پژوهش‌های کاربردی در گیاه‌پزشکی/ جلد ۷ شماره ۱/ سال ۱۳۹۷

بررسی خاصیت ضدقارچی چند عصاره‌ی گیاهی از گیاهان بومی شمال ایران بر روی بیمارگر *Penicilluim digitatum*

ستاره حبیب زاده*[1] و فرید بیکی[2]

۱-استادیار دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، دانشکده علوم پایه، بابل، ایران.
۲- استادیار موسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران.
*مسئول مکاتبات: habibzadeh@nit.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۹/۲۰

چکیده

Penicillium digitatum، عامل بیماری کپک سبز مرکبات، یکی از مهم‌ترین بیمارگرهای ایجاد کننده پوسیدگی میوه در مرکبات می‌باشد که خسارت قابل توجهی به محصول وارد می‌سازد. متاسفانه استفاده مکرر از ترکیبات شیمیایی، ضمن ایجاد اثرات مخرب بر روی انسان و محیط زیست سبب بروز جدایه‌های مقاوم بیمارگر نیز می‌شود. امروزه، استفاده از آفت‌کش‌های زیستی نظیر آنتاگونیست‌ها و ترکیبات طبیعی گیاهی، جایگزینی بادوام برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت می‌باشد. در این بررسی، توانایی عصاره های حاصل از تعدادی از گیاهان بومی که در شمال کشور پراکنش نسبتا خوبی دارند به عنوان یک آفت‌کش طبیعی در کنترل بیمارگر *P. digitatum*، مورد ارزیابی قرار گرفت. از عصاره‌های متانولی این گیاهان برای بررسی‌های آزمایشگاهی و گلخانه‌ای به‌ترتیب بر روی محیط کشت[1] (PDA) با روش دیسک کاغذی و روی میوه‌ی پرتقال رقم واشنگتن ناول با روش غوطه‌ور نمودن در عصاره‌ها، استفاده شد. نتایج نشان داد با وجود اینکه در روش آزمایشگاهی، تعدادی از عصاره‌های گیاهی ناحیه بازدارندگی از رشد را در اطراف دیسک کاغذی، ایجاد کردند، اما در شرایط انباری، تنها گیاه سرخاب کولی بود که به‌طور معنی‌داری مانع از تولید اسپور توسط قارچ *P. digitatum* شد. با جداسازی اجزاء عصاره‌ی سرخاب کولی با استفاده از ستون کروماتوگرافی و با کمک حلال‌های غیر قطبی هگزان، نیمه قطبی دی‌اتیل اتر و قطبی متانول و تعیین خلوص آن‌ها با کمک[2] (TLC) ، ۱۱ جزء خالص حاصل شد. نتایج میزان تاثیر هر جزء بر بیمارگر کپک سبز در شرایط آزمایشگاهی نشان داد که عامل موثر در این عصاره را می‌توان با کمک حلال قطبی متانول استخراج نمود.

واژه‌های کلیدی: کپک سبز، سرخاب کولی، مرکبات، واشنگتن ناول، عصاره گیاهی.

مقدمه[1]

کپک سبز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های مولد پوسیدگی میوه در مرکبات است که توسط بیمارگر *Penicillium digitatum* ایجاد می‌شود. اسپورهای این بیمارگر قاردند از طریق زخم وارد میوه شده و سبب شایع‌ترین و مخرب‌ترین بیماری‌های پس از برداشت میوه مرکبات شوند (مارکوس و همکاران، ۲۰۰۵). این بیمارگر در کلیه‌ی مناطق مرکبات کاری دنیا یافت شده و در مراحل برداشت، انتقال و انبارداری و نیز در مراحل پس از آن، سبب آلودگی و تخریب میوه می‌شوند. تولید اتیلن توسط این بیمارگر که به عنوان هورمون رسیدگی نیز تلقی می‌شود، سبب افزایش تنفس میوه و تسریع در تغییر رنگ میوه شده و در نتیجه آن، سرعت و میزان پوسیدگی میوه افزایش می‌یابد (بیاله ۱۹۴۰). در این بیماری بسته به گونه مرکبات، حدود ٪۳۰-۱۰ خسارت وارد می‌شود (آراس ۱۹۹۶ a, b). البته در مناطقی که

[1]Potato Dextrose Agar
[2]Thin-layer Chromatography

Archive of SID
www.SID.ir

مراحل برداشت بطور صحیح صورت نگیرد، شاید خسارت در مراحل حمل و نیز انبارداری به بیش از ۵۰٪ نیز برسد (تریپاتی و دوبی ۲۰۰۴). حتی گزارش شده است که این بیماری می‌تواند در طی حمل و نقل در مراحل پس از برداشت، تا ۹۰٪ محصول را نیز از بین ببرد (ماکاریزین و همکاران، ۲۰۰۷). در سالیان گذشته، برای پیشگیری و مبارزه با این بیماری از سموم مختلفی استفاده شده است . به دلیل مصرف مکرر قارچ‌کش‌های ایمازالیل، تیابندازول، سدیم‌ارتوفنیل‌فنات و یا پیری‌متانیل جدایه‌های مقاوم بیمارگر نیز تظاهر پیدا کرده اند (کینای و همکاران ۲۰۰۷، زیاو و همکاران ۲۰۱۶). از طرف دیگر، بقایای این سموم بر روی سطوح میوه‌ها و بروز انواع بیماری‌های احتمالی در اثر مصرف مکرر غذاهای آلوده به سموم فوق‌الذکر، سبب شده تا اهداف کلان برای مبارزه با بیمارگرها، به سمت موارد جایگزین سموم سوق یابد (آراس ۱۹۹۶ الف) لذا استفاده از روش‌های کنترل غیر شیمیایی، به‌خاطر کاهش آلودگی‌های زیست محیطی و نیز همسو بودن با کشاورزی پایدار، بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در سال‌های اخیر موارد متعددی از عوامل طبیعی نظیر میکروارگانیسم‌های آنتاگونیست، ترکیبات طبیعی بعنوان جایگزینی برای کنترل بیماری‌های پس از برداشت مطرح شده است و استفاده از عصاره‌های گیاهی، یکی از نمونه‌های آن می‌باشد (اوباگو و کورستن ۲۰۰۳) وجود ترکیبات ضدمیکروبی در عصاره‌های گیاهی از چندین دهه قبل، مشخص شده است و تا چند سال اخیر از بین ۲۵۰/۰۰۰ گونه گیاهان عالی موجود در دنیا، ٪۱۵-۵ از آنها جهت بررسی وجود خواص درمانی، مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (روجاس و همکاران ۲۰۰۳). کلیه‌ی ترکیبات ضدمیکروبی در گیاهان را می‌توان به پنج گروه اصلی شامل ترکیبات فنلی، ترپنوییدها و اسانس‌ها، آلکالوییدها، لکتین و پلی‌پپتیدها و نیز پلی‌استیلن‌ها تقسیم‌بندی نمود (کوان ۱۹۹۹). البته ترکیبات دیگری از جمله پلی‌آمین ها (گیسمن، ۱۹۶۳)، ایزوتیوسیانات‌ها (ایوو و همکاران ۱۹۹۱)، تیوسولفینات‌ها (تادا و همکاران ۱۹۸۸) و گلوکوزیدازها (موراکامی و همکاران ۱۹۹۳) را نیز می‌توان نام برد که دارای اثرات ضد میکروبی می‌باشند.

