

بررسی اثر عصاره چند گیاه دارویی بر مهار قارچ *Alternaria solani* عامل بیماری لکه موجی گوجه فرنگی

صدیقه اسمعیلی^۱، مریم رفیعی^۱، مهدی صیدی^{۲*}، سیامک بیگی^۲، زهرا طهماسبی^۴، میثم محمدی^۵ و مهرداد کهزادیان^۶

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد گیاهان دارویی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۲* - نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران. پست الکترونیک: msaidi@ilam.ac.ir

۳- استادیار، بیماری‌شناسی گیاهی، اداره حفظ نباتات، جهاد کشاورزی، ایلام، ایران

۴- استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران

۵- دانشجوی دکتری باغبانی، گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۶- کارشناس ارشد، اداره منابع طبیعی و آبخیزداری، ایلام، ایران

تاریخ پذیرش: اردیبهشت ۱۳۹۸

تاریخ اصلاح نهایی: اردیبهشت ۱۳۹۸

تاریخ دریافت: آبان ۱۳۹۷

چکیده

بیماری لکه‌موجی ناشی از قارچ *Alternaria solani* یکی از مهمترین بیماری‌های گوجه‌فرنگی در ایران و سایر نقاط جهان می‌باشد. به‌منظور بررسی فعالیت ضد قارچی چند گیاه دارویی برای کنترل قارچ *Alternaria solani* در شرایط درون شیشه و گلخانه آزمایش‌هایی مجزا در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. در آزمایش اول اثر غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ ppm عصاره آبی و الکلی آویشن زوفایی (*Thymbra spicata* L.)، آویشن کرک‌آلود (*Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas)، مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad) و لعل کوهستان (*Oliveria decumbens* Vent.) همراه با شاهد (آب مقطر) در شرایط درون شیشه مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حکایت از مهار کامل رشد برگنه قارچ در کلیه تیمارها داشت. در آزمایش دوم ۷۲ ساعت پس از آلوده‌سازی بوته‌های گوجه‌فرنگی با عامل بیماری لکه‌موجی در داخل گلخانه، محلول‌پاشی با غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ ppm عصاره‌های مذکور اعمال و ۱۴ روز بعد مورد ارزیابی قرار گرفتند. در آزمایش سوم نیز اثر حفاظتی تیمارهای فوق مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج آزمایش‌های دوم و سوم نشان داد که با افزایش غلظت عصاره، اثر مهارکنندگی و حفاظتی تیمارها نیز افزایش یافت. همچنین، اگرچه همه تیمارها باعث کاهش درصد شدت بیماری نسبت به شاهد (آب مقطر) شدند، ولی غلظت ۶۰۰ ppm عصاره آویشن زوفایی، ۶۰۰ ppm آویشن کرک‌آلود و ۴۰۰ ppm آویشن زوفایی به‌ترتیب بیشترین اثر مهارکنندگی و حفاظتی بر رشد قارچ مورد مطالعه داشتند. بنابراین، استفاده از تیمارهای فوق به‌عنوان برنامه‌ای کاربردی برای کنترل بیولوژیک قارچ *Alternaria solani* عامل بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی توصیه می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: فعالیت ضد قارچی، آویشن زوفایی (*Thymbra spicata* L.)، آویشن کرک‌آلود (*Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas)، مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica* Jamzad)، لعل کوهستان (*Oliveria decumbens* Vent.).

