Archive of SID

تأثیر فعالیت ضدقارچی اسانس چریش و ترکیبات آن بر شاخص‌های رشدی و آنزیم‌های موثر در بیماریزایی *Fusarium* spp.

نیما خالدی[1*] و فرشید حسنی[2]

۱ - **نویسنده مسوول:** استادیار، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران (khnm13@gmail.com)

۲ - استادیار، موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

تاریخ دریافت: ۹۸/۱۰/۰۶ تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۱۰

چکیده

جنس فوزاریوم دارای گسترشی جهانی است و بسیاری از گونه‌های آن، به‌ویژه *Fusarium graminearum* Schwabe و *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo، می‌توانند طیف گسترده‌ای از گیاهان میزبان را آلوده کرده و باعث ایجاد انواع بیماری‌های مهم اقتصادی شوند. هدف از این مطالعه شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس برگ‌های درخت بومی چریش (*Azadirachta indica* A.Juss.) و بررسی تأثیر آنها روی شاخص‌های رشدی و فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی تولیدشده توسط این بیمارگرها است. برگ‌های درخت چریش از منطقه ایرانشهر استان سیستان و بلوچستان جمع‌آوری و پس از خشک‌کردن در سایه، اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب به کمک دستگاه کلونجر انجام شد و ترکیبات اصلی آن با استفاده از کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی شناسایی شدند. ترکیبات اصلی شناسایی‌شده اسانس شامل بتا المن (۲۷/۲ درصد)، کاریوفیلن (۱۵/۹ درصد) و فیتول (۱۵/۳ درصد) بودند، که دارای اثرات ضد قارچی علیه *F. graminearum* و *F. culmorum* هستند. نتایج نشان داد که با توجه به آنکه میزان بیماریزایی *F. culmorum* کمتر از *F. graminearum* بود اما حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس، بتا المن، کاریوفیلن و فیتول علیه *F. graminearum* در مقایسه با *F. culmorum* بالاتر بود. اسپورزایی و جوانه‌زنی اسپورهای *Fusarium* spp. به‌طور کامل توسط اسانس و فیتول مهار شدند. اثرات هم‌افزایی ترکیبات اصلی اسانس نشان داد که ترکیب فیتول با کاروفیلن موجب فعالیت سینرژیستی و در ترکیب با بتا المن موجب فعالیت افزایشی علیه گونه‌های *Fusarium* شد. اسانس و ترکیبات اصلی آن در غلظت کم، بدون تأثیری روی رشد میسلیومی قارچ‌های مورد بررسی موجب کاهش فعالیت‌های سلولاز و پکتیناز به‌عنوان مهم‌ترین آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی شدند. یافته‌های این پژوهش نشان داد که امکان استفاده از اسانس چریش و ترکیب فیتول برای کنترل بیماری‌های ناشی از گونه‌های *Fusarium* وجود دارد.

کلیدواژه‌ها: چریش، فوزاریوم، اثرات هم‌افزایی، حداقل غلظت مهارکنندگی، پکتیناز، سلولاز، فیتول

مقدمه

گیاهان دارویی به‌عنوان ذخایر و گنجینه‌های ژنتیکی، بخش مهمی از تنوع زیستی در بخش کشاورزی محسوب می‌شوند. با توجه به نقش ویژه گیاهان دارویی در مدیریت پایدار به‌ویژه در ابعاد توسعه اقتصادی، زیست محیطی، بهداشتی، اشتغال، امنیت غذایی و ذخایر ژنتیکی مطالعه و

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی آنها حائز اهمیت است. رویکرد روزافزون به استفاده از گیاهان دارویی در سطح جهانی، اهمیت کشت و تولید این گیاهان را بیشتر کرده است. استفاده از گیاهان دارویی به‌منظور استخراج عصاره‌های آنها برای تولید دارو و جایگزین کردن آنها به‌جای داروهای شیمیایی برای حفظ سلامتی انسان‌ها از مهم‌ترین نیازهای تمدن امروزی می‌باشد (Ramesh and Okigbo, 2008). گیاهان دارویی حاوی ذخایر ارزشمندی از ترکیبات فعال زیستی از جمله متابولیت‌های ثانویه هستند که بسیاری از آن‌ها اثرات ضد میکروبی، آفت‌کشی یا دورکنندگی داشته و در دفاع گیاهان در برابر آفات و بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. گیاهان بالغ بر یک‌صد هزار متابولیت ثانویه طبیعی با وزن مولکولی پایین تولید می‌کنند (Dixon, 2001). بسیاری از این متابولیت‌ها در دفاع گیاه در مقابل آفات و بیماری‌ها مؤثر می‌باشند که شناخت و بررسی آن‌ها می‌تواند کمک مؤثری به کنترل آفات و بیماری‌ها نماید (Cowan, 1999). گیاه چریش با نام علمی *Azadirachta indica* A. Juss. از خانواده سنجد تلخ (Meliaceae) از جمله گیاهان دارویی با خاصیت حشره‌کش و کنه کشی می‌باشد که تا کنون موفقیت‌های زیادی در استفاده از ترکیبات مختلف آن در کنترل آفات حاصل شده است (Deng et al., 2012). چریش درختی همیشه سبز و بومی کشورهای جنوب و جنوب شرق آسیا بوده و در هندوستان، پاکستان، سریلانکا، تایلند، برمه، مالزی، بنگلادش و اندونزی پراکنده می‌باشد. این درخت در نواحی گرم جنوب و جنوب شرقی ایران از جمله سواحل خلیج‌فارس، بندرعباس، جزیره قشم، چابهار و میناب می‌روید و احتمالاً از هندوستان وارد ایران شده است (Sadeghi, 1996). علت خواص ضد قارچی، ضد باکتریایی و حشره کشی عصاره برگ و بذر چریش را وجود ترکیبات فنلی، فلاونوئید، آزادراختین، لیمونید، ترپن و ترپنوئید می‌دانند (Nathan et al., 2005).

مطالعات انجام‌شده روی اسانس‌های گیاهان نشان می‌دهد که ترکیبات ضد قارچی و ضد باکتریایی موجود در گیاهان در بخش اسانس قرار دارد. اسانس‌ها محصولات فراری از متابولیسم ثانویه گیاهان هستند که برخی از آنها دارای فعالیت وسیع الطیف در مقابل بیمارگرهای گیاهی هستند. در سال‌های اخیر کاربرد اسانس و عصاره‌های گیاهی در سطح جهانی گسترش‌یافته و گونه‌های مختلف گیاهان و اسانس‌های آنها برای اهداف محافظت از بیماری‌های گیاهی استفاده می‌شوند. در این بین، گیاهان دارویی همواره به‌عنوان یکی از مهم‌ترین منابع ترکیبات فعال زیستی مورد توجه بوده‌اند (Nayeemulla Shariff et al., 2006). امروزه استفاده از اسانس‌های گیاهی به دلیل داشتن خواص دارویی، ضدقارچی، ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های ثانویه در کنترل عوامل میکروبی رو به پیشرفت است (Khaledi and Hassani, 2018). اسانس‌های گیاهی به دلیل سازگاری با محیط زیست و پایداری کمتر، جایگزین مناسبی برای آفت‌کش‌های شیمیایی قلمداد می‌شوند، از این‌رو بسیاری از کشورها با استفاده از فناوری جدید تهیه و فرمولاسیون سموم غیرشیمیایی از جمله آفت‌کش‌های با پایه و منشأ گیاهی مبادرت به کنترل تلفیقی بیماری‌های مهم گیاهی نموده‌اند (Hasanzadeh, 2005). فعالیت بیولوژیکی اسانس‌ها وابسته به ترکیبات شیمیایی آنهاست که مرتبط با ژنوتیپ گیاه و به میزان زیادی تحت تأثیر منشأ جغرافیایی، شرایط محیطی و نحوه کشت گیاه قرار می‌گیرد (Brooks et al., 2007).

قارچ *Fusarium graminearum* می‌تواند تمام غلات دانه‌ریز از جمله گندم، جو، یولاف، برنج، ذرت و همچنین گیاهان دولپه‌ای مختلف نظیر سیب‌زمینی، چغندرقند، آفتابگردان و بسیاری از گونه‌های علف وحشی و اهلی را تحت تأثیر قرار دهد و موجب بیماری بلایت

www.SID.ir

Archive of SID

سنبله در گندم، جو، برنج و یولاف و همچنین بیماری پوسیدگی خوشه در ذرت و پوسیدگی طوقه و ریشه گندم شود (Goswami and Kistler, 2004). قارچ *F. culmorum* می‌تواند گندم، جو، جودوسر، چاودار، سورگوم، ذرت، مارچوبه، شبدر قرمز، کتان، تره‌فرنگی، صنوبر، میخک، توت‌فرنگی، غده سیب‌زمینی، لوبیا، نخود، چغندرقند و بسیاری از گونه‌های علف وحشی و اهلی را آلوده نماید (Scherm et al., 2013) همچنین موجب بیماری سوختگی گیاهچه، پوسیدگی طوقه و بلایت خوشه در غلات می‌شود (Murray et al., 2009). با توجه به دامنه میزبانی وسیع این قارچ‌ها امکان کنترل آنها سخت بوده و روش مؤثری جهت کنترل آنها به‌جز استفاده از سموم شیمیایی در کنار استفاده از ارقام مقاوم و یا متحمل وجود ندارد.