در سال‌های اخیر در خصوص اثرات ضد قارچی عصاره‌های گیاهی بر روی گونه‌های *Penicillium* ، تحقیقات گسترده‌ای انجام گرفته است که می‌توان گل ابری (*Ageratum conyzoides*) (دیکسیت و همکاران ۱۹۹۴)، سیر (*Allium sativum*) (اوباگو و کورستن ۲۰۰۳)، آویشن (*Thymus vulgaris*) و درخت صمغ سنگالی (*Acacia senegal*) (مکبیب و همکاران ۲۰۰۶)، علف لیمو (*Cymbopogen citratus*) ، شاه‌پسند دشتی (*Lantana camara*) و اکالیپتوس (*Euclyptus rostrata*) (عبدالخیر و اومیما ۲۰۰۶)، بذر انبه هندی (*Carica papaya*) (بوتیستا و همکاران ۱۹۹۴)، عصاره‌ی گیاه فردوسی (*Erythrina coralloides*) (ویتساید و همکاران ۱۹۸۹)، گل سنا (*Senna Alata*) (آدایو و همکاران ۱۹۹۹)، عصاره‌های بذر و برگ گیاه چنار(*Plantus* sp.) (بوتیستا و همکاران ۲۰۰۳)، گیاه روناس (*Rubia tinctorum*) ، گردو (*Juglans regia*) وگلرنک (*Carthamus tinctorius*) (محرابیان و همکاران ۲۰۰۰)، عصاره‌های گیاه حرا (*Avicennia marina*) (علی‌زاده و همکاران، ۲۰۱۶)، بتاکاربولین گیاه اسپند(*Peganum harmala*) (اولمدو و همکاران ۲۰۱۷)، رزماری (*Rosmarinus officinalis*) (هندل و همکاران، ۲۰۱۶) را نام برد. در ایران گونه‌های گیاهی متنوعی انتشار دارد که این فلور غنی بیش از ۷۵۰۰ گونه گیاهی را در بر می‌گیرد (امید بیگی، ۱۳۷۹). این گیاهان اغلب از دیر باز توسط بشر شناخته شده و مورد استفاده قرار گرفته‌اند. با توجه به این که از نیمه‌ی دوم قرن اخیر، تحقیقات فارماکودینامیک وسیعی روی گیاهان داروئی در بیشتر کشورهای جهان انجام گرفته و بویژه در چند سال اخیر کشفیات مهمی روی ترکیبات ناشناخته‌ی گیاهان مذکور حاصل شده است (عبادی، ۲۰۰۶)، لذا مطالعه بر روی مواد موثره داروئی در بین گیاهان موجود در سرزمین ایران نیز بسیار مورد نیاز است و می‌بایست همسو با تحولات نوین جهانی محصولات طبیعی جایگزین از فلور منطقه تهیه و مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه‌های گیاهی از طبیعت

Archive of SID

www.SID.ir

از مهم‌ترین گیاهان رویشی موجود در مناطق مختلف شمال کشور که دارای گسترش وسیع در منطقه بوده‌اند، اندام‌های مختلف اعم از برگ و گل جمع‌آوری و به آزمایشگاه دانشکده شیمی دانشگاه مازندران منتقل گردید (جدول ۱). برای شناسایی نیز، نمونه‌هایی به هرباریوم موسسه تحقیقات گیاهپزشکی ارسال شدند.

عصاره‌گیری

جهت استحصال عصاره از گیاهان مورد بررسی، پس از خشک کردن اندام‌های گیاهی در شرایط طبیعی، مقدار ۲۵ گرم از گیاه پودر شده، به مدت ۲۴ ساعت درون حلال خیسانده شد. در این مرحله بطور جداگانه از سه حلال غیر قطبی هگزان، حلال نیمه قطبی دی‌تیل‌اتر و محلول متانول و آب با نسبت یک به نه استفاده شد. پس از یک روز هرکدام از مخلوط‌ها ابتدا با قیف بوخنر صاف گردیده و حلال پرانی شدند سپس تاثیر عصاره‌های بدست آمده بر روی قارچ مورد نظر آزمایش گردید.