مقدمه

بیماری لکه موجی یکی از بیماری‌های مهم محصول گوجه‌فرنگی (*Solanum lycopersicum*) ناشی از قارچ *Alternaria solani* می‌باشد که هر ساله باعث خسارت‌های اقتصادی بالایی در دنیا می‌گردد (Mathur & Shekhawat, 1986). قارچ‌های بیماری‌زا از عوامل اصلی ایجاد خسارت در گیاهان بوده که موجب ایجاد اختلال در مراحل رشد و نمو گیاهان از مرحله رشد تا مرحله برداشت و حتی دوره انبارداری می‌شوند. عموماً قارچ‌های بیماری‌زا باعث فساد، مرگ و کاهش رشد (مانع رشد) بافت‌های گیاه می‌شوند (Agrios, 2004). اگرچه در حال حاضر قارچ‌های فیتوپاتوژنیک توسط قارچ‌کش‌ها کنترل می‌شوند ولی استفاده از این قارچ‌کش‌ها به دلیل اثرهای مضر آنها بر سلامت انسان و محیط‌زیست محدود شده است (Harris et al., 2001). از سوی دیگر استفاده مکرر از ترکیب‌های شیمیایی علاوه‌بر آلودگی زیست محیطی، موجب بروز پدیده مقاومت پاتوژن در مقابل قارچ‌کش‌ها شده، در نتیجه قابلیت خسارت‌آفرینی عوامل بیماری‌زا را به‌شدت افزایش می‌دهد (Narayanasamy, 2002). امروزه سودمندی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مشتق شده از اندام‌های گیاهی به‌عنوان جانشین مواد شیمیایی با توجه به ویژگی‌های ضد میکروبی این ترکیب‌ها مورد توجه قرار گرفته است (Burt, 2014). اثرهای ضد قارچی گیاهان به‌دلیل ترکیب‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند از طریق آسیب DNA، میتوکندری، دیواره سلولی و در نهایت مرگ میکروارگانیسم‌ها باشد (Yahyaabadi et al., 2011). بنابراین در سال‌های اخیر پژوهشگران به‌دنبال جایگزین کردن این ترکیب‌های شیمیایی با موادی طبیعی و کم‌خطر می‌باشند که در این راستا استفاده از عصاره و اسانس گیاهان دارویی به‌دلیل عوارض جانبی کمتر، عدم آلودگی محیط‌زیست، عدم مقاومت پاتوژنی، تجزیه شدن در خاک و پایین بودن هزینه تولید می‌تواند به‌عنوان جایگزین مناسب سموم شیمیایی بکار رود (Foroughi et al., 2013). پژوهشگران زیادی در سال‌های اخیر به مطالعه اثرهای ضدباکتریایی، ضد قارچی و حشره‌کشی اسانس‌ها و

رشته کوه زاگرس رویشگاه طبیعی گونه‌های فراوانی از گیاهان دارویی و معطر از جمله آویشن، مرزه و لعل کوهستان می‌باشد که از دیرباز به‌عنوان داروی گیاهی استفاده می‌شده است. گیاهان دارویی دارای ترکیب‌های ثانویه از قبیل ترپنوئیدها، آلکالوئیدها، پلی‌استیلن‌ها، اسیدهای آمینه و قندهای معمولی هستند که در طول دوره تکامل گیاهان برای دفاع در برابر آفات و بیماری‌ها در محیط تکامل یافته‌اند (Mahboubi et al., 2008). مشخص شده است که بیش از ۴۰٪ اسانس آویشن را ترکیب‌های فنلی، تیمول یا اسید استیک تشکیل می‌دهد (Amin et al., 2005). ولی به‌طور طبیعی تیمول (Thymol) جزء اصلی فنلی در آویشن است و کارواکرول (Carvacrol) نیز یک جزء فرعی است (Leung & Foster, 1996; Morton, 1977). عمده‌ترین ترکیب‌های اسانس گیاه آویشن زوفایی شامل تیمول (۱/۴۰٪)، کارواکرول (۶۰/۳۶٪)، گاما-تریپنین (۱۵/۹٪) و بتا-میرسن (Beta-myrcene) (۲/۱۵٪) در منطقه رشد ایلام می‌باشد، در حالیکه برای گیاه آویشن کرک آلود شامل ۳۷/۹٪ تیمول، ۱۴/۲٪ کارواکرول، ۱۳/۱٪ پارا-سیمن (para-cymene)، ۸/۷٪ گاما-تریپنین (γ-terpinene)، ۴/۴٪ لینالول (Linalool) و ۳/۱٪ بورنتول (Borneol) بود (Mohamad-Zarin Abaadi et al., 2012; Babadaeye Samani et al., 2017). همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که عمده ترکیب‌های اسانس گیاه مرزه خوزستانی شامل کارواکرول، تیمول، آلفا-فارنسیسین (α-farnesene)، گاما-تریپنین، پارا-سیمن و آلفا-تریپنین (α-terpinene) می‌باشند که وجود ترکیب‌های فنلی مانند کارواکرول، تیمول و گاما-تریپنین در ترکیب‌های اسانس باعث ایجاد خاصیت ضد میکروبی در این گیاه می‌گردد (Babadaeye et al., 2015). گیاه لعل کوهستان نیز از جمله گیاهان بومی ایران است که به‌طور محلی به آن دنک یا موشکورک می‌گویند که تیمول، کارواکرول، گاما-تریپنین و پارا-سیمن به‌ترتیب مهمترین ترکیب‌های اسانس آن را تشکیل می‌دهند (Amin et al., 2005).

