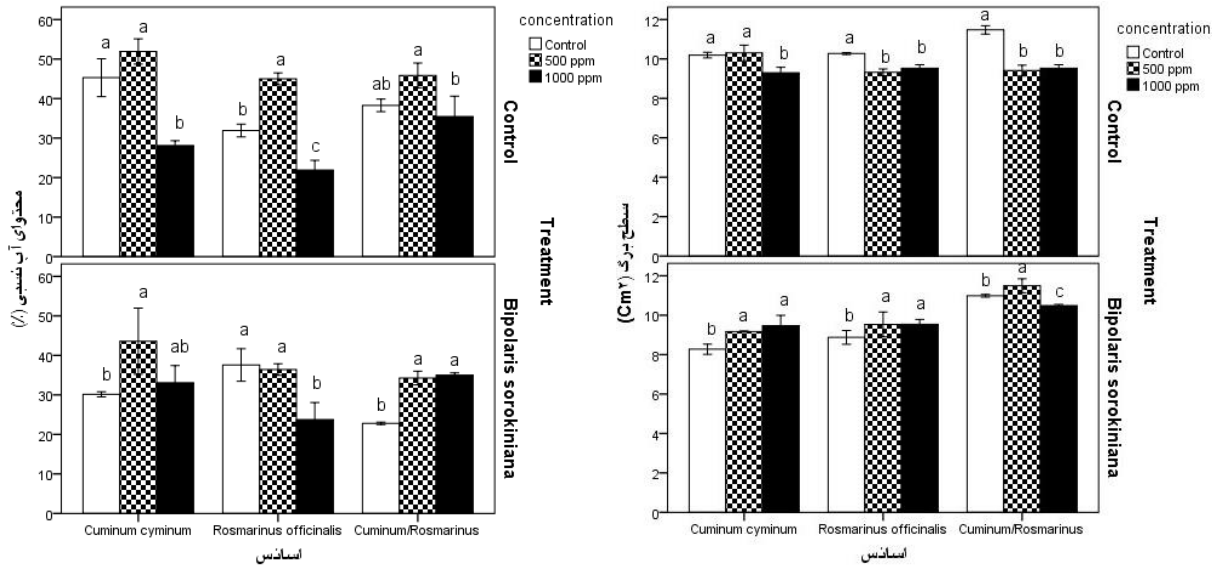
Archive of SID

جدول۲- نتایج تجزیه واریانس فاکتورهای رشدی تحت اثر تیمار بیماری و غلظت اسانس رزماری

منابع تغییر	درجه آزادی	طول ریشه	طول شاخه	وزن خشک ریشه	وزن خشک شاخه	محتوی آب نسبی	سطح برگ
تیمار بیماری	۱	۵/۰۱	۸۲/۳٤**	۱۷٤/۹۱**	۰/۱۹**	۰/۵۰	۰/٦۸
غلظت اسانس رزماری	۲	۵/۵۲	۱٦/۳۳*	٦/۷۹*	۰/٦۳*	۹۹۲/۱٦**	۰/۰۷
اثر متقابل تیمار بیماری و غلظت اسانس رزماری	۲	۱۸/۸٦*	٦۹/۷۷**	۵۷/٦٤**	۰/٦۵**	۱٦۳/٤۱**	۲/۳۱**
خطا	۱۲	۲۱/۱٦	۱۸/۱٦	۹/۹۹	۰/۲٦	۷۲/٦٦	۰/۹٦

** و* به ترتیب در سطح ۱ درصد و ۵ درصد معنی دار می باشد.

با توجه به نمودارهای شکل ۱، اثر اسانس رزماری تفاوت معنی داری را در طول شاخه نداشت، حال آنکه در طول ریشه در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر معنی دار بود. با توجه به شکل ۲، اسانس رزماری کمترین تاثیر را در میزان وزن خشک ریشه و شاخه داشت.



شکل۳- اثر همزمان تنش بیماری و اسانس در میزان سطح برگ (راست) و محتوی نسبی آب برگ (چپ) گیاه گندم در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی داری بر اساس آزمون توکی هستند.