جدول ۱- مشخصات گیاهان مورد استفاده در این بررسی

نام فارسی	نام علمی	نام تیره		نمونه برداری		
				زمان	مکان	اندام مصرفی
کلزا	*Brassica napus*	تیره شب بو	Brassicaceae	بهار	آمل	برگ
لرگ	*Pterocarya fraxifolia*	تیره گردو	Juglandaceae	تابستان	بابل	برگ
بارهنگ	*Plantago major*	تیره بارهنگ	Plantaginaceae	تابستان	بابل	برگ
گلپرایرانی	*Heracleum percicum*	تیره چتریان	Apiaceae	بهار	ارتفاعات رامسر	برگ
گل گاوزبان	*Borago officinalis*	تیره گاوزبان	Boraginaceae	بهار	ارتفاعات تنکابن	برگ
بومادران	*Achillea millefolia*	تیره کاسنی	Asteraceae (Composita	بهار	ارتفاعات رامسر	اندام‌هوائی
گل شیپوری	*Arum orientalis*	تیره شیپوری	Araceae	بهار	ارتفاعات تنکابن	برگ
سرخاب کولی	*Phytolacca Americana*	تیره‌سرخدانگان	Phytolaccaceae	تابستان	ارتفاعات نشتارود	برگ
گوش‌بره	*Phlomis* sp.	تیره نعناع	Labiatae	بهار	ارتفاعات رامسر	برگ
تره‌تیزک‌آبی	*Nasturium officinalis*	تیره چلیپایان	Cruciferae	بهار	تنکابن	اندام‌هوائی

تهیه‌ی سوسپانسیون قارچی

زادمایه‌ی اولیه‌ی قارچی گونه‌ی *P. digitatum* از موسسه‌ی تحقیقات مرکبات تهیه و پس از خالص‌سازی مجدد به روش تک اسپور کردن، قطعاتی از میسلیوم قارچ برروی محیط غذایی عصاره‌ی سیب زمینی دکستروز آگار، همراه با کلرامفنیکل کشت داده شده و تشتک های پتری به مدت چهار روز در انکوباتور با دمای ۲۵ ^{o}C قرار گرفت. با کمک لام هماسیتومتر، سوسپانسیونی با غلظت ۱×۱۰^{۶} اسپور در میلی‌لیتر، تهیه شد.

اثبات بیماریزائی بیمارگر

برای اثبات بیماری‌زائی، در ابتدا میوه‌ها با کمک اتانول ٪۷۰ بطور سطحی استریل شد. سپس بر روی میوه سوراخی به قطر و عمق سه میلی‌متر ایجاد شد سپس با کمک سمپلر ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون مربوطه در درون سوراخ‌های ایجاد شده بر روی میوه مرکبات، ریخته شده و میوه‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در داخل پلاستیک با رطوبت بالای ۹۰٪ به مدت سه روز نگهداری شدند. برای تیمار شاهد نیز از آب مقطر استریل استفاده شد.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی اثرات ضدقارچی عصاره‌های استخراج شده در شرائط محیط کشت مصنوعی

برای ارزیابی تاثیر ضدقارچی عصاره‌ها، ۵۰ میکرولیتر سوسپانسیون حاوی اسپورهای قارچ بیمارگر با غلظت ۱×۱۰^{۵} اسپور، بر روی محیط غذائی PDA به‌صورت چمنی کشت داده شد به‌طوری که اسپورهای بیمارگر تقریبا بطور یکنواخت در کل تشتک کشت پخش شوند. ۰/۰۲گرم از هر عصاره، در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر استریل بصورت سوسپانسیون درآمده و با کمک فیلتر ۲۲ میکرومتر استریل شدند. سپس ۱۲ میکرولیتر از عصاره‌ی گیاهی حاصل بر روی دیسک کاغذی استریل به قطر شش میلی‌متر اضافه شده و پس از خشک شدن، دیسک آغشته به عصاره بر روی محیط کشت قرار گرفت. این آزمایش در قالب یک طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد و برای تیمار شاهد نیز از آب مقطر استریل استفاده گردید.

بررسی اثرات ضدقارچی عصاره‌های استخراج شده در شرائط انباری

برای بررسی اثرات ضدقارچی عصاره‌های استخراج شده در شرائط گلخانه‌ای، از میوه‌ی پرتقال رقم تامسون استفاده شد. در زمان برداشت، مشخصات شاخص رسیدگی آن‌ها نظیر درصد کل مواد جامد محلول یا درجه‌ی بریکس معادل ۱۳، درصد اسید قابل تیتر برابر ۳۱/۶۴ و مقدار نسبت آن‌ها برابر ۰/۴۱ ، در موسسه‌ی تحقیقات مرکبات کشور، تعیین شد. میوه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، با اتانول ۷۰٪ به مدت یک الی دو دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. ابتدا سوراخ‌هایی به قطر پنج میلی‌متر و به ارتفاع دو میلی‌متر با کمک چوب پنبه سوراخ‌کن بر روی میوه ایجاد شده و سپس میوه‌ها به مدت دو دقیقه در داخل سوسپانسیون عصاره های گیاهی، قرار داده شدند. میوه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند تا خشک شوند سپس با کمک سمپلر، ۱۰ میکرولیتر سوسپانسیون بیمارگر با غلظت ۱×۱۰^{۵} اسپور در میلی‌لیتر درون سوراخ‌های حفر شده بر روی میوه‌ی مرکبات، ریخته شده و میوه‌ها در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و در داخل پلاستیک با رطوبت ۹۰٪ ، به مدت شش روز نگهداری شدند. برای تیمار شاهد نیز از آب مقطر استریل استفاده شد. از آنجائی‌که باغداران از قارچکش گروه بنزیمیدازول برای شستشوی میوه استفاده می‌کنند، لذا در بررسی فوق از قارچکش تیابندازول به عنوان نماینده‌ای از این گروه به عنوان تیمار شاهد مقایسه‌ای استفاده شد. به ازاء هر تکرار در هر تیمار، ۱۰ عدد میوه در نظر گرفته شد. پس از شش روز، برای تعیین میزان کارآئی عصاره‌ها، میوه‌های تیمارشده در داخل بشری حاوی یک لیتر آب مقطر استریل همراه با توئین ۸۰ با غلظت (v/v) ٪ ۰/۱ قرار گرفته و به مدت یک ساعت با استفاده از شیکر تکان داده شد تا اسپورهای قارچی وارد آب استریل گردد. با کمک هماسیتومتر، میزان غلظت اسپورهای موجود در سوسپانسیون‌ها تعیین شد .