Catharanthus roseus باعث ممانعت از جوانه‌زنی و رشد ریشه‌های قارچ *A. solani* شده است (Vijayan, 1989). بنابراین، در این پژوهش اثرهای ضد قارچی چهار گیاه دارویی و معطر بومی استان ایلام شامل آویشن کرک آلود (*Thymus eriocalyx*)، آویشن زوفایی (*Thymbra spicata*)، لعل کوهستان (*Oliveria decombense*) و مرزه خوزستانی (*Satureja khuzistanica*) بر بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی در شرایط درون شیشه و برون شیشه (گلخانه) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

به منظور بررسی اثر عصاره متانولی چهار گیاه دارویی و معطر آویشن کرک آلود، آویشن زوفایی، لعل کوهستان و مرزه بختیاری بر کنترل قارچ عامل لکه‌موجی گوجه‌فرنگی سه آزمایش مجزا در شرایط درون شیشه و برون گلخانه در آزمایشگاه بیماری‌شناسی سازمان جهاد کشاورزی ایلام و گلخانه تحقیقاتی دانشگاه ایلام طراحی و اجرا شد. به این منظور، ابتدا قارچ *Alternaria solani* عامل لکه‌موجی گوجه‌فرنگی از مزارع آلوده گوجه‌فرنگی در استان ایلام جمع‌آوری و بر روی محیط کشت PDA تکثیر و خالص‌سازی شد. همچنین برای تهیه تیمارها ابتدا سرشاخه‌های هوایی گیاهان دارویی مورد نظر از رویشگاه‌های طبیعی آنها در استان ایلام جمع‌آوری گردید، سپس در شرایط سایه و تهویه مناسب خشک گردیدند. عصاره‌گیری از نمونه‌های گیاهی به روش خیس کردن با متانول ۷۰٪ توسط دستگاه همزن برقی و بعد جداسازی با کمک پمپ خلأ انجام شد.

آزمایش اول: بررسی اثرهای ضد قارچی عصاره‌های گیاهان دارویی در شرایط درون شیشه

این آزمایش به صورت طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار انجام شد. برای این منظور، ابتدا غلظت‌های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ ppm هر یک از عصاره‌ها با ۱۰۰ میلی‌لیتر PDA استریل شده با غلظت ۳۹ گرم در لیتر مخلوط گردید.