اثر اسانس ترکیبی زیره و رزماری

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر اسانس ترکیبی زیره سبز و رزماری بر خصوصیات اندازه گیری شده در گندم شامل طول ریشه، طول شاخه، وزن خشک ریشه، وزن خشک شاخه، محتوای نسبی آب و سطح برگ معنی دار شد (جدول۳).

www.SID.ir

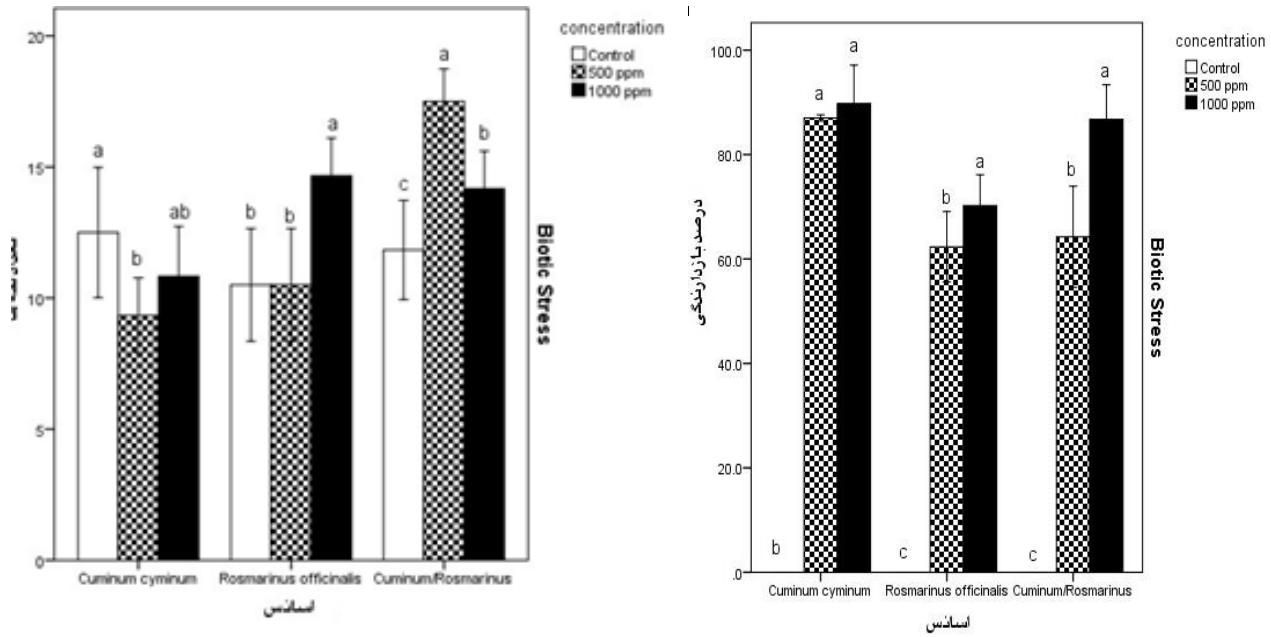
Archive of SID

جدول۳- نتایج تجزیه واریانس فاکتورهای رشدی تحت اثر تیمار بیماری و غلظت اسانس ترکیبی زیره-رزماری

منابع تغییر	درجه آزادی	طول ریشه	طول شاخه	وزن خشک ریشه	وزن خشک شاخه	محتوی آب نسبی	سطح برگ
تیمار بیماری	۱	۳۹/۰۱**	٦/۷۲	۳/۲۸*	۰/۰۸**	۳۷۹/۰۱**	۳/۲٥**
غلظت اسانس ترکیبی زیره- رزماری	۲	۸۱/٥۸**	۱۰۷/٤٤**	۱۸/۸٦**	۰/۱۰**	۲۷۲/٥۰**	٤/٥٦**
اثر متقابل تیمار بیماری و غلظت اسانس ترکیبی زیره- رزماری	۲	٤٦/٥۲**	۱/٤٤	٥٥/٦٥**	۰/۳۸**	۱۸۱/٥٥**	٤/۹۷**
خطا	۱۲	۱۲/٥۰	۳٤/٦٦	٦/۸۱	۰/۰۲	٦۳/۳۳	۰/٤۲

** و* به ترتیب در سطح ۱ درصد و ٥ درصد معنی دار می باشد.

اثر ترکیبی زیره و رزماری تفاوت معنی داری را در طول شاخه نداشت، این در حالی است که ترکیب زیره و رزماری با یکدیگر بیشترین تأثیر را در میزان طول ریشه در مقایسه با طول شاخه داشت(شکل ۱). با توجه به شکل ۲، غلظت ٥۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس ترکیبی زیره و رزماری بیشترین تأثیر (٥٤/٥٤ درصد) را بر افزایش وزن خشک ریشه داشت.