جداسازی اجزاء عصاره‌ی برتر با کمک ستون کروماتوگرافی

پس از بررسی‌های مقدماتی در خصوص اثرات ضدقارچی عصاره‌ها مشخص گردید که عصاره‌ی متانولیک گیاه سرخاب کولی بیشترین اثر ضدقارچی را دارا بود لذا برای تفکیک اجزاء آن، از کروماتوگرافی ستونی با فاز ساکن سیلیکاژل استفاده شد. به عصاره مقداری پودر سیلیکاژل مخصوص ستون کروماتوگرافی به همراه اتر اضافه گردید و عمل حلال پرانی جهت خشک شدن کامل عصاره‌ها انجام شد. به این ترتیب عصاره بطور کامل جذب سیلیکاژل شده و پودر زرد سبز تیره‌رنگی به‌دست آمد. ستون کروماتوگرافی با استفاده از سوسپانسیون سیلیکاژل در هگزان پر گردید. عصاره‌ی آماده شده به ستون اضافه گردید. برای جداسازی مواد طبیعی موجود در عصاره که دارای قطبیت متفاوتی می‌باشند، لازم است قطبیت شستشودهنده‌ی ستون به تدریج از غیر قطبی به قطبی تغییر یابد. بنابراین از هگزان نرمال که کاملاً غیر قطبی است شروع و سپس با افزودن مقادیر مشخصی از دی‌اتیل‌اتر، قطبیت حلال به تدریج افزایش داده شد. برای ایجاد قطبیت بیشتر از حلال متانول استفاده شد. جدول ۲، نسبت و حجم حلال‌های مورد استفاده در عمل

Archive of SID

www.SID.ir

جداسازی را به طور کامل نشان می‌دهد. برای تعیین میزان خلوص هر جزء نیز از روش کروماتوگرافی لایه نازک استفاده شد.

جدول ۲- ترتیب نسبت درصد حلال‌های مورد استفاده در هر ۱۰۰ میلی‌لیتر، جهت جداسازی اجزا عصاره با استفاده از ستون کروماتوگرافی

ردیف	هگزان	دی اتیل اتر	متانول
۱	۱۰۰	۰	۰
۲	۸۰	۲۰	۰
۳	۶۰	۴۰	۰
۴	۵۰	۵۰	۰
۵	۴۰	۶۰	۰
۶	۳۰	۷۰	۰
۷	۲۰	۸۰	۰
۸	۱۰	۹۰	۰
۹	۰	۱۰۰	۰
۱۰	۰	۹۸	۲
۱۱	۰	۹۵	۵
۱۲	۰	۹۰	۱۰
۱۳	۰	۷۵	۲۵
۱۴	۰	۵۰	۵۰
۱۵	۰	۰	۱۰۰

بررسی اثرات ضد قارچی اجزاء جدا شده بر روی محیط غذائی

برای یافتن اینکه کدام جزء از موثرترین عصاره‌ی مورد بررسی، تاثیر ضدقارچی بیشتری دارد، مجدداً آزمایشی مشابه با روش پیشین انجام شد. در این مرحله از ۱۵ نسبت حلال به کار رفته مطابق جدول ۲، خلوص ترکیب خروجی از ستون کروماتوگرافی، با استفاده ازکروماتوگرافی لایه نازک (Thin Layer Chromatography-TLC)، ارزیابی شدند که در مجموع ۱۱ جزء خالص و مجزا از یکدیگر، حاصل شد. برای بررسی میزان تولید هاله بازدارنده از رشد توسط این ۱۱ جزء خالص به دست آمده به همراه عصاره‌ی کامل تفکیک نشده بر روی بیمارگر کپک سبز مرکبات، مجددا آزمونی بر روی تشتک کشت PDA، در قالب طرح کاملا تصادفی و با سه تکرار برای هر تیمار انجام شد، برای تیمار شاهد نیز از آب مقطر استریل استفاده گردید.

نتایج و بحث

اثبات اصول کخ

در خصوص اثبات بیماری‌زائی بیمارگر بر اساس اصول کخ، چهار روز پس از تزریق سوسپانسیون بیمارگر به میوه، علائم بیماری مشاهده گردید.

آزمایشات بازدارنگی از رشد بر روی تشتک غذایی

با جداسازی عصاره‌های گیاهی با کمک حلال متانول و بررسی کارآئی آن‌ها در ممانعت از رشد بیمارگر، نتایج تجزیه وتحلیل در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی نشان داد که تعداد معدودی از عصاره‌ها، تاثیر نسبتاً خوبی در جلوگیری از رشد قارچ *P. digitatum* داشته‌اند و نتایج حاصل از تجزیه واریانس آنها بیانگر معنی‌دار شدن اثرات ضدقارچی آنها، در سطح احتمال یک درصد بود. نتایج گروه‌بندی میانگین‌ها با روش دانکن، نشان داد عصاره‌های گیاهی از نظر تاثیر در چهار گروه مجزا قرار می‌گیرند (جدول۳)

آزمایشات بازدارنگی از رشد بر روی میوه

پس از تهیه‌ی عصاره‌های گیاهی و انجام آزمایشات ضد قارچی آنها در شرایط آزمایشگاهی، بررسی‌های تکمیلی بر روی میوه انجام شد. نتایج آزمایشات بررسی میزان تاثیر عصاره‌ها جهت کنترل کپک سبز مرکبات، نشان داد هیچ کدام از عصاره‌ها با غلظت مورد استفاده قادر به بازداری از بیماریزائی بیمارگر نبودند اما میزان شدت بیماری‌زایی با یکدیگر تفاوتی آشکار را نشان می‌داد (شکل ۱).