گونه‌های *Fusarium* فاقد ساختاری تخصصی برای نفوذ در سلول‌های گیاهی بوده، اما از طریق منافذ طبیعی وارد میزبان شده و یا به‌طور مستقیم توسط ریسه کوتاه آلوده‌کننده با کمک ترشح آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی قادر به نفوذ در دیواره سلول‌های اپیدرمی می‌باشد. دیواره سلول‌های گیاهی به‌طور عمده از پکتین، سلولز، همی سلولز، لیگنین، پلی ساکاریدها و پروتئین‌ها تشکیل‌شده است (Zhao et al., 2013). فاکتورهای موثر در بیماریزایی بیمارگرها شامل آنزیم‌ها، توکسین‌ها، پلی ساکاریدها و تنظیم کننده‌های رشد هستند. تولید آنزیم‌های تخریب‌کننده پلی ساکاریدهای دیواره سلولی گیاهان از جمله سلولاز و پکتیناز توسط قارچ *Fusarium* جهت نفوذ به داخل میزبان و استقرار بیمارگر در میزبان، به عنوان یکی از فاکتورهای مهم بیماریزایی، اهمیت دارد (Ortega et al., 2013; Kikot et al., 2009). کاهش تولید و فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی حاصل از بیمارگرها با کاهش قدرت تهاجم و بیماریزایی آن‌ها ارتباط مستقیمی دارد (Voigt et al., 2005). سنجش و ارزیابی آنزیم‌های خارج سلولی ترشح‌شده توسط بیمارگرها می‌تواند به‌عنوان روش مفیدی جهت ارزیابی توان بیماریزایی مورد استفاده قرار گیرد (Khaledi et al., 2017).

تحقیق و پژوهش در مورد ترکیبات طبیعی ممکن است منجر به کشف عوامل مؤثر در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی شود. استفاده از ترکیب‌های طبیعی گیاهان برای کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی مورد توجه پژوهشگران زیادی قرار گرفته است و در این راستا، فعالیت ضدقارچی، ضدباکتریایی و حشره‌کشی، اسانس و عصاره چندین گونه گیاهی به خوبی شناخته شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Muller-Riebau et al., 1995; Pitaroki et al., 2003).

اگرچه تحقیقات فراوانی در مورد تأثیر اسانس‌های گیاهان مختلف بر روی رشد قارچ *Fusarium* انجام شده است اما تاکنون گزارشی در مورد اثرات اسانس برگ چریش بومی ایران و ترکیبات اصلی آن روی فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی، ترشح‌شده توسط گونه‌های فوزاریوم، انجام نشده است. بنابراین، هدف از این پژوهش (الف) شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس برگ‌های چریش بومی ایران، (ب) بررسی نقش بالقوه و تأثیر اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن روی رشد میسلیومی، اسپورزایی و جوانه‌زنی اسپورها، (ج) و همچنین ارزیابی تأثیر آنها روی فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده که در فرآیند آلودگی و مکانیسم‌های بیماریزایی قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* دخیل هستند.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی

در این مطالعه برگ‌های درخت چریش (*A. indica*) از منطقه ایرانشهر استان سیستان و بلوچستان تهیه و پس از

www.SID.ir

Archive of SID

شستشو و خشک‌کردن، با استفاده از آسیاب خرد گردید، سپس بافت‌های آسیاب‌شده از الک عبور داده شد و برای استفاده در مراحل بعدی نگه‌داری گردیدند.

جدایه قارچی

در این مطالعه از قارچ‌های *Fusarium graminearum* جدایه FH1 و *F. culmorum* جدایه FH39 که از آزمایشگاه بیماری‌شناسی دانشگاه فردوسی مشهد دریافت شده بود استفاده گردید. قارچ‌ها توسط Khaledi et al. (2017) از خوشه‌های گندم جداسازی و با استفاده از خصوصیات ریخت‌شناسی و بررسی‌های مولکولی تشخیص داده و بیماریزایی آن‌ها روی گندم رقم فلات اثبات شده بود.

روش استخراج اسانس

اسانس‌گیری به روش تقطیر با آب[1] و به کمک دستگاه کلونجر ساخت شرکت اشک شیشه تهران انجام شد. برای این منظور ۱۰۰ گرم نمونه خردشده گیاهی را در دستگاه کلونجر ریخته و پس از افزودن ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن به مدت ۳ ساعت اسانس گیری شد. اسانس به‌دست‌آمده به‌وسیله سولفات سدیم خشک، آب‌گیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس

برای شناسایی اجزای تشکیل‌دهنده اسانس از دستگاه GC-MS ساخت شرکت Shimadzu QP 5000 با ستون کاپیلاری DB 35 با طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میکرون و مجهز به دتکتور FID استفاده شد. برنامه دمایی آون از ۷۰ تا ۲۵۰ درجه سلسیوس تنظیم و طیف جرمی در دامنه $m.z^{-1}$ ۱۸–۶۰۰ ثبت شد. گاز حامل هلیوم با سرعت $ml.min^{-1}$ ۱ با حجم تزریق یک میکرولیتر، دمای محفظه تزریق و دتکتور به ترتیب ۱۸۰ و ۲۳۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. درصد نسبی هر یک از ترکیبات با توجه به سطح زیر منحنی هر ترکیب در طیف کروماتوگرافی گازی محاسبه گردید. شناسایی اجزا با کمک پارامتر اندیس بازداری و طیف‌های جرمی و مقایسه آنها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در بانک اطلاعات صورت گرفت (Adams, 2001; Davies, 1990).

ارزیابی اثر بازدارندگی اسانس و ترکیبات شیمیایی آن

جهت ارزیابی و تعیین میزان بازدارندگی از رشد جدایه‌های مورد بررسی ناشی از تاثیر اسانس چریش و هرکدام از ترکیبات شیمیایی آن در غلظت ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام از روش اختلاط با محیط کشت بر اساس روش شرح داده شده توسط Abd-El-Khair and El-Gamal Nadia (2011) استفاده شد. آزمایش سه بار تکرار شد. در نهایت درصد کاهش رشد میسلیوم قارچ‌ها با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$GI = \frac{C - P}{C} \times 100$$

GI = درصد بازدارندگی از رشد قارچ، C =میانگین قطر کلنی قارچ در شاهد و P = میانگین قطر کلنی قارچ در تیمار مورد نظر می‌باشد.

با توجه به نتایج به دست آمده در این بخش از آزمایش، ترکیبات بتا المن (CAS Number: 515-13-9)، کاریوفیلن (CAS Number: 87-44-5) و فیتول (CAS Number: 7541-49-3) که دارای توانایی بازدارندگی کامل از رشد میسلیومی قارچ‌ها بودند از شرکت سیگما آلدریچ[2] خریداری و جهت آزمایش‌های تکمیلی مورد استفاده قرار گرفتند.

تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی قارچ‌ها

به منظور تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی[3] و حداقل غلظت کشندگی[4] با استفاده از روش استاندارد رقیق‌سازی در محیط کشت مایع[5] شرح داده شده توسط

1 - Hydro-distillation

2 - Sigma-Aldrich
3 - Minimum inhibitory concentration; MIC
4 - Minimum fungicidal concentration; MFC
5 - Broth microdilution

www.SID.ir

Archive of SID

Plodpai et al. (2013) ارزیابی شد. همچنین غلظت ممانعت کنندگی ۵۰[1] اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن تعیین شد. آزمایش سه بار تکرار شد.

تأثیر اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن بر روی اسپورزایی و جوانه‌زنی اسپور قارچ‌ها

جهت بررسی مهار جوانه‌زنی اسپور قارچ‌ها از روش شرح داده‌شده توسط Atik and Mohammedi (2013) استفاده شد. برای این منظور مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور هر قارچ در غلظت ۱×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر روی محیط کشت حاوی غلظت‌های مختلف اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن (1×MIC، ۰/۱×MIC، 1×IC50 و ۰/۱×IC50) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس به مدت ۵ روز کشت داده شد. سپس میزان جوانه‌زنی اسپور با استفاده از میکروسکوپ چشمی مدل Olympus BX51 مشاهده و مقدار درصد مهار جوانه‌زنی اسپور قارچ‌ها تحت تأثیر اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن با استفاده رابطه زیر تعیین شد:

$$ISG = \frac{N_c - N_t}{N_c} \times 100$$

ISG = درصد مهار جوانه‌زنی اسپور قارچ، N_c = تعداد کلنی‌های قارچ در شاهد و N_t = تعداد کلنی‌های قارچ در تیمار مورد نظر است.

اثر غلظت‌های مختلف اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن بر روی توانایی اسپورزایی قارچ‌ها با استفاده از روش توصیف‌شده توسط Siripornvisal (2010) مورد بررسی قرار گرفت و درصد مهار اسپورزایی با استفاده از رابطه شرح داده‌شده، تعیین شد.

ارزیابی خاصیت قارچ‌کشی و یا قارچ ایستایی اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن

به‌منظور بررسی اثر قارچ‌کشی و یا قارچ ایستایی اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن با استفاده از روش شرح داده‌شده توسط Thompson (1989)، قرص‌های قارچی تیمارهایی که رشد قارچ در آنها مشاهده نگردید روی محیط PDA واکشت شد و رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت جدید بررسی گردید.

مقایسه تأثیر اسانس چریش با برخی از قارچ‌کش‌های شیمیایی رایج

مقایسه میزان مهار اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن با برخی از قارچ‌کش‌های رایج، مانند پروپیکونازول (Tilt®) و سایپروکونازول + کاربندازیم (Altocombi®) با روش اختلاط با محیط کشت بر اساس روش شرح داده‌شده توسط Abd-El-Khair and El-Gamal Nadia (2011) انجام شد.