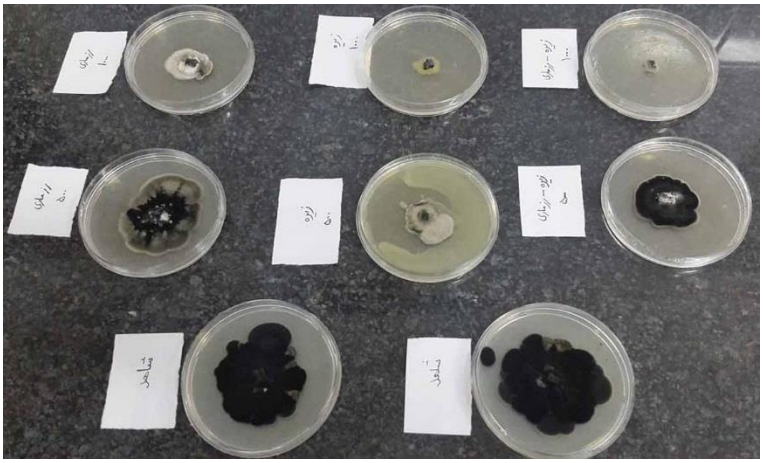
شکل۴- اثر همزمان تنش بیماری و اسانس در تعداد لکه های قارچی (راست) و میزان درصد بازدارندگی قارچ (چپ) توسط اسانس (در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی داری بر اساس آزمون توکی هستند)

ترکیب اسانس زیره و رزماری اثر کمی روی محتوی آب نسبی داشته و بین غلظت های ٥۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر تفاوت معنی داری مشاهده نشده است، درحالی که غلظت ٥۰۰ میلی‌گرم در لیتر ترکب اسانس زیره و رزماری روی سطح برگ بیشترین اثر را داشته است (شکل ۳). با توجه به جدول آنالیز واریانس در مورد غلظت های مختلف اسانس و تیمار بیماری و شاهد نیز تفاوت معنی داری وجود داشت (جدول۳). با توجه به شکل ٤، غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر ترکیب اسانس زیره و رزماری تأثیر بازدارندگی قابل توجهی را نشان

www.SID.ir

Archive of SID

داد ولی غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس زیره سبز بیشترین اثر را در میزان بازدارندگی قارچ *B. sorokiniana* داشت، همچنین غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس ترکیبی زیره و رزماری نیز بیشترین تأثیر روی از بین بردن لکه ها گذاشته است. مطابق شکل ۵ در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر ترکیب اسانس رزماری و زیره بیشترین میزان بازدارندگی (۸۸/۱۲ درصد) در رشد قارچ را داشت، در حالی‌که اسانس رزماری در غلظت ۱۰۰۰ میلی‌گرم کمترین اثر (۶۸/۳۵ درصد) را داشت.