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۳- مقایسه میانگین میزان تولید هاله بازدارنده از رشد قارچ ***Penicillium digitatum*** توسط عصاره‌های گیاهی مختلف مورد بررسی در آزمایش با کمک آزمون دانکن در سطح احتمال یک درصد

نام فارسی عصاره	میانگین قطر هاله بازدارندگی(میلی‌متر)	گروه‌بندی دانکن
سرخاب کولی	۲۲/۵۳	a
لرگ	۱۲	b
بومادران	۷	c
گل گاوزبان	۰	d
گلپرایرانی	۰	d
تره‌تیزک‌آبی	۰	d
گوش‌بره	۰	d
کلزا	۰	d
بارهنگ	۰	d
تره‌تیزک‌آبی	۰	d
گل شیپوری	۰	d
آب	۰	d

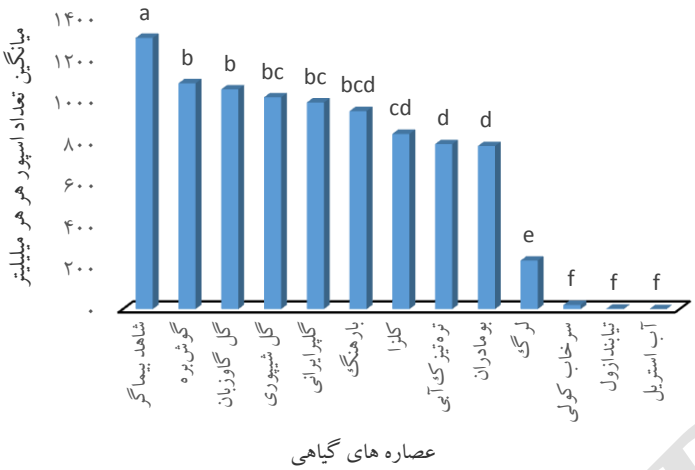
نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آزمون بازدارندگی از میزان اسپور تولیدی مشخص کرد که برخی از عصاره‌های گیاهان مورد بررسی، تاثیر نسبتا خوبی در جلوگیری از تولید اسپور توسط بیمارگر داشتند، بطوریکه جدول تجزیه واریانس آن‌ها، بیانگر معنی‌دار شدن اثرات ضدقارچی آن‌ها، در سطح احتمال یک درصد بود. میانگین تیمارها با استفاده از روش دانکن، در هشت گروه مجزا گروه‌بندی شدند.

در بررسی اثرات ضدقارچی بر روی میوه‌ها در شرائط گلخانه‌ای نیز مشخص شد در بین عصاره‌ها، تنها عصاره‌ی گیاه سرخاب کولی تا حد مطلوبی موثر بود. عصاره‌ی این گیاه بر روی رشد اسپورهای بیمارگر تاثیری کمی داشته و اسپورها قادر بودند رشد کرده و تولید میسلیوم کنند اما در مرحله‌ی بعدی یعنی در تولید اسپور دچار اختلال می شدند (شکل شماره ۵). هرچند بطور کامل تاثیر بازدارنگی بر روی بیمارگر اعمال نشده اما بدلیل اینکه یکی از عواملی که در انبارهای میوه میزان خسارت را افزایش می‌دهد، تولید اسپورهائی است که تحت عنوان اینوکلوم ثانویه قلمداد می‌شوند، از اینرو عصاره‌ی سرخاب کولی، سبب کاهش چشمگیری در میزان اینوکلوم ثانویه بیماری می‌گردد. بررسی‌ها با کمک هماسیتومتر و شمارش تعداد اسپورها نیز موید همین نکته بود (شکل۱).

سرخاب‌کولی توانست تولید اسپورهای ثانویه را در حد مصرف سم قارچکش تیابندازول کاهش دهد، با این تفاوت که سم تیابندازول حتی مانع از رشد قارچ شده بود ولیکن این گیاه تاثیری بر روی رشد بیمارگر نداشته و صرفاً از تولید اسپور و شروع چرخه‌های ثانویه جلوگیری کرده است. اولین بار نیکل در سال ۱۹۵۹ بود که اثرات ضد قارچی گیاه سرخاب کولی (*Phytolacca americana*) را گزارش نمود (نیکل ۱۹۵۹). البته از این گونه در سال‌های بعد نیز گزارش تاثیر ضدقارچی ارائه شد (کوبایاشی و همکاران، ۱۹۹۵). در سال‌های بعد نیز محققین به نتایج مشابهی دست یافته‌اند. به عنوان مثال گانگ هوا گائو (گوانگ هو و همکاران۲۰۰۱)، مشخص نمود که در بذور گیاه *P. americana* پپتیدهائی متشکل از ۳۸ اسیدآمینه یافت می‌شود که بر روی طیف وسیعی از فعالیتهای قارچ موثر بوده و قادر است برخی از بیمارگرهای گیاهی و نیز تعداد معینی از قارچهای ساپروفیت را از بین ببرد.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۱- مقایسه میانگین میزان تولید اسپور در قارچ *Penicillium digitatum* در اثر کاربرد عصاره‌های مختلف گیاهی در سطح میوه‌ها با استفاده از روش دانکن در سطح احتمال یک درصد

همچنین گزارش شده که این گونه دارای پروتئینی است که دارای خاصیت ضد ویروس است (زوبنکو و همکاران ۲۰۰۰). از گونه‌های دیگر این تیره گونه *P. tetramera* می‌باشد که بخاطر داشتن مواد ساپونین بر روی قارچهای بیمارگر فرصت‌طلب، موثر می‌باشد(اسکالانت و همکاران ۲۰۰۲). گونه *P. dioica* (کیروگا و همکاران ۲۰۰۱) نیز از دیگر گونه‌های این جنس است که در گذشته از آنها به عنوان گیاهان دارای خاصیت ضدقارچی نام برده شده است.