عصاره‌های گیاهی پرداخته‌اند (Muyima et al., 2004)؛ (Pitaroki et al., 2002). در واقع استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان دارویی به‌عنوان یکی از روش‌های نوین کنترل بیماری‌های گیاهی بیشتر در مقیاس آزمایشگاهی مورد مطالعه قرار گرفته است (Sacchetti et al., 2005)؛ (Rasooli et al., 2002؛ Sokovic & Griensven, 2006). امروزه بررسی‌های آزمایشگاهی فراوانی در زمینه تأثیر فرآورده‌های گیاهی بر روی آفات، قارچ‌ها و باکتری‌های گیاهی انجام شده است. از جمله این دستاوردها می‌توان به اثرهای لعل کوهستان در کنترل رشد باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها (Mahboubi et al., 2008)، اثر اسانس گیاه مرزه در کنترل قارچ آلترناریا (Yazdanpanah et al., 2011)، اثر بازدارندگی اسانس گیاه دارویی رزماری و رازیانه بر قارچ *Fusarium oxysporum* اثر اسانس درخت زیتون بر کنترل رشد قارچ *Alternaria solani* (Babagoli & Ebrahimi, 2012)، اثرهای اسانس گیاه دارویی اسطوخودوس و مرزه علیه قارچ *Fusarium solani* (Salek Mearaji et al., 2014)، تأثیر اسانس گیاه سیر، مانکوزب و متالاکسیل-مانکوزب روی سه گونه قارچ فیتوفورا (Farhang et al., 2015)، اثرهای ضد قارچی عصاره دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*) بر روی برخی از قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی (Abdolmaleki et al., 2011)، اثرهای قارچ‌کشی اسانس چند گیاه دارویی علیه قارچ عامل پژمردگی آوندی گوجه‌فرنگی (Kohanmoo & Jamali, 2013) و اثرهای بیوکنترلی برخی اسانس‌های گیاهی بر رشد *Botrytis cinerea* عامل کپک خاکستری سیب (Taheri Dehkordi, 2014) اشاره نمود. Nashwa و Abo-Elyousr (۲۰۱۲) در یک مطالعه اثر مثبت غلظت‌های ۱٪ و ۵٪ عصاره برگ چند گیاه دارویی از جمله سیر، چریش و داتوره را بر مهار قارچ *Alternaria solani* در شرایط مزرعه و گلخانه گزارش کردند، که اثرهای ضد قارچی آنها را به وجود ترکیب‌های فنولی موجود در عصاره این گیاهان نسبت داده‌اند. در گزارش‌های دیگر عصاره غده گیاه *Aegle marmelos* و گل‌های

۶۵-۷۵٪ و تأمین آب کافی و تغذیه با کودهای N-P-K با نسبت ۲۰-۲۰-۲۰ به مقدار سه گرم در لیتر همراه با آب آبیاری و تا رسیدن گیاهان به ارتفاع ۴۰ سانتی متری (مرحله آلوده سازی) انجام شد. به منظور آلوده سازی گلدان ها و تهیه مایه تلقیح، سوسپانسیون قارچ به نسبت $10^6 \times 5$ اسپور در میلی لیتر تهیه و با استفاده از یک AtoMister برای تلقیح بوته های گوجه فرنگی استفاده گردید. پس از تلقیح برای تأمین شرایط رطوبتی مناسب برای رشد و آلوده سازی قارچ، گیاهان با پوشش پلی اتیلنی به مدت ۴۸ ساعت پوشانیده شدند و پس از آن گلدان ها در شرایط معمول گلخانه نگهداری شدند. به منظور بررسی اثرهای مهاری عصاره گیاهان دارویی دو روز پس از آلوده سازی گلدان ها، عصاره گیاهان دارویی با سه غلظت ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ ppm تهیه شدند و از هر غلظت ۳۰ میلی لیتر برای اسپری گلدان ها استفاده شد. برای شاهد منفی از آب مقطر و برای شاهد مثبت از قارچ کش داکونیل (سه گرم در لیتر) استفاده شد. دو هفته بعد از تلقیح شدت بیماری و درصد کاهش بیماری با روش Latha و همکاران (۲۰۰۹) براساس نمره از صفر تا ۹ ثبت شد (صفر گیاه فاقد آلودگی، یک ۱-۵٪ آلودگی، دو ۱۰-۶٪ آلودگی، سه ۲۰-۱۱٪، چهار ۳۰-۲۱٪ آلودگی، پنج ۴۰-۳۱٪ آلودگی، شش ۵۰-۴۱٪ آلودگی، هفت ۶۰-۵۱٪ آلودگی، هشت ۷۰-۶۱٪ آلودگی و نه بیشتر از ۷۱٪ آلودگی)؛ سپس توسط رابطه زیر بر حسب درصد نسبت به شاهد محاسبه و گزارش گردید.