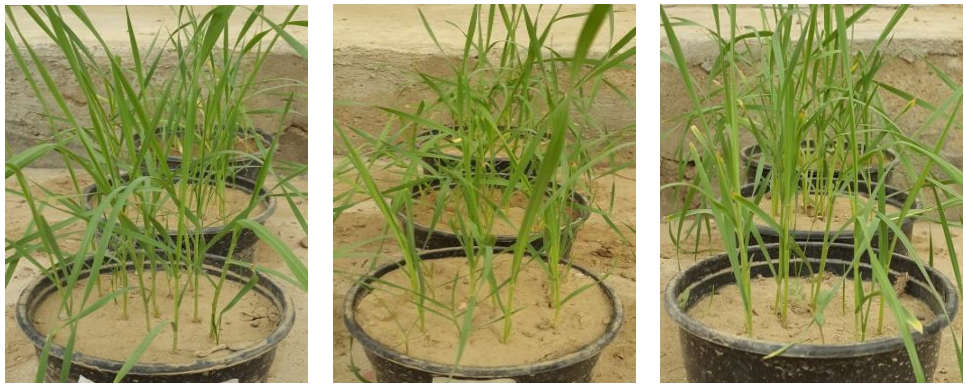


شکل۵- اثر غلظت‌های مختلف اسانس بر میزان بازدارندگی قارچ *B. sorokiniana*

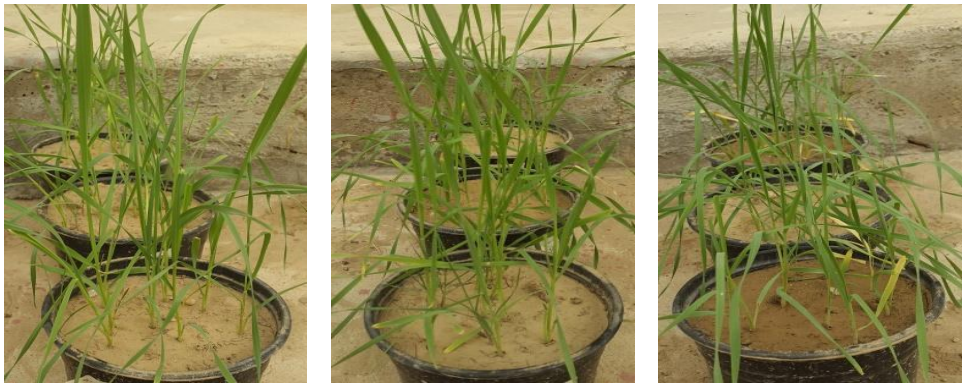
شکل ٦ اثر تیمارهای مختلف اسانس رزماری، زیره و ترکیب این دو را در برگ گیاهان شاهد که فقط با اسانس گیاهان داروی محلول‌پاشی شده‌اند، نشان می-دهد. همانطور که در شکل نیز مشخص است برگ این گیاهان کاملا سالم می‌باشد. در حالی‌که در شکل ۷ که گیاهان تحت تیمار قارچ *B. sorokiniana* و محلول‌پاشی اسانس را نشان می‌دهد، لکه‌های برگی مشهود است. نشانه‌های بیماری روی برگها و غلاف برگها در تمام مراحل رشدی دیده می‌شوند و به صورت لکه‌های گرد تا مستطیلی شکل و با حاشیه لکه‌ها کاملا مشخص بوده و به صورت یکنواخت قهوه‌ای تیره هستند. لکه‌ها ممکن است به هم رسیده و موجب قهوه‌ای شدن بخش گسترده‌ای از برگ شده و در نهایت برگ خشک می‌شود (بوکوس و همکاران ۲۰۱۰). در مطالعه حاضر اسانس زیره به طور معنی‌داری باعث کاهش لکه‌های برگی شده است.

www.SID.ir

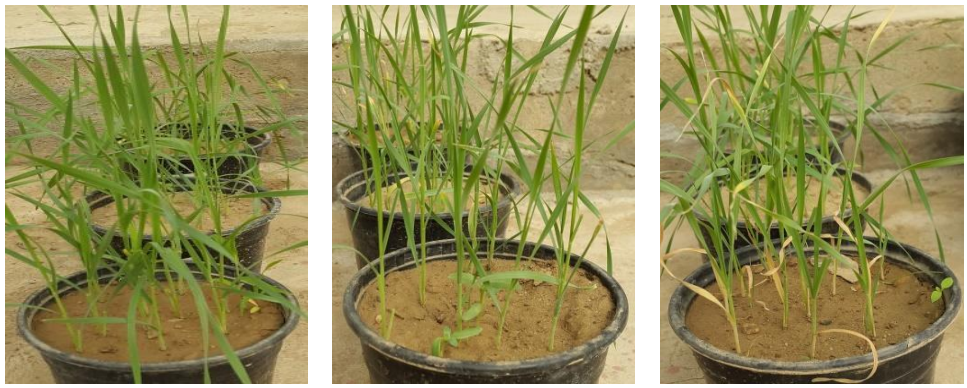
Archive of SID



رزماری ۱۰۰۰ ppm رزماری ۵۰۰ ppm شاهد (محلول‌پاشی با آب مقطر)



زیره ۱۰۰۰ ppm زیره ۵۰۰ ppm شاهد (محلول‌پاشی با آب مقطر)