شکل۵- تولید اسپور فراوان توسط بیمارگر در تیمار با سوسپانسیون بیمارگر (میوه‌های سمت راست) و عدم تولید اسپور توسط بیمارگر در اثر استفاده از عصاره سرخاب کولی (میوه‌های سمت چپ)

لرگ از تیره‌ی گردو نیز از جمله گیاهانی است که بصورت جنگلی در ارتفاعات پائین جنگل‌های شمال ایران رویش می‌یابد (کامل و همکاران, ۱۳۸۱) هرچند این گیاه تنها در مرحله‌ی آزمایشگاهی بر روی کپک سبز مرکبات کمی موثر بود اما در مرحله‌ی گلخانه‌ای تاثیر چندان چشمگیری نداشته است. در گزارشی به اثرات ضد قارچی ریشه‌های گلپر البته گونه *Heracleum maximum* اشاره شده است (وبستر و همکاران ۲۰۰۶). در منابع گزارشاتی مبنی بر اثرات ضدقارچی بارهنگ، گل‌گاو زبان، گل شیپوری، گوش‌بره و تره‌تیزک آبی گزارش نشده است.

بررسی جزء موثر در گیاه سرخاب کولی

نتایج بررسی‌های مقدماتی در خصوص اثرات ضدقارچی عصاره‌ها نشان داد که عصاره‌ی گیاه سرخاب‌کولی بیشترین تاثیر ضدقارچی را در بین سایر عصاره‌های گیاهی مورد بررسی دارا می‌باشد. عصاره-های گیاهی منابع غنی‌ای از ترکیبات فیتوشیمی با خواص

Archive of SID

www.SID.ir

ضدمیکروبی شناخته شده می‌باشند. بنابراین بسیاری از این گیاهان به دلیل داشتن چنین خصوصیاتی که حاصل سنتز در متابولیسم ثانویه می‌باشند، مورد استفاده قرار می‌گیرند. از ترکیبات موثر می‌توان ساپونین، آلکالوییـد، استرویید، فلاوونویید، تانن ، فنل و ترکیبات کربوهیدارت رانام برد که قسمت اصلی بسیاری از عصاره‌های گیاهی را تشکیل می‌دهد (اکینمی، ۲۰۰۰). از این رو به دلیل تنوع ترکیبات موجود در عصاره‌های گیاهی، نوع حلال مورد استفاده نقش مهمی را در استحصال آن ترکیب دارا می‌باشد(آمزاد حسین و ناگورو، ۲۰۱۱). در این بررسی جهت تفکیک جزء یا اجزاء موثر در عصاره‌ی گیاه سرخال کولی با استفاده از ستون کروماتوگرافی، از سه حلال قطبی، نیمه قطبی و غیر قطبی با نسبت‌های اشاره شده مطابق جدول شماره دو، استفاده شد. نتایج کرموتوگرافی لایه نازک (TLC) نشان داد محصول ستون کروماتوگرافی را می‌توان به ۱۱ جزء خالص تفکیک نمود. نتایج ارزیابی توانایی هر جزء در میزان تولید هاله‌ی بازدارنده از رشد قارچ *P. digitatum* بر روی تشتک کشت حاوی PDA ، نشان داد اجزا اولیه‌ای که در ستون کروماتوگرافی با حلال‌های غیر قطبی هگزان یا نیمه قطبی دی اتیل اتر جداشده بودند، تاثیر چندانی در تولید هاله‌ی بازدارنده از رشد نداشته و یا می‌توان گفت که کلاً بی تاثیر بوده‌اند. اما اجزایی که در انتهای ستون کروماتوگرافی و با کمک حلال قطبی متانول به تنهائی استخراج گشته‌اند، نسبت به سایرین، در بازدارندگی بیمارگر موثرتر بوده است. به عبارتی می‌توان بیان نمود که اجزاء موثر در عصاره‌ی سرخاب کولی خاصیت قطبی داشته و می‌توان توسط حلال‌های قطبی نظیر متانول استحصال نمود. نتایج بررسی‌های پیشین نیز نشان داد عصاره‌ی متانولی سرخاب کولی بر روی برخی بیمارگرهای قارچی دارای اثرات ضدقارچی می باشد. نظیر تاثیر عصاره‌ی متانولی گونه *P. americana* بر روی بیمارگرهای بلاست برنج (*Magnaporthe oryzae*)، کپک خاکستری گوجه فرنگی (*Botrytis cinerea*)، Late Blight گوجه (*Phytophthora infestans*) (باجاپی و همکاران، ۲۰۱۲). تحقیقات گذشته نشان داده که با کمک حلال متانول می‌توان ترکیباتی نظیر آلکالوییـد، فلاونوییـد و ساپونین را از مجموعه‌ی عصاره‌ی گیاهی استخراج کرد (آلابری و همکاران، ۲۰۱۴). فلاون‌ها ترکیبات فنلی هستند که که توسط گیاه در پاسخ به آلودگی میکروبی ساخته می‌شوند و به نظر می‌رسد بر روی طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها موثر باشند. به دلیل طبیعت چربی دوستی فلاونوییدها، احتمالا نقطه اثر آنها اختلال در غشاء سلولی و دیواره سلولی قارچ‌ها باشد (تسوچیا، ۱۹۹۶). ساپونین ترکیبات ثانویه‌ای هستند که در طیف وسیعی از گونه‌های گیاهی یافت می‌شوند. آنها بصورت پیش ماده‌های غیر فعال هستند که به سرعت پس از حمله‌ی بیمارگرها بصورت آنتی بیوتیک‌های فعال بیولوژیکی درآمده و از گیاه محافظت می‌کند(رنوو همکاران، ۲۰۰۳). تری‌ترپن که نوعی از ساپونین‌ها محسوب می‌گردد، در گیاه سرخاب کولی به نام فیتولاکا ساپونین هم معروف می‌باشد از ریشه‌های این گیاه بدست می‌آید(ونگ و همکاران، ۲۰۰۸) گیاه سرخاب کولی بومی امریکای شمالی بوده ولی در اروپای مرکزی و مناطق مدیترانه به وفور یافت می‌شود. نتایج بررسی اجزاء تشکیل دهنده‌ی عصاره‌ی متانولی برگ گیاه *P. americana* ، نشان داد مقادیر زیادی ترکیبات پلی فنل ، فلاونوییـد و مشتقات هیدروکسی سیانامیک در این نوع عصاره یافت می‌شود (ژلوا دمیتورا، ۲۰۱۳). صرف نظر از خواص ضدمیکروبی، ترکیبات فیتوشیمی موجود در گیاهان که به عنوان فعال بیولوژیکی نیز محسوب می‌شوند داری خواصی از جمله آنتی‌اکسیدان و خواص ضد سرطان نیز می‌باشند (امزاد حسین و همکاران، ۲۰۱۱). گیاه سرخاب کولی نیز به دلیل داشتن خواص آنتی اکسیدان، ضد ویروس، ضدمیکروبی، ضد سرطان (پاجپای و همکاران، ۲۰۱۲) مصرف آن در طب سنتی برخی از کشورها از جمله در کره، مرسوم می‌باشد (یان و کیم، ۲۰۱۰). در مجموع برای شناخت دقیق‌تر ترکیبات موثر به‌دست آمده از عصاره‌ی متانولی این گیاه مطالعات بیشتر مورد نیاز می‌باشد، و به دلیل پراکنش خوب این گیاه در مناطق شمالی کشور، می‌توان از آن در کشاورزی پایدار و در راستای کاهش مصرف سموم نیز استفاده نمود.