شناسایی اثرات هم‌افزایی بین ترکیبات اسانس

به‌منظور تأثیر هم‌افزایی بین ترکیبات اسانس از روش چکربورد رقیق‌سازی در محیط مایع[2] شرح داده‌شده توسط Turgis et al. (2012) استفاده گردید. در این روش با استفاده از میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای، ۷۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف ترکیبات اصلی بازدارنده آن (۲×MIC، ۱×MIC، ۰/۵×MIC، ۰/۲۵×MIC، ۰/۱۲۵×MIC، ۰/۰۶۲×MIC، ۰/۰۳۱۲×MIC و ۰/۰۱۵×MIC) به هر ردیف و سپس ۷۰ میکرولیتر از ترکیبات اصلی بازدارنده آن به هر ردیف عمودی بر ترکیبات قبلی در غلظت‌های مختلف افزوده شد. سپس مقدار ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون اسپور هر قارچ در غلظت ۱×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر به هر چاهک اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۴۸ ساعت در داخل دستگاه انکوباتور شیکردار با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. آزمایش سه بار تکرار شد. شاخص غلظت مهارکننده کسری (FICI) از ترکیب دوتایی ترکیبات اصلی بازدارنده در اسانس برگ چریش با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

1 - Inhibitory concentration 50; IC50

2 - Broth microdilution checkerboard

www.SID.ir

Archive of SID

$$FICI = FIC\ A + FIC\ B = \frac{\text{MIC A combined}}{\text{MIC A alone}} + \frac{\text{MIC B combined}}{\text{MIC B alone}}$$

بر اساس عدد حاصل از محاسبه شاخص کسری FICI، اثر متقابل بین ترکیب دوتایی بتا المن، کاریوفیلن و فیتول به‌صورت زیر تفسیر شد (Gutierrez et al., 2008).

۰/۵ ≥ FICI فعالیت سینرژیستی، ۱ > FICI > ۰/۵ فعالیت افزایشی، ۴ ≥ FICI > ۱ بی‌تفاوت و FICI > ۴ فعالیت آنتاگونیسمی.

ارزیابی تأثیر اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن بر روی فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده توسط قارچ‌ها

جهت استخراج آنزیم‌های پکتیناز (پلی متیل گالاکتوروناز) و سلولاز تولیدشده توسط جدایه‌های قارچی، به ترتیب از محیط‌های کشت مایع حاوی پکتین و کربوکسی متیل سلولز استفاده شد. تأثیر اسانس و یا بتا المن، کاریوفیلن و فیتول در غلظت MIC×۰/۰۱ که در آزمایش‌های قبلی هیچ تأثیری بر رشد قارچ‌ها نداشت، در کاهش فعالیت پکتیناز و سلولاز، با استفاده از روش‌های شرح داده‌شده توسط Khaledi et al. (2015) تعیین شد. با توجه به مطالعات قبلی، فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی در شرایط آزمایشگاهی در طی ۱۰ روز پس از تلقیح در دمای ۱±۲۷ درجه سلسیوس روی شیکر دوار با سرعت ۱۱۰ دور در دقیقه با روش شرح داده Ortega et al. (2013) مورد بررسی قرار گرفت. آزمایش برای هر آنزیم سه تکرار داشت و آزمایش سه بار تکرار شد. شاهدهای مثبت برای هر کدام از آنزیم‌های مورد بررسی شامل محیط‌های کشت و جدایه FH25 قارچ *F. graminearum* و یا جدایه FH9 قارچ *F. culmorum* بود که در پژوهش‌های قبلی میزان تولید آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی تولیدشده توسط آنها و ارتباط بین میزان آنزیم‌های تولیدشده با قدرت تهاجم و بیماریزایی آنها مورد ارزیابی قرار گرفته بود (Khaledi et al., 2017). شاهدهای منفی، شامل محیط‌های کشت بدون پکتین و کربوکسی متیل سلولز به همراه قارچ مذکور بود. میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ۲۴ ساعت پس از تلقیح مورد ارزیابی قرار گرفت.

آنالیز آماری

آنالیز آماری داده‌های حاصل از آزمایش‌های مختلف پس از نرمال سازی داده‌ها با تبدیل لگاریتمی با استفاده از روش آنالیز واریانس و با کاربرد نرم‌افزار SPSS (version 23) انجام شد و میانگین‌ها با آزمون توکی در سطح احتمال پنج درصد ($p \leq 0.05$) مورد مقایسه قرار گرفت. آزمایش‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. میزان غلظت موثر ۵۰ درصد (IC50) اسانس و ترکیبات مورد بررسی در بازداری از رشد میسلیومی قارچ‌ها، با استفاده از نرم‌افزار Probit Analysis (POLO-PC) تخمین زده شد (LeOra software, 1987). ترسیم نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2013 انجام شد.

نتایج و بحث

ترکیبات شناسایی‌شده اسانس برگ چریش

نتایج حاصل از کروماتوگرافی گازی اسانس برگ چریش، اندیس‌های بازداری و طیف‌های جرمی اجسام ردیابی شده و مقایسه آنها با مراجع و ترکیبات استاندارد، ۱۰ ترکیب شناسایی گردید که مجموعاً ۹۷/۴ درصد اجزای اسانس را تشکیل داد. ترکیبات شناسایی‌شده به همراه اندیس‌های بازداری و درصد نسبی هر جز در جدول ۱ نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که سیگما – المن (۵/۸ درصد)، گاما-المن (۱۱/۲ درصد)، بتا المن (۲۷/۲ درصد)، کاریوفیلن (۱۵/۹ درصد)، دی جرماسرن (۱۳/۱ درصد)، بی دی جرماسرن (۶/۵ درصد) و فیتول (۱۵/۳ درصد) ترکیبات

www.SID.ir

Archive of SID

اصلی شناسایی‌شده اسانس برگ چریش بودند. سایر ترکیبات به میزان کمتر از ۵ درصد بودند (جدول ۱).

این نتایج مشابه با نتایج گزارش‌شده توسط Dastan et al. (2010) و El-Hawary et al. (2008) است. عمده‌ترین ترکیبات اسانس برگ چریش جمع‌آوری شده از استان بوشهر شامل کاریوفیلن (۱۳/۵ درصد)، گاما- المن (۲۰/۸ درصد)، بی دی جرماسرن (۲۰/۳ درصد)، هگزادکانال (۱۲/۸ درصد) و متیل لینولیت (۱۰/۵ درصد) بود (Dastan et al., 2010). El-Hawary et al. (2008) گزارش دادند که بتا- المن (۳۳/۴ درصد)، گاما- المن (۹/۹ درصد)، بی دی جرماسرن (۹/۷ درصد)، کاریوفیلن (۶/۸ درصد) و بی سیکلو ژرماکرن (۵/۲ درصد) عمده‌ترین ترکیبات اسانس برگ چریش جمع‌آوری شده از کشور مصر بود. نتایج حاصل از طیف‌های جرمی گاز کروماتوگرافی اسانس برگ چریش نشان داد که اکثر ترکیبات شناسایی‌شده در اسانس حاوی هیدروکربن‌های طبیعی، ترکیبات فنولیک، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و گلیکوزیدها بودند که درصد بالایی از این ترکیبات از نظر شیمیایی و بیولوژیکی دارای اهمیت هستند. از بخش‌های مختلف گیاه چریش بیش از ۱۰۰ ماده شیمیایی استخراج‌شده است که بیشتر این ترکیبات به گروه ترپن‌ها و فلاونوئیدها و به طور اختصاصی‌تر به لیمونوئیدها تعلق دارند (Kurose and Yatagai, 2005).

میزان فعالیت‌های ضد قارچی اسانس برگ چریش و ترکیبات اصلی بازدارنده بر رشد میسلیومی قارچ‌ها

نتایج حاصل از درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ‌ها در اثر تیمار اسانس برگ چریش و ترکیبات اصلی بازدارنده آن در غلظت ۳۰۰۰ پی پی ام در جدول ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که اسانس برگ گیاه چریش و ترکیبات بتا المن، کاریوفیلن و فیتول در غلظت ۳۰۰۰ پی‌پی‌ام موجب عدم رشد میسلیومی قارچ‌ها شدند. ترکیبات

جدول ۱- ترکیب‌های شناسایی‌شده در اسانس برگ‌های چریش (*Azadirachta indica*) و تأثیر ترکیبات شناسایی‌شده در غلظت ۳۰۰۰ پی پی ام روی درصد بازدارندگی رشد میسلیومی قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum*

Table 2- Identified compounds in essential oil of Neem (*Azadirachta indica*) leaves and effect of the identified compounds in concentration of 3000 parts per million on the percentage inhibition of mycelia growth of *F. graminearum* and *F. culmorum*

Row	Compound name	Retention index*	Abondance %	The percentage inhibition of mycelia growth	
				F. culmorum	*F. graminearum*
1	δ-elemene	1338	5.8	25.3±0.02 b	20.5±0.0 b
2	α-copaene	1377	0.4	0±0 f	0±0 f
3	β-elemene	1391	27.2	100±0 a	100±0 a
4	caryophyllene	1419	15.9	100±0 a	100±0 a
5	γ-elemene	1437	11.2	17.1±0.01 c	8.8±0.05 c
6	γ-muurolene	1452	1.3	0±0 f	0±0 f
7	α-humulene	1455	0.7	0±0 f	0±0 f
8	germacrene D	1485	13.1	13.5±0.02 d	5.3±0.02 d
9	germacrene B	1561	6.5	2.8±0.01 e	1.5±0.05 e
10	phytol	2113	15.3	100±0 a	100±0 a
-	Total	-	97.4	-	-

*Compounds are listed in order of elution from a DB-35 column and based on retention indices. Data are means ± standard error. Different letters indicate significant differences according to Tukey's test at the level $p < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results.