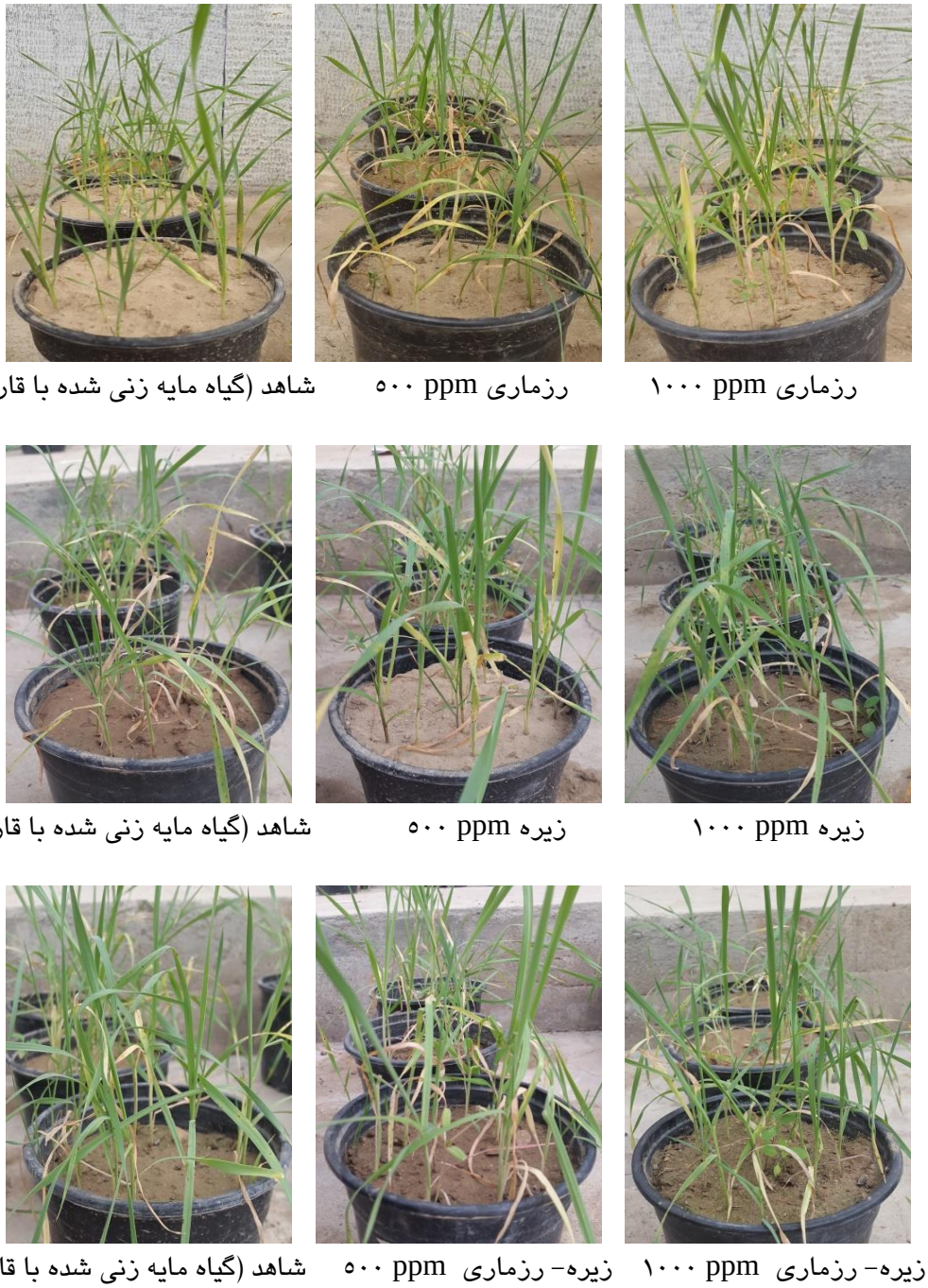


زیره- رزماری ۱۰۰۰ ppm زیره- رزماری ۵۰۰ ppm شاهد (محلول‌پاشی با آب مقطر)

شکل ۶. اثر تیمارهای مختلف اسانس در برگ‌های گیاهان شاهد (گیاهان بدون تیمار قارچی)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۷- اثر تیمارهای مختلف اسانس در لکه های قارچی برگ‌ها تحت تنش بیماری (مایه زنی شده با *B. sorokiniana*)

مطالعات بهرامی نژاد و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان می‌دهد که خارخسک (*Tribulus terrestris* L.) در ریشه و اندام هوایی خود حاوی مواد بازدارنده علیه گونه *B. sorokiniana* می‌باشد. عصاره متانولی ریشه خارخسک با میانگین هاله بازدارندگی به میزان ۱۷/۶۳ میلی متر بیشترین اثر بازدارندگی را بر علیه قارچ مذکور داشت، که در تحقیق حاضر نیز اسانس زیره بیشترین تأثیر بازدارندگی را روی قارچ *B. sorokiniana* داشت و شکل ۵ نیز همین مساله را تایید می‌کند.