Archive of SID

www.SID.ir

منابع

امید بیکی، ر. ۱۳۹۰. تولید و فرآوری گیاهان دارویی، انتشارات آستان قدس رضوی، مشهد، جلد اول، ویرایش سوم. ۱۱۹۱ص.

کامل ک.، حاج محمدی ر و تاج بخش م. ۱۳۸۱. اندازه گیری ۵-هیدروکسی- ۱،۴-نفتوکینون (ژوگلون) در برگ و ساقه درخت لرگ به روش RP-HPLC. 100. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. ۸۰ ص.

Abd-El-Khair H and Omima MH, 2006. Effect of aqueous extracts of some medicinal plants in controlling the green mould disease and improvement of stored "washington" navel orange quality. Journal of Applied Sciences Research. 2: 664-674.

Akinyemi K. 2000. Antibacterial screening of five nigerian medicinal plants against *Salmonella typhi* and *S. paratyphi*. Journal of the Nigerian Infection Control Association. 3: 30-33.

Alabri T H A, Al Musalami AHS, Hossain M A, Weli AM and Al-Riyami Q. 2014. Comparative study of phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial capacities of fresh and dry leaves crude plant extracts of *Datura metel* L. Journal of King Saud University-Science. 26: 237-243.

Alizadeh BB, Tabatabaei YF, Shahidi F and Riazi F, 2016. Antifungal effect of the aqueous and ethanolic *Avicennia marina* extracts on *Alternaria citri* and *Penicillium digitatum*. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences. 18: 1-6.

Amzad Hossain MA and Nagooru MR. 2011. Biochemical profiling and total flavonoids contents of leaves crude extract of endemic medicinal plant Corydyline terminalis L. Kunth. Pharmacognosy Journal. 3: 25-30.

Arras G, 1996 a. Inhibitory action of Micro-organisms isolated from citrus fruit against *Penicillium digitatum*. P. 456-460. 8th International citrus congress. Sun City, South Africa.

Arras G, 1996 b. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange friuts. Postharvest Biology and Technology. 8: 191-198.

Bajpai, VK, Baek KH, Kim ES, Han JE, Kwak MH, Oh KH and Choi GJ. 2012. *In vivo* antifungal activities of the methanol extracts of invasive plant species against plant pathogenic fungi. The Plant Pathology Journal. 28: 317-321.

Bautista-Baños S, Hernández-López M and Bosquez-Molina E, 2004. Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. Revista Mexicana de Fitopatologia. 22: 178-186.

Biale J, 1940. Effect of emanations from several species of fungi on respiration and color development of citrus fruits. Science (Washington). 91: 458-9.

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

Dixit S, Chandra H, Tiwari R and Dixit V, 1994. Development of a botanical fungicide against blue mould of mandarins. Journal of Stored Products Research. 31: 165-172.

Ebadi M. 2006. Pharmacodynamic basis of herbal medicine. CRC press. 699 p.

Escalante AM, Santecchia CB, Lo´pez SN, Gattuso MA, Gutie´rrez A and Monache FD, 2002. Isolation of antifungal saponins from *Phytolacca tetramera*, an *Argentinean* species in critic risk. Journal of Ethnopharmacology. 82: 29-34.

Geissman TA. 1963. Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds, p. 265, In: M. Florkin and E. H. Stotz (ed.), Pyrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolic plant constituents, vol. 9. Elsevier, New York, N.Y

Archive of SID

www.SID.ir

Guang-Hua G, Wei L, Ji-Xun D, Jin-Feng W, Zhong H and Ying Z, 2001. Molecular scaffold of a new pokeweed antifungal peptide deduced by 1H nuclear magnetic resonance nternational. Journal Biological Macromolecules. 29: 251-258.

Hendel N, Larous L and Belbey L, 2016. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its in vitro inhibitory effect on *Penicillium digitatum*. International Food Research Journal. 23: 1725-1732.

Iwu MW, Unaeze NC, Okunji CO, Corley DG, Sanson DR and Tempesta MS, 1991. Antibacterial aromatic isothiocyanates from the essential oil of *Hippocratea welwitschii* roots. International journal of pharmacognosy. 29: 154-158.

Kinay P, Mansour MF, Gabler FM, Margosan DA,. and Smilanick JL, 2007. Characterization of fungicide-resistant isolates of *Penicillium digitatum* collected in California. Crop Protection. 26: 647-656.

Kobayashi A, Kohtatsu H and Kajiyama S, 1995. Antifungal compounds induced in the dual culture with *Phytolacca americana* callus and *Botrytis fabae*. Zeitschrift fur Naturforschung 50: 398-402.