www.SID.ir

Archive of SID

سیگما المن، گاما المن، دی جرماسرن و بی جرماسرن در غلظت ۳۰۰۰ پی پی ام به ترتیب به میزان ۲۰/۵، ۸/۸، ۵/۳ و ۱/۵ درصد موجب کاهش رشد میسلیومی قارچ *F. graminearum* و همچنین به ترتیب به میزان ۲۵/۳، ۱۷/۱، ۱۳/۵ و ۲/۸ درصد موجب کاهش رشد میسلیومی قارچ *F. culmorum* شدند. ترکیبات آلفا کوپائن، گاما موررولن و آلفا هومولن فاقد تأثیر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* بودند (جدول ۱). با توجه به نتایج این آزمایش اسانس برگ گیاه چریش و ترکیبات بتا المن، کاریوفیلن و فیتول که دارای توانایی بازدارندگی کامل از رشد میسلیومی قارچ‌ها بودند انتخاب و جهت آزمایش‌های تکمیلی مورد استفاده قرار گرفتند. مقادیر MIC و IC50 اسانس برگ چریش و ترکیبات اصلی بازدارنده آن در جدول ۲ ارائه شده است. مقادیر مختلفی از MIC و IC50 برای تیمارهای مختلف در برابر رشد میسلیومی قارچ‌ها مشاهده شد. نتایج نشان داد که به‌طور کلی مقادیر MIC و IC50 قارچ‌کش‌ها، اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن در برابر قارچ *F. culmorum* کمتر از قارچ *F. graminearum* بود (جدول ۲ و۳). مقادیر MIC برای اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن بین ۷۵۶ تا ۱۸۹۸ پی پی ام متغیر بود. کمترین مقدار MIC مربوط به فیتول به میزان ۷۹۵ پی پی ام (*F. graminearum*) و ۷۵۶ پی پی ام (*F. culmorum*) بود (جدول ۲). همچنین کمترین و بیشترین مقادیر IC50 برای فیتول و بتا المن به میزان ۳۶۲ پی‌پی‌ام (*F. culmorum*) و ۱۳۵۹پی پی ام (*F. graminearum*) بود. در میان تمام تیمارهای مورد آزمایش قرار گرفته علیه قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* کمترین میزان IC50 و MIC مربوط به فیتول بود (جدول ۲ و ۳).

جدول ۲- فعالیت ضد قارچی اسانس و ترکیبات اصلی آن در مقایسه با قارچ‌کش‌های شیمیایی در برابر رشد میسلیومی *F. graminearum* و *F. culmorum*

Table 2. Antifungal activity of the essential oil and its main constituents compared to synthetic fungicides against mycelial growth of *F. graminearum* and *F. culmorum*

Treatments	Fungi			
	F. culmorum		*F. graminearum*	
Essential oil	IC_{50} (ppm)	MIC (ppm)	IC_{50} (ppm)	MIC(ppm)
Neem	698 d	1579 d	752 d	1898 d
Compounds				
β-elemene	1125 f	2305 f	1359 f	2530 f
caryophyllene	833 e	1812 e	914 e	2174 e
phytol	362 a	756 a	429 a	795 a
Fungicides				
Tilt®	650 c	1300 c	750 c	1500 c
Altocombi®	400 b	800 b	500 b	1000 b

MIC − minimum inhibitory concentration; IC50 − inhibitory concentration 50. Means within a column indicated by the same letter were not significantly different according to Tukey's test at the level $p < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- تجزیه پروبیت برای تعیین مقادیر IC50 برای تیمارهای مختلف *F. culmorum* و *F. graminearum*

Table 3- Probit analysis to determine IC50 values for different treatments of *F. culmorum* and *F. graminearum*

Fungi	Treatments	IC50 (ppm)	Standard error	Lower	Upper	Chi-square	Slope±SE
F. culmorum	Neem	698	42.1	618.9	786.2	128.6	5.2±0.4
	β-elemene	1125	50.1	1030.4	1228.5	161.7	6.7±0.4
	caryophyllene	833	53.8	733.5	947.6	117.4	4.7±0.5
	phytol	362	22.9	318.4	409.4	31.2	5.9±0.4
	Tilt®	650	43.6	569.2	743.2	60.9	4.9±0.2
	Altocomb®	400	27.5	348.9	458.8	48.9	5.4±0.3
F. graminearum	Neem	752	36.7	681.3	826.5	101.8	6.5±0.5
	β-elemene	1359	61.4	1244.5	1487.7	158.5	6.4±0.4
	caryophyllene	914	40.9	836.1	997.7	88.8	6.9±0.4
	phytol	429	25.5	380.7	482.3	40.1	6.5±0.4
	Tilt®	750	50.1	658.9	859.6	84.2	5.2±0.6
	Altocomb®	500	36.5	434.4	581.5	73.6	5.3±0.5

اسانس برگ چریش و برخی از ترکیبات اصلی آن از جمله بتا المن، و فیتول دارای فعالیت ضد قارچی بودند. این نتایج با نتایج گزارش‌شده توسط سایر محققان در مورد فعالیت ضد قارچی اسانس چریش (Catarino et al., 2016; Geraldo et al., 2010)، بتا المن (Taniguchi et al., 2014)، کاریوفیلن (Sabulal et al., 2006) و فیتول (Pejina et al., 2014) مطابقت دارد. Shrivastava and Swarnkar (2014) گزارش کردند که عصاره برگ چریش موجب کاهش رشد میسلیومی قارچ‌های *Aspergillus flavus*، *Alternaria solani* و *Cladosporium* sp. شد. Ghaneian et al. (2015) گزارش کردند که ترکیب فیتول موجب مهار رشد *Aspergillus niger*، *Candida albicans*، *Escherichia coli* و *Staphylococcus aureus* شد. اسانس چریش موجب مهار رشد میسلیومی قارچ‌های *A. flavus*، *Alternaria solani* و *Cladosporium* sp. شد (Adepoju et al., 2014). Mondall et al. (2009) گزارش کردند که عصاره آبی و متانولی برگ چریش به‌طور معنی‌داری موجب کاهش رشد میسلیومی قارچ‌های *A. flavus* و *Rhizopus* sp. شد. Wang et al. (2010) گزارش کردند که عصاره بذر چریش موجب کاهش رشد میسلیومی قارچ‌های *Monilinia fructicola*، *Penicillium expansum*، *Trichothecium roseum* و *Alternaria alternate* و بیماری‌های پس از برداشت ناشی از آنها بر روی آلو و گلابی شد.

این اولین گزارش در مورد اثرات اسانس برگ چریش و ترکیبات اصلی بازدارنده آن از جمله بتا المن، کاریوفیلن و فیتول بر روی رشد میسلیومی، اسپورزایی و مهار جوانه‌زنی اسپور قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* است. در این پژوهش ترکیب فیتول بهترین اثر مهاری را در رشد میسلیومی قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* به میزان کمتر از ۸۰۰ پی‌پی‌ام داشت. نتایج حاصل از پژوهش قبلی در مورد بررسی قدرت تهاجم و بیماریزایی جدایه‌های مختلف *Fusarium* spp. روی گیاهچه، خوشه گندم و قطعات برگی مورد بررسی در این پژوهش، نشان داد که قدرت تهاجم و میزان بیماریزایی جدایه FH1 قارچ *F. graminearum* روی گیاهچه، خوشه گندم و قطعات

www.SID.ir

Archive of SID

برگی بیشتر از جدایه FH39 قارچ *F. culmorum* بود (Khaledi et al., 2017). اگرچه میزان بیماریزایی *F. culmorum* کمتر از *F. graminearum* بود اما حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس، بتا المن، کاریوفیلن و فیتول علیه *F. graminearum* در مقایسه با *F. culmorum* بالاتر بود.

اسانس برگ چریش و فیتول در غلظت MIC به‌طور کامل موجب مهار اسپورزایی و جوانه‌زنی اسپور قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* در مقایسه با کنترل‌ها شد. Geraldo et al. (2010) گزارش کردند که اسانس چریش موجب مهار اسپورزایی و جوانه‌زنی اسپورهای قارچ‌های *Fusarium oxysporum f. sp. medicagenis* و *F. subglutinans* شد. Anjali et al. (2013) گزارش کردند که عصاره آبی چریش موجب مهار جوانه‌زنی اسپورهای قارچ‌های *Curvularia lunata* و *Colletotrichum gloeosporioides* شد. اسانس برگ چریش و فیتول به‌عنوان ماده اصلی آن با ایجاد اختلال در فعالیت‌های فیزیولوژی طبیعی قارچ‌ها از جمله اسپورزایی و جوانه‌زنی اسپورها احتمالاً باعث کنترل و جلوگیری از گسترش آلودگی‌های ناشی از قارچ‌های *Fusarium* spp. می‌شوند.