www.SID.ir

Archive of SID

عمارلو و همکاران (۲۰۰۹) اعلان کردند که اولین قارچی که به ریشه حمله کرده وعلائم ایجاد می کند جنس *B. sorokiniana* می باشد. سرعت کلونیزه کردن بافت ریشه وطوقه بسیار بالاست و به علت تخریب سریع بافت ریشه و طوقه باعث کوتاهی قد بوته ها به میزان ۵۰ – ۷۵ درصد بوته های سالم می شود. که دلیل این امر را می توان گفت چون از ابتدا ریشه آلوده شده و سرعت کلونیزه شدن ریشه نیز بالا بوده میزان جذب آب ریشه کم بوده میزان آب از دست رفته بعد از خشک کردن در آون نیز کم خواهد بود. در این تحقیق نیز اثر قارچ *B. sorokiniana* در میزان ارتفاع شاخساره باعث کوتاهی قد گیاهان مورد آزمایش شد و همچنین میزان جذب آب توسط ریشه و به طبع آن وزن خشک ریشه نیز مطابق نتایج عمارلو و همکاران (۲۰۰۹) با اثر قارچ کم شد.

در مطالعه حاضر بین طول شاخه و طول ریشه، وزن تر ریشه با طول ریشه و طول شاخه، وزن خشک ریشه با طول ریشه و شاخه و وزن تر ریشه و شاخه همبستگی مثبت معنی داری ($P<۰/۰۵$) وجود داشت. بین سطح برگ با طول ریشه و شاخه، وزن ر ریشه و شاخه و وزن خشک ریشه و محتوای آب نسبی برگ همبستگی معنی-داری وجود داشت. از طرفی یک همبستگی منفی بین تعداد لکه های قارچی با فاکتورهای رشدی وجود داشت.

در تحقیق حاضر تمامی اسانس ها فعالیت ضد قارچی از خود نشان دادند، مقایسه میانگین¬های اسانس ها در تیمار ها و اثرات متقابل آنها، نشان داد که در کل، اثر ترکیبی اسانس زیره و رزماری بیشترین تأثیر را روی بازدارندگی فعالیت قارچ داشت. نتایج این تحقیق نشان می دهد که افزایش غلظت اسانس و نوع اسانس می تواند تاثیر متفاوتی بر روی قارچ داشته باشد.

شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

بعد از تزریق اسانس به دست آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی – طیف سنجی جرمی، با توجه به الگوی خروج آلکان های نرمال، شاخص بازداری (Retention Index) برای ترکیبات محاسبه و در نهایت مقایسه آنها با شاخص های مرجع، ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس، شناسایی شدند. نتایج حاصل از GC-MS نشان داد که 3-Caren-10-al (۲۷/۱۳ درصد) بیشترین درصد میزان اسانس زیره می باشد. همچنین بیشترین درصد اسانس رزماری 1R-à-Pinene (۱۴/۸۲ درصد) می باشد. در اسانس ترکیبی زیره و رزماری، بیشترین میزان اسانس را 3-Caren-10-al (۱۲ درصد) نشان می-دهد.

مختاری و همکاران (۱۳۹۱) گزارش کردند که اصلی ترین ترکیب ماده موثره زیره سبز آلدئید کومینیک می باشد که نوعی ماده محلول در آب می باشد که در نهایت گزارش کردند که اسانس زیره سبز اثر مهار کنندگی بر رشد قارچ فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس می باشد. اما نتایج این تحقیق در خصوص بیشترین اثر اسانس روی قارچ، اسانس زیره دارای حداکثر بازدارندگی قارچ *B. sorokiniana* شد.

از مهم‌ترین ترکیبهای اسانس رزماری ۸،۱- سینئول است. آسانوا و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که این ترکیب فعالیت سیتوتوکسیسیتی بسیار بالایی دارد و ممکن است این ترکیب نقش اصلی را در سیتوتوکسیسیتی این اسانس بر عهده داشته باشد. در این مطالعه تاثیر اسانس رزماری، زیره و زیره– رزماری روی قارچ *B. sorokiniana* نشان داده شد؛ از این رو اسانس زیره و نیز ترکیب اسانس زیره و رزماری (بیشترین تأثیر) می تواند یک منبع اولیه برای تهیه ترکیب های ضد میکروبی طبیعی برای بازداری از رشد *B. sorokiniana* در گندم به کار رود.