محیط های آماده بعد از سرد کردن در پتری دیش های سترون سایز هشت برای کشت استفاده شد. یک دیسک پنج میلی متری از محیط کشت پنج روزه قارچ عامل لکه موجی گوجه فرنگی برداشته و در مرکز پتری های حاوی عصاره ها قرار داده شد. برای شاهد مثبت از غلظت سه گرم در لیتر قارچ کش داکونیل و برای شاهد منفی تمام مراحل تهیه اسپری شد و از آب مقطر به جای عصاره استفاده شد. پتری ها به صورت وارونه در دستگاه انکوباتور و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد تا زمانی که قطر پرگنه قارچ به حداکثر رسید، نگهداری شد. اثر بازدارندگی عصاره با اندازه گیری قطر کلنی و درصد بازدارندگی عصاره ها براساس درصد مهار رشد میسلیم قارچ محاسبه شد (Dev et al., 2004).

آزمایش دوم: بررسی اثرهای ضد قارچی عصاره های گیاهان دارویی در شرایط برون شیشه (گلخانه)

این آزمایش به صورت کاملاً تصادفی با چهار تکرار و هر تکرار شامل سه گلدان طراحی و اجرا گردید. برای بررسی اثر ضد قارچی عصاره گیاهان دارویی مورد مطالعه در این پژوهش از روش Latha و همکاران (۲۰۰۹) استفاده گردید. ابتدا بذرهای گوجه فرنگی رقم M-1-1 در گلدان های پلاستیکی با قطر ۱۵ سانتی متر حاوی مخلوطی از خاک زراعی، پیت و ماسه (در داخل آون استریل شدند) با نسبت برابر کشت شدند. گلدان ها در شرایط کنترل شده گلخانه ای با دمای ۳۵-۳۰ درجه سانتی گراد و رطوبت نسبی

$$\text{شدت بیماری (\%)} = \frac{(n \times v)}{9N} \times 100$$

در این رابطه n تعداد گیاهان در هر تیمار، v عدد شدت بیماری (صفر تا ۹) و N تعداد کل گیاهان می باشند.

$$\text{درصد شدت بیماری} = \frac{\text{شدت بیماری در تیمار} - \text{شدت بیماری در کنترل}}{\text{شدت بیماری در کنترل}} \times 100$$

دارویی بر قطر کلونی قارچ مورد آزمایش نشان داد که اثرهای عصاره بر قطر کلونی قارچ در سطح احتمال ۱٪ آزمون توکی معنی دار بود (جدول ۱).

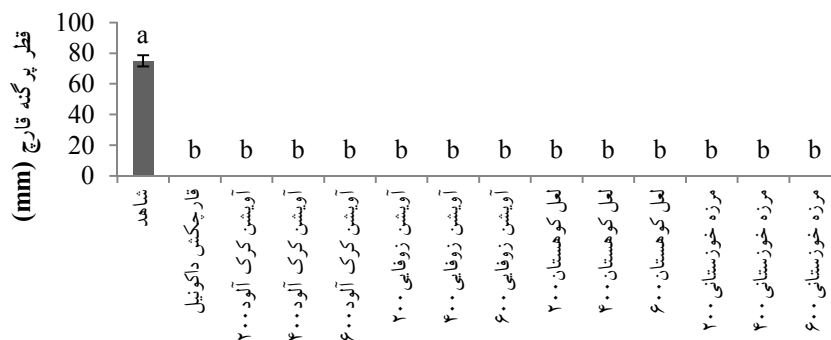
جدول ۱- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر قطر کلونی قارچ

Alternaria solani در شرایط درون شیشه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۱۳	۱۵۰۷/۶۹***
خطا	۲۸	۹۰/۱۴
ضریب تغییرات	-	۲/۲۷

***: معنی داری در سطح احتمال ۱٪

نتایج مقایسه میانگین نشان داد که غلظت های ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ ppm عصاره های گیاهان دارویی مورد مطالعه و قارچ کش داکونیل (شاهد مثبت) بدون اختلاف معنی دار با همدیگر به طور کامل باعث جلوگیری از رشد قارچ مورد مطالعه شدند. در حالیکه نمونه های شاهد (بدون عصاره و قارچ کش - شاهد منفی) دارای بیشترین قطر کلونی (۷۵ میلی متر) بودند (شکل های ۱ و ۲).