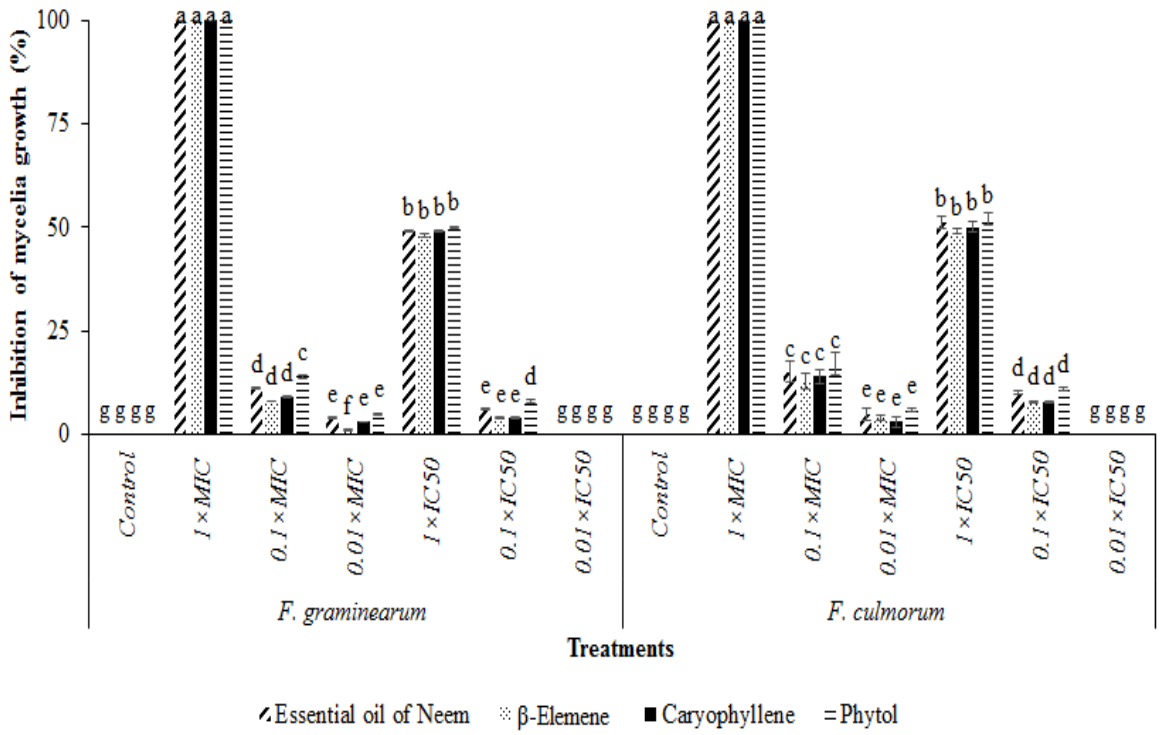
بررسی اثر قارچ‌کشی و یا قارچ ایستایی اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن نشان داد که اسانس و ترکیبات بتا المن، کاریوفیلن و فیتول علیه قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* دارای خاصیت قارچ ایستایی بودند. مقادیر MIC به دست آمده برای فیتول به‌طور قابل‌توجهی پایین‌تر از مقادیر به‌دست‌آمده برای قارچ‌کش‌های شیمیایی از جمله پروپیکونازول و سایپروکونازول + کاربندازیم بود. فعالیت ضد قارچی اسانس برگ چریش و ترکیبات اصلی بازدارنده آن با افزایش غلظت آن‌ها افزایش‌یافته است. حداقل غلظت مهارکنندگی اسانس برگ چریش و ترکیبات بتا المن، کاریوفیلن و فیتول برای مهار رشد قارچ‌ها متفاوت بود. مقادیر IC50 و MIC به دست آمده برای فیتول به‌طور قابل‌توجهی پایین‌تر از مقادیر به دست آمده برای اسانس، بتا المن، کاریوفیلن و پروپیکونازول و سایپروکونازول + کاربندازیم بود. نتایج ما نشان داد که ممکن است بتوان از اسانس برگ چریش و فیتول به‌عنوان عوامل بیولوژیکی قوی، به جای قارچ‌کش‌های شیمیایی برای کاهش و یا کنترل قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* استفاده کرد.

نتایج حاصل از بررسی اثر قارچ‌کشی و یا قارچ ایستایی اسانس و ترکیبات بتا المن، کاریوفیلن و فیتول نشان داد که اسانس و این ترکیبات علیه قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* دارای خاصیت قارچ ایستایی بودند. مقادیر MIC قارچ‌کش‌های شیمیایی از جمله پروپیکونازول و سایپروکونازول + کاربندازیم علیه *F. graminearum* به ترتیب ۱۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام و علیه *F. culmorum* به ترتیب ۱۳۰۰ و ۸۰۰ پی‌پی‌ام بود که مقدار آن بیشتر از فیتول ولی کمتر از اسانس، بتا المن و کاریوفیلن بود (جدول ۲).

تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن بر رشد قارچ‌ها در جدول ۴ نشان داده‌شده است. میزان بازدارندگی از رشد قارچ‌ها وابسته به غلظت اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن است. غلظت MIC×۱ و IC50×۱ اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن بدون تفاوت معنی‌داری با یکدیگر علیه قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* مؤثر بودند. کمترین سطح فعالیت ضد قارچی برای اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن در غلظت MIC×۰/۰۱ علیه قارچ‌های *F. graminearum* و *F. culmorum* مشاهده شد. در غلظت IC50×۰/۰۱ اسانس و ترکیبات بتا المن، کاریوفیلن و فیتول به طور معنی داری باعث هیچ‌گونه اثر مهارکننده بر رشد میسلیومی قارچ‌ها نشد (شکل ۱).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱- تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس و ترکیبات اصلی آن روی مهار رشد میسلیومی± خطای استاندارد *F. graminearum* و *F. culmorum*

Figure 1. Effects of different concentrations of essential oil and its main constituents on the mycelial growth ± SE of *F. graminearum* and *F. culmorum*.
Different letters indicate significant differences according to Tukey's test at the level $p < 0.05$.

میزان فعالیت‌های ضد قارچی اسانس برگ چریش و ترکیبات اصلی بازدارنده آن بر اسپورزایی و جوانه‌زنی اسپور

نتایج حاصل از درصد مهار اسپورزایی و جوانه‌زنی اسپور قارچ‌ها *F. graminearum* و *F. culmorum* در اثر تیمار اسانس برگ چریش و ترکیبات اصلی بازدارنده آن در جدول ۴ نشان داده‌شده است. نتایج حاصل از شمارش اسپورهای قارچ‌ها *F. graminearum* و *F. culmorum* در غلظت‌های مختلف اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن در مقایسه با شاهد نشان داد که اسانس و فیتول در غلظت ۱×MIC موجب کاهش ۱۰۰ درصدی اسپورزایی قارچ‌ها می‌شوند (جدول ۴). جوانه‌زنی اسپورهای قارچ‌ها در ۲۴ ساعت پس از تلقیح، کاملاً توسط اسانس و فیتول در غلظت ۱×MIC در مقایسه با شاهد مهار شد (جدول ۴).

اثرات هم‌افزایی بین ترکیبات اسانس

به‌منظور بررسی اثرات متقابل ترکیبات اصلی بازدارنده برگ چریش در شرایط آزمایشگاهی از روش چکربورد رقیق‌سازی در محیط مایع استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده، اثرات هم‌افزایی بین بتا المن، کاریوفیلن و فیتول مشاهده شد و هیچ اثر آنتاگونیستی بین ترکیبات اسانس مورد آزمایش مشاهده نشد. بالاترین سطح سینرژیستی به ترکیبی از فیتول و کاریوفیلن به میزان ۰/۱۳۸ (*F. culmorum*) بود (جدول ۵).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۴ - اثر غلظت‌های مختلف اسانس برگ چریش و ترکیبات اصلی آن بر روی درصد مهار اسپورزایی و مهار جوانه‌زنی اسپور ± خطای استاندارد قارچ‌ها *F. graminearum* و *F. culmorum*

Table 4. Effects of various concentrations of essential oil of neem leaves and its main constituents on inhibition of sporulation and spore germination of *F. graminearum* and *F. culmorum*

Fungi	Concentrations	Percentage inhibition of sporulation			
		Essential oil	β-elemene	caryophyllene	phytol
F. graminearum	Control	0.2±0.01 g (a)	0.1±0.02 g (b)	0.1±0.01 g (b)	0.1±0.01 f (b)
	1×MIC	100±0 a (a)	64.63±0.28 a (c)	73.22±0.39 a (b)	100±0 a (a)
	0.1×MIC	11.15±0.85 c (b)	6.78±0.23 c (c)	11.02±0.35 c (b)	15.98±2.77 c (a)
	0.01×MIC	4.21±0.39 e (b)	2.05±0.14 e (d)	3.24±0.11 e (c)	7.48±0.32 d (a)
	1×IC50	43.89±1.59 b (b)	25.01±0.77 b (d)	34.91±2.31 b (c)	50.09±3.09 b (a)
	0.1×IC50	5.44±0.19 d (b)	3.53±0.03 d (d)	4.52±0.17 d (c)	8.04±0.35 d (a)
	0.01×IC50	0.42±0.05 f (a)	0.19±0.02 f (b)	0.25±0.08 f (b)	0.42±0.01 e (a)
F. culmorum	Control	0.1±0.03 g (c)	0.1±0.01 g (c)	0.2±0.02 g (b)	0.3±0.03 g (a)
	1×MIC	100±0 a (a)	68.71±0.55 a (c)	78.36±0.32 a (b)	100±0 a (a)
	0.1×MIC	13.37±0.59 c (b)	7.45±0.09 c (c)	12.72±0.62 c (b)	17.5±3.25 c (a)
	0.01×MIC	4.55±0.07 e (b)	2.07±0.02 e (d)	3.85±0.06 e (c)	7.66±0.35 e (a)
	1×IC50	44.11±1.42 b (b)	27.47±3.32 b (d)	36.64±2.69 b (c)	50.23±4.48 b (a)
	0.1×IC50	6.89±0.14 d (b)	3.89±0.11 d (d)	4.76±0.24 d (c)	8.55±0.37 d (a)
	0.01×IC50	0.46±0.06 f (a)	0.12±0.01 f (c)	0.28±0.02 f (b)	0.47±0.06 f (a)
		Percentage inhibition of spore germination			
F. graminearum	Control	0.1±0.01 g (a)	0.1±0.02 f (a)	0.1±0.03 g (a)	0.1±0.01 f (a)
	1×MIC	100±0 a (a)	62.42±0.33 a (c)	73.05±0.18 a (b)	100±0 a (a)
	0.1×MIC	13.98±0.36 c (b)	8.72±0.45 c (c)	10.15±0.48 c (b)	15.76±0.14 c (a)
	0.01×MIC	4.55±0.98 e (b)	1.98±0.68 e (c)	4.08±0.43 e (b)	8.15±0.52 d (a)
	1×IC50	42.77±1.44 b (b)	30.25±2.35 b (c)	38.79±2.87 b (b)	51.11±1.07 b (a)
	0.1×IC50	6.71±0.5 d (b)	3.88±0.37 d (d)	5.07±0.39 d (c)	9.09±0.89 d (a)
	0.01×IC50	0.56±0.07 f (a)	0.1±0.06 f (b)	0.38±0.12 f (a)	0.55±0.05 e (a)
F. culmorum	Control	0.2±0.04 g (a)	0.1±0.01 f (b)	0.2±0.05 f (a)	0.1±0.02 f (b)
	1×MIC	100±0 a (a)	72.65±0.15 a (c)	84.27±.45 a (b)	100±0 a (a)
	0.1×MIC	15.55±0.79 c (b)	9.85±0.3 c (d)	12.33±0.17 c (c)	18.27±0.36 c (a)
	0.01×MIC	5.17±0.32 e (b)	2.62±0.09 e (c)	4.78±0.6 d (b)	8.98±0.33 d (a)
	1×IC50	46.05±3.25 b (b)	31.42±2.77 b (d)	42.65±3.14 b (c)	52.73±2.39 b (a)
	0.1×IC50	7.25±0.66 d (b)	4.21±0.17 d (d)	5.36±0.42 d (c)	9.43±0.25 d (a)
	0.01×IC50	0.63±0.05 f (a)	0.11±0.02 f (b)	0.5±0.28 e (a)	0.63±0.08 e (a)