امین افشار و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که بیشترین میزان درصد اسانس رزماری آلفا پینن با ۱۲/۳ درصد می باشد که مطالعه حاضر نیز در تأیید این تحقیق بیشترین میزان ماده موثره رزماری را آلفا پینن با ۱۴/۸۲ درصد می باشد. نتایج حاصل از پژوهشی دیگر توسط

www.SID.ir

Archive of SID

مقتدر و افضلی (۲۰۰۹) بیان داشت که در شهر کرمان ٤١ ترکیب را از دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی دریافت کردند که بیشترین درصد ترکیبات آنها آلفا- پینن (۱۵/۵۲ درصد)، کامفور (۱۱/٦٦ درصد) و وربنون (۱۱/۱۰ درصد) می باشد که در تحقیق حاضر ٤٦ ترکیب با استفاده از دستگاه کرواتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی دریافت شد که از میان آنها آلفا پینن (۱٤/۸۲ درصد) و اوکالیپتول (۱٤/۷٤ درصد) بیشترین درصد میزان اسانس را تشکیل داده است.

با توجه به این که تولید متابولیت های ثانویه به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی می باشد میزان ترکیبات اسانس گیاهی در محیط‌های گوناگون متفاوت می باشد. اسماعیلی (۲۰۱۵) بیشترین درصد میزان اسانس زیره را آلفا پینن (۳۰ درصد) گزارش کرد. این در حالی است که در مطالعه حاضر بیشترین میزان درصد تشکیل دهنده اسانس را 3-Caren-10-al (۲۷/۱۳ درصد) تشکیل داده است. در گزارش بررسی شیمیایی زیره سبز، احمدی (۱۹۹۹) با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی اسانس زیره سبز را مورد بررسی قرار داد، که در مطالعه وی ۱۳ ترکیب شناسایی شد (۹۸ درصد) که در میان ترکیبات شناسایی شده کومین آلدهید (۲۵/۲ درصد) بیشترین میزان درصد اسانس را تشکیل داد که در مطالعه حاضر 3-Caren-10-al بیشترین درصد ترکیب اسانس را تشکیل می‌دهد.

نتیجه گیری کلی

نتایج این تحقیق در مجموع نشان داد که اسانس گیاهان مورد آزمایش دارای مواد ارزشمند دارویی می-باشند که مهم‌ترین آنها آلفا – پینن، کارن، وربنون و اوکالیپتول می باشد که در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود. از سوی دیگر در ترکیب دو گیاه با یکدیگر خاصیت ضد قارچی بیشترین اثرات معنی داری را روی پارامترهای مختلف در خنثی سازی و بازدارندگی قارچ *B. sorokiniana* داشت. بنابراین می توان اسانس زیره و نیز ترکیب این دو گیاه یعنی زیره و رزماری با همدیگر در تهیه سموم برای از بین بردن بیماری لکه سوختگی با عامل *B. sorokiniana* استفاده کرد. همچنین با توجه به همبستگی بین عوامل مختلف این تحقیق، تحقیقات جامع تری در این زمینه از جمله اثر اسانس‌های مورد مطالعه در این تحقیق بر سایر گیاهان زراعی آلوده به قارچ *B. sorokiniana* مثل گیاه جو پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

نتایج این مقاله از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه و بنیاد ملی نخبگان ریاست جمهوری (قرارداد به شماره ۱۵/۸۳۷۲٤ مورخ ۱۳۹۵/۱۰/۰۱) مستخرج شده است. بدین وسیله از بنیاد ملی نخبگان ریاست جمهوری به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع مورد استفاده

Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. Journal of Economic Entomology, 18: 265-267.

AgehMiri A, Mehrabi R and Talebi R. 2015. Isolation, identification and study of genetic diversity of *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoen. Using molecular markers. Crops, 11: 15-27. (In Persian).

Agrios GN. 2005. Plant Pathology 5th ed. Elsevier Academia Press, Oxford, p. 922.

Ahmadi L. 1999. Study on chemical composition of the essential oil from seeds of *Cuminum cyminum* L. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research, 6: 97-113.

www.SID.ir

Archive of SID

Aktaş A, Bolat N, Keser M and Ince T. 2000. Determination of the cereal root and crown rot disease agents in the Eskişehir cereal growing areas and researches on the genitor varieties and lines against *Drechslera sorokiniana* (Sacc) Subram. and Jain. In wheat and barley. Plant Protection Bulletin, 40: 71-83.

Amarlou OA, Rouhani H and Mahdokhani Moghaddam E. 2009. Identification and study of pathogenicity of fungi causing carcass roots of wheat in North Khorasan province. Plant Protection, 24: 269-284. (In Persian).