Macarisin D, Cohen L, Eick A, Rafael G, Belausov E, Wisniewski M and Droby S, 2007. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit. Postharvest Pathology and Mycotoxins. 97: 1491-1450.

Marcos JF, González-Candelas L and Zacarías L. 2005. Involvement of ethylene biosynthesis and perception in the susceptibility of citrus fruits to *Penicillium digitatum* infection and the accumulation of defence-related mRNAs. Journal of experimental botany 56:2183-93.

Mehrabian S, Majd A and Majd I, 2000. Antimicrobial effects of three plants (*Rubia tinctorum*, *Carthamus tinctorius* and *Juglans regia*) on some airborne microorganisms. Aerobiologia. 16: 455-458.

Mekbib SB, Renger TJC and Koresten L, 2006. Control of *Penicillium digitatum* growth on citrus fruit using two plant extracts and their mode of action. Ph.D. Thesis. Plant Pathology. Faculty of Natural and Agricultural Science. University of Pretoria. South Africa.

Murakami A, Ohigashi H, Tanaka S, Hirota M, Irie R, Takeda N, Tatematsu A and Koshimizu K, 1993. Bitter cyanoglucosides from Lophira alata. Phytochemistry. 32: 1461-1466.

Nickell L. 1959. Antimicrobial activity of vascular plants. Economic Botany. 13: 281-318.

Obagwu J and Korsten l, 2003. Control of Citrus Green and Blue Molds with Garlic Extracts. European Journal of Plant Pathology. 109: 221-225.

Olmedo GM, Cerioni L, González MM, Cabrerizo FM, Rapisarda VA and Volentini SI, 2017. Antifungal activity of β-carbolines on *Penicillium digitatum* and *Botrytis cinerea*. Food Microbiology. 62: 9-14.

Quiroga EN, Sampietro AR and Vattuone MA, 2001. Screening antifungal activities of selected medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology. 76: 89-96.

Renault, S., De Lucca, A., Boue, S., Bland, J., Vigo, C., and Selitrennikoff, C. 2003. CAY-I, a novel antifungal compound from cayenne pepper. Medical Mycology. 41: 75-82.

Rojas R, Bustamanatem B, Bauer J, Fernandez I, Alban J and Lock O, 2003. Antimicrobial activity of selected Peruvian medicinal plants. Journal Ethnopharmacology. 88: 199-204

Tada, M., Hiroe, Y., Kiyohara, S., and Suzuki, S. 1988. Nematicidal and antimicrobial constituents from *Allium grayi* Regel and *Allium fistulosum* L. var. *caespitosum*. Agricultural and Biological Chemistry. 52, 2383

Tripathi P and Duby NK, 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology. 32: 235-245.

Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M and Iinuma M. 1996. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal Ethnopharmacol. 50: 27-34.

Archive of SID

www.SID.ir

Wang L, Bai L, Nagasawa T, Hasegawa T, Yang X, Sakai J, Bai Y, Kataoka T, Oka S, Hirose K, Tomida A, Tsuruo T and Ando M. 2008. Bioactive triterpene saponins from the roots of *Phytolacca americana*. Journal Natural Products. 71:35-40.

Webster D, Taschereau P, Lee T and Jurgens T, 2006. Immunostimulant properties of *Heracleum maximum* Bartr. Journal of Ethnopharmacology. 106: 360–363.

Xiao C, Kim Y and Boal R, 2016. First report of occurrence of pyrimethanil resistance in *Penicillium expansum* from stored apples in Washington State. Plant Disease. 100: 10-24.

Yun, K W and Kim M. 2010. Korean Medicinal Plants. Shinkwang Publishing Copany. Seoul. Korea. p. 636.

Zheleva-Dimitrova DZ. 2013. Antioxidant and acetylcholinesterase inhibition properties of *Amorpha fruticosa* L. and *Phytolacca americana* L. Pharmacognosy Magazine. 9: 109-113.

Zoubenko O, Hudak K and Tumer NE, 2000. A non-toxic pokeweed antiviral protein mutant inhibits pathogen infection via a novel salicylic acid-independent pathway. Plant Molecular Biology. 44: 219-222.

Archive of SID

www.SID.ir

Assessment of Antifungal Activity of Some Native Plant Extracts of North of Iran on *Penicillium digitatum*

S Habibzadeh[1*] and F Beiki[2]

[1]Asisstant Professor, Department of Chemistry, Babol Noshirvani University of Technology, Babol, Iran
[2]Assistant Professor, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
[*]Corresponding author: habibzadeh@nit.ac.ir

Received: 6 October 2016 Accepted: 11 December 2017

Abstract

Penicillium digitatum, the causal agent of citrus green mold, is one of the most important pathogens among citrus fruit rot agents. Unfortunately, the continuous application of chemical pesticides have serious effects on human health and environment. As well as development of resistance is a latest against their resistance to chemical pesticide. Today, research on bio-pesticides using microbial antagonists and natural plant products has become more important as viable alternatives to control postharvest diseases. In this research, some wide spread endemic plant spears were collected from North of Iran and their potential as natural bio-pesticide were evaluated. Metabolic extracts of these plants were tested on PDA medium *in vitro* and on citrus fruits *in vivo* for their efficacy to control *P. digitatum* when applied as disc diffusion method and soaking in plant extract suspension respectively. Results showed some plant extract produce inhibition zone around paper disc *In vitro* test, but in *vivo* test, only extract of *Phytolacca americana* has significant effect and inhibited spore production by *Penicillium* sp. Eleven Components were identified from Pytolea American extranets using eleven Chromatography by Hexane, Diethyl ether and Methanol solvents, an non-polar, semi-polar and polar solvent, respectively. And purified using thin layer Chromatography (TLC). The antifungal effects of each 11 components on *P. digitatum* showed only component were extracted with methanol polar solvent have the most antifungal properties.

Keyword: Green mold, *Phylolacca* sp., Citrus, Whashington navel.

Archive of SID

www.SID.ir