MIC − minimum inhibitory concentration; IC50 − inhibitory concentration 50. Means within a column (row) indicated by the same letter were not significantly different according to Tukey's test at the level $p < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۵- شاخص غلظت مهارکننده کسری اجزای اسانس برگ چریش علیه *F. graminearum* و *F. culmorum*

Table 5. The fractional inhibitory concentration index (FICI) of constituents of essential oil of neem leaves against *F. graminearum* and *F. culmorum*

Fungi	Compounds	Fractional inhibitory concentration index	Activity
F. graminearum	β-elemene × caryophyllene	1.753	indifferent
	β-elemene × phytol	0.797	additive
	caryophyllene × phytol	0.372	synergistic
F. culmorum	β-elemene × Caryophyllene	1.695	indifferent
	β-elemene × phytol	0.624	additive
	caryophyllene × phytol	0.138	synergistic

در این پژوهش اثرات هم‌افزایی در ترکیب فیتول و کاریوفیلن، فیتول و بتا المن و بتا المن و بتا المن مشاهده شد. ترکیب فیتول با کاریوفیلن دارای فعالیت سینرژیستی و در ترکیب با فیتول با کاریوفیلن با بتا المن دارای فعالیت افزایشی علیه قارچ‌های مورد بررسی بودند. Pavithra et al. (2018) گزارش کردند که بین ترکیبات فیتول و کاریوفیلن اثر هم‌افزایی به‌صورت افزایشی وجود داشت. ترکیبات ترپنوئیدی موجود در اسانس چریش دارای فعالیت سینرژیستی هستند (Ospina Salazar et al., 2015). استفاده از ترکیبی مؤثر از ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس می‌تواند منجر به کاهش حداقل غلظت مهارکنندگی و گسترش طیف فعالیت ضد قارچی آنها شود.

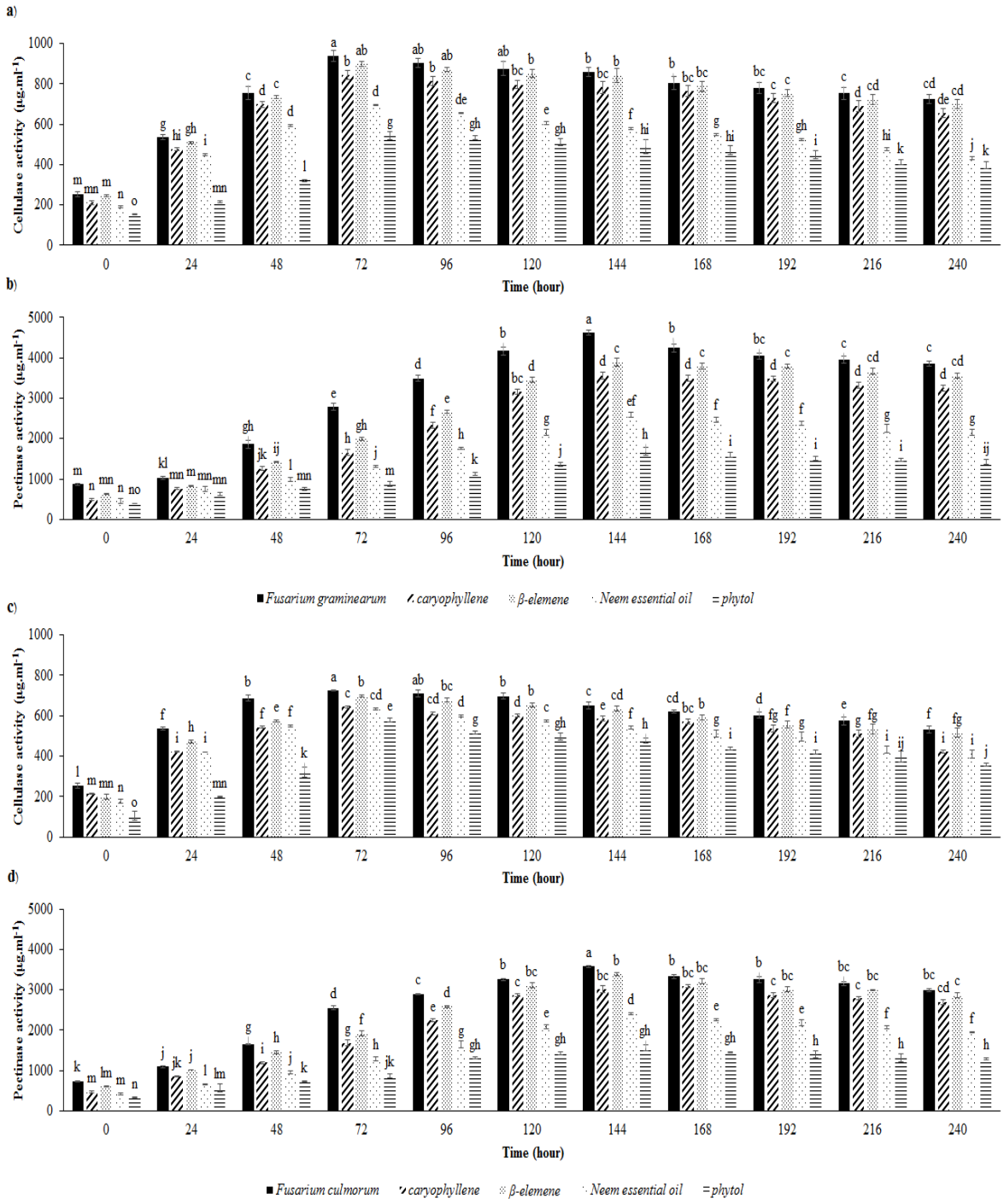
ارزیابی تأثیر اسانس برگ چریش و ترکیبات اصلی بازدارنده آن بر روی فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده

نتایج حاصل از روند تغییرات اثر اسانس برگ چریش و ترکیبات اصلی بازدارنده آن روی فعالیت آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز توسط قارچ‌ها در شکل ۲ نشان داده‌شده است. اسانس برگ چریش و ترکیبات بتا المن، کاریوفیلن و فیتول موجب کاهش میزان فعالیت آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز ترشح‌شده توسط قارچ‌ها *F. graminearum* و *F. culmorum* شدند (شکل ۲). نتایج ما نشان می‌دهد که اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن توانایی متفاوتی در کاهش فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده دارند که ممکن است به علت ترکیب شیمیایی آنها باشد. حداکثر فعالیت سلولاز و پکتیناز قارچ‌ها به ترتیب ۷۲ و ۱۴۴ ساعت پس از کشت در محیط مایع بود و پس از آن کاهش یافت. به‌طور کلی، بیشترین کاهش فعالیت آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز ترشح‌شده قارچ‌ها *F. graminearum* و *F. culmorum* در تیمار فیتول و پس از آن اسانس، کاریوفیلن و بتا المن مشاهده شد. ترکیب فیتول در مقایسه با اسانس بیشتر موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز قارچ‌ها شد. میزان فعالیت‌های آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز قارچ‌ها تحت تیمار اسانس و ترکیبات بتا المن، کاریوفیلن و فیتول در زمان‌های مختلف مورد بررسی کمتر از شاهد بود (شکل ۲). کاهش معنی‌داری در فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده توسط قارچ‌ها تحت تأثیر تیمارها نسبت به شاهد مشاهده شد. بنابراین، در این تحقیق کاهش فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده توسط قارچ‌ها ممکن است بیانگر فرایند پیچیده اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن در کاهش بیماری‌زایی باشد.

قارچ‌های بیمارگر گیاهی جهت نفوذ در دیواره سلولی، آنزیم‌هایی را تولید می‌کنند که توانایی تخریب پلیمرهای دیواره سلولی از جمله سلولز، زایلان و پکتین را دارند. قارچ‌های بیمارگر گیاهی به این آنزیم‌ها در حین مراحل نفوذ و گسترش در میزبان نیاز دارند (Gibson et al., 2011).

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- اثر اسانس برگ چریش، بتا المن، کاریوفیلن و فیتول بر روی فعالیت سلولاز (a)، فعالیت پکتیناز (b) ترشح‌شده توسط *F. graminearum* و فعالیت سلولاز (c)، فعالیت پکتیناز (d) ترشح‌شده توسط *F. culmorum*.