Amin Afshar MH, Mehesti P and Imam Jomaeh Z. 2015. Identification of compound formation, minimum Inhibitory concentration on growth and mineralization of Rosemary essences cultivated in Shiraz. Journal of Medicinal Plants, 4: 122-112. (In Persian).

Arabi MIE and Jawhar M. 2007. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Cochliobolus sativus*. Australian Plant Pathology, 36: 17-21.

Asanova ZhK, Suleimenov EM, Atazhanova GA, Dembitskii AD, Pak RN, Dar A and Adekenov SM. 2003. Biological activity of 1, 8-cineole from levant wormwood. Pharmaceutical Chemistry Journal, 37(1): 28-30.

Aziz Khani M, Oznar R and Patricia E. 2014. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E *Staphylococcus aureus* 29213 ATCC. Medicinal and Aromatic Plants, 32: 801-811. (In Persian).

Bahadar K, Munir A and Asad S. 2016. In-vitro inhibition of spot blotch disease causal agent (*Bipolaris sorokiniana*) by plant extracts. Pakistan Journal of Phytopathology, 28: 173-183.

Bahraminejad S, Abbasi S and Papzan H. 2009. Evaluation antifungal activity of some extracts of medicinal plants. 6th Congress of Iranian Horticultural Sciences, 1065-1068. (In Persian).

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D and Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, 46: 446-475.

Bakr EM. 2005. A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. Journal of Applied Entomology, 129 (3):173-175.

Bockus WW, Bowden RL, Hunger RM, Morrill WL, Murray TD and Smiley RW. 2010. Compendium of Wheat Diseases and Pests, 3rd edn. St Paul, MN, USA: APS Press.

Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N and Anackov G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 1822-1828.

Couladis M, Tzakou O, Kujundzi S, Sokovi M and Mimica-Dukic N. 2004. Chemical analysis and antifungal activity of Thymus striatus. Phytotherapy Research, 18: 40-42.

Esmaeili F. 2015. Composition of Essential Oil of *Cuminum cyminum*. Essential Oil Bearing Plants, 18(2): 507-509.

Hadian J, Farzaneh M, Fakhr Tabatabaei SM, Mirjalili MH, Ranjbar H and Haji Eqarari B. 2007. Identification composition of *Artemisia scopari* and *A. aucheri* essential oils from southern Khorasan province and evaluation their antifungal effect on some pathogenic plants. Iranian Journal of Agricultural Science, 38: 421-429. (In Persian).

Hetzler J, Eyal Z, Metha YR, Campos LA, Fehrmann H, Kushnir U, Zekaria JO and Cohen L. 1990. Interaction between spot blotch (*Cochliobolus sativus*) and wheat cultivars. In: Proceedings of the International Conference Mexico, CIMMYT, 146-164.

Kumar J, Schafer P, Huckelhoven R, Langen G, Baltruschat H, Stein E, Nagarajan S and Kogel KH. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. Molecular Plant Pathology, 3(4): 185-195.

www.SID.ir

Archive of SID

Matusinsky P, Frei P, Mikolasova R, Svacinova I, Tvaruzek L and Spitzer T. 2010. Species-specific detection of *Bipolaris sorokiniana* from wheat and barley tissues. Crop P rotection, 29: 1325-1330.

Moghtader M and Afzali D. 2009. Study of the antimicrobial properties of the essential oil of Rosemary. American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science, 5(3): 393-397.

Mokhtari AR, Khosravi AR and Zohraei Salehi T. 2012. Antifungal effect and morphological changes of cumin essential oil on the isolates of *Fusarium verticillioids* isolated in Iran. Comparative Pathobiology, 2: 705-714. (In Persian).

Naeemi Sh, Khosravi V and Tsukiboshi N. 2011. Occurrence of rice plant infection to *Bipolaris sorokiniana* in Iran. Plant Diseases, 47: 353-360. (In Persian).

Nascimento EJD and van der Sand ST. 2008. Restriction analysis of the amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana* isolates. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(5): 647-652.

Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL and Alarcon-Aguilar FJ. 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. Ethno Pharmacology, 48: 25-32.

Rustaiyan A, Masoudi S, Yari M, Rabbani M, Motiefar HR and Larijani K. 2000. Essential oil of *Salvia lerifolea* Benth. Journal of Essential Oil Research, 12: 601-602.

Sharma RC and Dubin HJ. 1996. Effect of wheat cultivar mixtures on spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) and grain yield. Field Crops Research, 45: 95-101.

Zhong SB and Steffenson BJ. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. Phytopathology, 91: 469-476.

www.SID.ir