Figure 2. Effect of essential oil leaves of Neem, β-elemene, caryophyllene and phytol on pectinase (a) and cellulase (b) activity of secreted by *F. graminearum* and on pectinase (c) and cellulase (d) activity of secreted by *F. culmorum*.

Data are means ± standard error. Different letters indicate significant differences according to Tukey's test at the level $p < 0.05$. The experiment was repeated three times with similar results.

www.SID.ir

Archive of SID

تریکوتسین‌ها و آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی در بیماریزایی *Fusarium* spp. در گیاهان اهمیت دارند (Khaledi et al., 2017). مطالعات انجام‌شده در مورد قارچ‌های *Verticillium dahliae*، *Sclerotinia sclerotiorum*، *Magnaporthe grisea*، *Rhizoctonia solani*، *Macrophomina phaseolina* و *Fusarium* spp. نشان داد که رابطه مستقیمی بین آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی و میزان بیماریزایی این قارچ‌ها وجود دارد (Khaledi et al., 2017; Khaledi et al., 2015; Martinez-Soto et al., 2013; Asoufi et al., 2007). بررسی‌ها نشان داد که اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن قادر به کاهش فعالیت آنزیم‌های سلولز و پکتیناز ترشح‌شده قارچ‌ها *F. graminearum* و *F. culmorum* بودند. به‌طور کلی، اسانس برگ چریش و ترکیبات بتا المن، کاریوفیلن و فیتول در اکثر زمان‌های مورد بررسی موجب کاهش سطح فعالیت سلولز و پکتیناز ترشح‌شده قارچ‌ها شدند. این نتایج مشابه با نتایج گزارش‌شده توسط سایر محققان بود. Khaledi et al. (2015) گزارش کردند که اسانس *Mentha piperita* L.، *Bunium persicum* (Boiss.) B.Fedtsch. و *Thymus vulgaris* L. موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های پکتیناز و سلولز ترشح‌شده توسط *Macrophomina phaseolina* و *R. solani* شده و میزان بیماریزایی آنها را کاهش دادند. Abd-El-Khair and El-Gamal Nadia (2011) گزارش کردند که عصاره‌های آبی گیاهان مختلف ضمن کاهش رشد میسلیومی *Fusarium solani* و *R. solani* به طور قابل توجهی موجب مهار فعالیت‌های آنزیم پلی‌گالاکتوروناز و سلولاز ترشح‌شده شد. اسانس *Bunium persicum* ضمن کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز و موجب کاهش بیماریزایی *Colletotrichum lindemuthianum* شد (Khaledi and Hassani, 2018).

مشاهدات ما نشان داد که با آنکه در غلظت IC50×۰/۰۱ اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن هیچ تأثیری بر روی رشد میسلیومی قارچ‌ها نداشته‌اند اما به‌صورت معنی‌داری موجب کاهش سطح فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده توسط قارچ‌ها از جمله سلولاز و پکتیناز شده‌اند. قدرت تهاجم و بیماریزایی جدایه‌های قارچ *Fusarium* در ارتباط با مکانیسم‌های مختلف دخیل در بیماریزایی ازجمله تولید آنزیم‌های خارج سلولی و مایکوتوکسین‌هاست (Ortega et al., 2013). بررسی‌های انجام‌شده در پژوهش قبلی نشان داد که ارتباط قوی بین شدت بیماری و میزان فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی وجود داشت (Khaledi et al., 2017). در نتیجه هر عاملی که موجب کاهش فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی شوند ممکن است موجب کاهش میزان بیماری‌زایی و قدرت تهاجم قارچ‌ها شود. نتایج پژوهش ما نشان داد که کاهش فعالیت آنزیم‌های مخرب دیواره سلولی ترشح‌شده به‌عنوان بخشی از مکانیسم‌های درگیر در کاهش بیماریزایی قارچ‌ها *F. graminearum* و *F. culmorum* دارای اهمیت است. تحقیقات در مورد مکانیسم‌های سرکوب بیماری توسط عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهی نشان می‌دهد که ترکیبات مؤثر آنها ممکن است به‌طور مستقیم روی بیمارگر عمل کند و یا با فعال‌سازی پاسخ‌های دفاعی در گیاهان میزبان منجر به کاهش پیشرفت بیماری شود (Abdel-Monaim et al., 2011; Kagale et al., 2011).

نتایج ما همچنین نشان داد که اسانس و ترکیبات اصلی بازدارنده آن با کاهش فعالیت آنزیم‌های سلولاز و پکتیناز موجب کاهش مکانیسم‌های بیماریزایی قارچ‌ها شدند. این نتایج تأیید می‌کنند که فعالیت ضد قارچی اسانس چریش نتیجه فعالیت‌های هم‌افزایی ترکیبات اسانس آن بوده و میزان فعالیت ضد قارچی اسانس را می‌توان به مجموعه عملکرد ترکیبات سازنده اسانس نسبت داد. در مجموع می‌توان از اسانس برگ چریش و

www.SID.ir

Archive of SID

فیتول به‌عنوان ماده اصلی آن به‌عنوان جایگزینی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی برای کنترل قارچ‌ها استفاده نمود. پژوهش حاضر نشان داد که می‌توان از اسانس برگ چریش و فیتول با فرمولاسیون مناسب جهت کنترل قارچ‌ها*F. graminearum* و *F. culmorum* و بیماری‌های ناشی از آنها استفاده نمود. با توجه به نتایج به دست آمده ضرورت دقت عمل بیشتر برای شناسایی ترکیبات شیمیای اسانس‌های گیاهی به‌منظور جایگزینی با سموم شیمیایی برای جلوگیری از گسترش عوامل بیماری‌زا و افزایش خسارت در سطح وسیع الزامی است. به‌طور کلی کاربرد اسانس‌های گیاهی حاوی مواد بیوشیمیایی فعال، به‌عنوان جایگزین مناسب برای قارچ‌کش‌های شیمیایی امری منطقی و مقرون به‌صرفه است و با توجه به بی‌خطر بودن کاربرد اسانس‌ها و ترکیبات آنها برای انسان و محیط زیست می‌توان از آنها و یا اجزا تشکیل‌دهنده آنها برای کنترل قارچ‌ها استفاده نمود.

سپاس‌گزاری

نگارندگان از مساعدت و همکاری موسسه تحقیقات ثبت و گواهی بذر و نهال جهت انجام این تحقیق قدردانی می نمایند.

REFERENCES

Abd-El-Khair, H., and El-Gamal Nadia, G. 2011. Effects of aqueous extracts of some plant species against *Fusarium solani* and *Rhizoctonia solani* in *Phaseolus vulgaris* plants. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 44(1): 1-16.

Abdel-Monaim, M. F., Abo-Elyousr, K. A. M., and Morsy, K. M. 2011. Effectiveness of plant extracts on suppression of dampingoff and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). Crop Protection, 30(2): 185-191.

Adams, R. P. 2001. Identification of essential oil components by gas chromatography mass spectroscopy. Illinois Allured Publication Corporation, P. 456.

Adepoju, A. O., Ogunkunle, A. T., and Femi-Adepoju, A. G. 2014. Antifungal activities of seed oil of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.). Global Journal of Biology, Agriculture & Health Sciences, 3(1): 106-109.

Anjali, K., Ritesh, K., Sudarshan, M., Jaipal, S. C., and Kumar, S. 2013. Antifungal efficacy of aqueous extracts of neem cake, karanj cake and vermicompost against some phytopathogenic fungi. The Bioscan, 7: 671-674.

Anonymous. 1987. POLO-PC. A user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software, Berkeley CA.

Asoufi, H., Hameed, K. M., and Mahasneh, A. 2007. The cellulase and pectinase activities associated with the virulence of indigenous *Sclerotinia sclerotiorum* isolates in Jordan Valley. The Plant Pathology Journal, 23: 233-238.

Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., and Morse, S. A. 2007. Medical microbiology; 24th ed. New York: McGraw-Hill, P. 818.

www.SID.ir

Archive of SID

Catarino, A. D. M., Rodrigues, A. A. C., De Queiroz, J. V. J., Furtado, L. M., and Silva, L. L. S. S. 2016. *In vivo* antifungal activity of neem oil and aqueous extracts against leaf spot disease caused by *Cercospora abelmoschii* on okra. Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 20: 33-38.

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews, 12: 564-582.

Dastan, D., Pezhmanmehr, M., Askari, N., Ebrahimi, S. N., and Hadian, J. 2010. Essential oil compositions of the leaves of *Azadirachta indica* A. Juss from Iran. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 13(3): 357-361.

Davies, N. W. 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. Journal of Chromatography A, 503: 1-24

Deng, Y., Shi, D., Yin, Z., Guo, J., Jia, R., Xu, J., Song, X., Lv, C., Fan, Q., Liang, X., Shi, F., Ye, G., and Zhan, W. 2012. Acaricidal activity of petroleum ether extract of neem (*Azadirachta indica*) oil and its four fractions separated by column chromatography against *Sarcoptes scabiei* var. *cuniculi* larvae *in vitro*. Experimental Parasitology, 130: 475-477.

Dixon, R. A. 2001. Natural products and plant disease resistance. Nature, 4119: 843-847.

El-Hawary, S. S., El-Tantawy, M. E., Rabeh, M. A., and Badr, W. K. 2008. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Azadirachta indica* A. Juss. International Journal of Applied Research in Natural Products, 6(4): 33-42.

Geraldo, M. R. F., Arroteia, C. C., and Kemmelmeier, C. 2010. The effects of neem [*Azadirachta indica* A. Juss (meliaceae)] oil on *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicagenis* and *Fusarium subglutinans* and the production of fusaric acid toxin. Advances in Bioscience and Biotechnology, 1-6.

Ghaneian, M. T., Ehrampoush, M. H., Jebali, A., Hekmatimoghaddam, S., and Mahmoudi, M. 2015. Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. Environmental Health Engineering and Management Journal, 2: 13-16.

Gibson, D. M., King, B. C., Hayes, M. L., and Bergstrom, G. C. 2011. Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion. Current Opinion in Microbiology, 14(3): 264-270.

Goswami, R. S., and Kistler, H. C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. Molecular Plant Pathology, 5: 515-525.

www.SID.ir

Archive of SID

Gutierrez, J., Barry-Ryan, C., and Bourke, P. 2008. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. International Journal of Food Microbiology, 124(1): 91-97.

Hasanzadeh, N. 2005. Technological implication of natural products in plant diseases management with special emphasis on fire blight. Journal of agricultural of sciences, 11: 53-67.

Kagale, S., Marimuthu, T., Kagale, J., Thayumanavan, B., and Samiyappan, R. 2011. Induction of systemic resistance in rice by leaf extracts of *Zizyphus jujuba* and *Ipomoea carnea* against *Rhizoctonia solani*. Plant Signaling and Behavior, 6(7): 919−923.

Khaledi, N., and Hassani, F. 2018. Antifungal activity of *Bunium persicum* essential oil and its constituents on growth and pathogenesis of *Colletotrichum lindemuthianum*. Journal of Plant Protection Research, 58: 431-441.

Khaledi, N., Taheri, P., and Falahati-Rastegar, M. 2017. Identification, virulence factors characterization and analysis virulence together with aggressiveness of *Fusarium* spp., causing wheat head blight in Iran. European Journal of Plant Pathology, 147: 897-918.

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

Kikot, G. E., Hours, R. A., and Alconada, T. M. 2009. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. Journal of Basic Microbiology, 49: 231-241.

Kurose, K., and Yatagai, M. 2005. Components of the essential oils of *Azadirachta indica* A. Juss, *Azadirachta siamensis* Velton and *Azadirachta excels* (Jack) Jacobs and their comparison. Journal of Wood Science, 51: 183-188.

Martinez-Soto, D., Robledo-Briones, A. M., Estrada-Luna, A. A., and Ruiz-Herrera, J. 2013. Transcriptomic analysis of *Ustilago maydis* infecting *Arabidopsis reveals* important aspects of the fungus pathogenic mechanisms. Plant Signaling & Behavior, 8: 25-59.

Mohammedi Z., and Atik, F. 2013. Fungitoxic effect of natural extracts on mycelial growth, spore germination and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*. Australian Journal of Crop Science, 7(3): 293−298.

Mondali, N. K., Mojumdar, A., Chatterje, S. K., Banerjee, A., Datta, J. K., and Gupta, S. 2009. Antifungal activities and chemical characterization of Neem leaf extracts on the growth of some selected fungal species in vitro culture medium. Journal of Applied Sciences and Environmental Management, 13: 49-53.

Muller-Riebau, F., Berger, B., and Yegen, O. 1995. Chemical composition and fungi toxic properties to phytopathogenic fungi of essential oils of selected aromatic plants growing in Turkey. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43: 2262-2266.

www.SID.ir

Archive of SID

Murray, T. D., Parry, D. W., and Cattlin, N. D. 2009. Diseases of small grain cereal crops. Manson Publishing Ltd. P. 142.

Nathan, S.S. Kalaivani, K., and Murugan, K. 2005. Effects of neem limonoids on the malaria vector *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Acta Tropica, 96: 47-55.

Nayeemulla Shariff, M., Sudarshana, S., Umesha, S., and Hariprasad, P. 2006. Antimicrobial activity of *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callusextracts. African Journal of Biotechnology, 5: 946-950.

Ortega, L. M., Kikot, G. E., Astoreca, A. L., and Alconada, T. M. 2013. Screening of *Fusarium graminearum* isolates for enzymes extracellular and deoxynivalenol production. Journal of Mycology, 358140: 1-7.

Ospina Salazar, D. I., hoyos Sánchez, R. A., Orozco Sánchez, F., Arango Arteaga, M. and Gómez Londoño, L. F. 2015. Antifungal activity of neem (*Azadirachta indica*: Meliaceae) extracts against dermatophytes. Acta Biológica Colombiana, 20(3): 201-207.

Pavithra, P. S., Mehta, A., and Verma, R. S. 2018. Synergistic interaction of β-caryophyllene with aromadendrene oxide 2 and phytol induces apoptosis on skin epidermoid cancer cells. Phytomedicine, 47: 121-134.

Pejina, B., Savica, A., Sokovicb, M., Glamoclijab, J., Ciricb, A., Nikolicb, M., Radotica K., and Mojovicc, M. 2014. Further *in vitro* evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. Natural Product Research, 28: 372-376.

Pitaroki, D., Tzakou, O., Loukis, A., and Harvala, C. 2003. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soil-borne pathogens. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 3249-3301.

Plodpai P., Chuenchitt S., Petcharat V., Chakthong S., and Voravuthikunchai S.P. 2013. Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action. Crop Protection, 43: 65-71.

Ramesh. P., and Okigbo, R. N., 2008. Effects of plants and medicinal plant combinations as anti-infective. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2(7): 130-135.

Sabulal, B., Dan, M., John, A., Kurup, R., Pradeep, N. S., Valsamma, R. K., and Varughese, G. 2006. Caryophyllene-rich rizome oil of *Zingiber nimmonii* from South India: Chemical characterization and antimicrobial activity. Phytochemistry, 67(22): 2469-2473.

Sadeghi, A. 1996. Studying of *Bemisia tabaci* susceptibility to chemical pesticides and neem and examination of its behavioral characteristics and reactions to neem and light traps. M.Sc. thesis, Oroumiyeh University.

www.SID.ir

Archive of SID

Scherm, B., Balmas, V., Spanu, F., Pani, G., Delogu, G., Pasquali, M., and Migheli, Q. 2013. *Fusarium culmorum*: causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. Molecular Plant Pathology, 14: 323-341.

Shrivastava, D.K., and Swarnkar, K. 2014. Antifungal Activity of leaf extract of Neem (*Azadirachta Indica* Linn). International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences, 3(5): 305-308.

Siripornvisal, S. 2010. Antifungal activity of ajowan oil against *Fusarium oxysporum*. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Current Applied Science and Technology Journal, 10(2): 45-51.

Taniguchi, S., Miyoshi, S., Tamaoki, D., Yamada, S., Tanaka, K., Uji, Y., Tanaka, S., Akimitsu, K., and Gomi, K. 2014. Isolation of jasmonate-induced sesquiterpene synthase of rice: Product of which has an antifungal activity against *Magnaporthe oryzae*. Journal of Plant Physiology, 171(8): 625-632.

Thompson, D. P. 1989. Fungitoxic activity of essential oil components on food storage fungi. Mycologia, 81(1): 151-153.

Turgis M., Vu, K. D., Dupont, C., and Lacroix, M. 2012. Combined antimicrobial effect of essential oils and bacteriocins against foodborne pathogens and food spoilage bacteria. Food Research International, 48(2): 696-702.

Voigt, C. A., Schäfer, W., and Salomon, S. 2005. A secreted lipase of *Fusarium graminearum* is a virulence factor required for infection of cereals. The Plant Journal, 42: 364-375.

Wang, J., Li, J., Cao, J., and Jiang, W. 2010. Antifungal activities of neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on postharvest diseases in fruits. African Journal of Microbiology Research, 4(11): 1100-1104.

Zhao, Z., Liu, H., Wang, C., and Xu, J. R. 2013. Comparative analysis of fungal genomes reveals different plant cell wall degrading capacity in fungi. BMC Genomics, 14: 274.

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

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of antifungal activity of neem essential oil and its constituents on growth performance and its enzyme effectiveness on pathogenicity to *Fusarium* spp.

N. Khaledi[1*] and F. Hassani[2]

1. *Corresponding Author: Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran (khnm13@gmail.com)
2. Assistant Professor, Seed and Plant Certification and Registration Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

(DOI): 10.22055/PPR.2019.15469

Received: 27 December 2019 Accepted: 29 March 2020

Abstract

Background and Objectives

The genus *Fusarium* has a worldwide distribution and many of its species, especially *Fusarium graminearum* Schwabe and *Fusarium culmorum* (W.G. Smith) Saccardo can infect a wide range of host plants and cause a variety of economically important diseases. The aim of this study was to identify the constituents of essential oil from leaves of native neem tree (*Azadirachta indica* A.Juss.) and their effect on growth performance and activity of cell wall degrading enzymes produced by these pathogens.

Materials and Methods

The leaves of neem tree were obtained from Iranshahr region of Sistan and Baluchestan province and dried in the shade. The essential oil was extracted by hydrodistillation using a clevenger apparatus and its major constituents were identified by gas chromatography-mass spectrometry.

Results

The major constituents in the essential oil were β-elemene (27.2%), caryophyllene (15.9%) and phytol (15.3%), which have antifungal effects against *F. graminearum* and *F. culmorum*. The results showed that although the pathogenicity of *F. culmorum* was lower than *F. graminearum*, but the minimum inhibitory concentration of essential oil, β-elemene, caryophyllene and phytol against *F. graminearum* was higher than *F. culmorum*. Sporulation and spores germination of *Fusarium* spp. were completely inhibited by essential oil and phytol. Synergistic effects of the main constituents of essential oil showed that combining phytol with caryophyllene induced a synergistic activity against *Fusarium* spp. and in combination with β-elemene caused an additive effect. Activities of cellulase and pectinase, as main cell wall degrading enzymes were decreased by essential oil and its main constituents at low concentration without affecting mycelial growth of fungi studied.

Discussion

The findings of this research showed that there is a possibility of using neem oil and phytol compound to control diseases caused by *Fusarium* species.

Keywords: Neem, Fusarium spp., Synergistic effects, Minimum inhibitory concentration, Pectinase, Cellulose, Phytol

www.SID.ir