شکل ۱- مقایسه میانگین اثر تیمارها بر رشد پرگنه قارچ *Alternaria solani* در شرایط درون شیشه

آزمایش سوم: بررسی اثر حفاظتی عصاره گیاهان دارویی در شرایط گلخانه

این آزمایش مطابق آزمایش دوم انجام شد، با این تفاوت که ابتدا گلدان ها با عصاره گیاهان دارویی تیمار شدند و دو روز بعد توسط سوسپانسیون اسپورهای قارچ تلقیح، سپس دو هفته بعد شدت بیماری بر اساس روش Latha و همکاران (۲۰۰۹) اندازه گیری شد.

تجزیه و تحلیل آماری

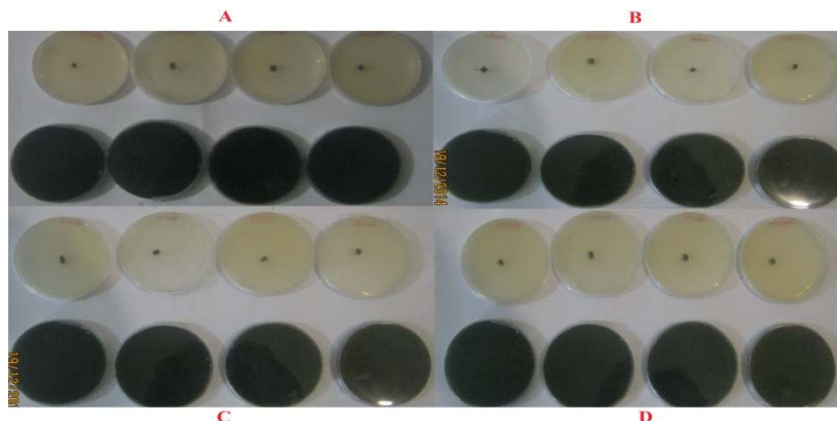
تجزیه آماری توسط نرم افزار SAS 9.2 انجام گردید و برای مقایسه میانگین ها از آزمون توکی در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد.

نتایج

نتایج آزمایش اول

اثر تیمارهای آزمایش بر قطر کلونی قارچ *Alternaria solani* در شرایط درون شیشه

نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر عصاره گیاهان



شکل ۲- اثر غلظت ۲۰۰ ppm عصاره‌ها بر کنترل قارچ آلترناریا در مقایسه با شاهد (A: آویشن زوفایی، B: مرزه خوزستانی، C: آویشن کرک‌آلود و D: لعل کوهستان)

مشاهده گردید، ولی عصاره‌های مورد استفاده باعث کاهش شدت آلودگی نسبت به شاهد منفی شدند. در بین تیمارها، عصاره ۶۰۰ ppm آویشن زوفایی (۴/۶۷٪) دارای کمترین شدت آلودگی بود. پس از آن، به ترتیب غلظت‌های ۴۰۰ ppm آویشن زوفایی و ۶۰۰ ppm آویشن کرک‌آلود دارای شدت آلودگی کمتری نسبت به شاهد منفی بودند. این در حالی بود که در بین تیمارها پس از شاهد منفی، بوته‌های مربوط به غلظت ۲۰۰ ppm لعل کوهستان (۴۸/۶۵٪)، ۲۰۰ ppm مرزه خوزستانی (۳۵/۶۵٪) و ۲۰۰ ppm لعل کوهستان (۳۴/۰۰٪) به ترتیب با داشتن اختلاف معنی دار با همدیگر دارای بیشترین شدت آلودگی بودند. نتایج این آزمایش نشان داد که با افزایش غلظت هر چهار عصاره مورد مطالعه، شدت آلودگی نیز کاهش می‌یابد (شکل‌های ۳ و ۴).

نتایج آزمایش سوم

اثر حفاظتی تیمارهای آزمایش بر شدت آلودگی گیاه گوجه‌فرنگی به قارچ *Alternaria solani* در شرایط گلخانه نتایج مقایسه میانگین نشان داد که اثر حفاظتی عصاره‌های مورد مطالعه در این آزمایش در سطح احتمال ۱٪ آزمون توکی معنی‌دار بود (جدول ۳).

نتایج آزمایش دوم

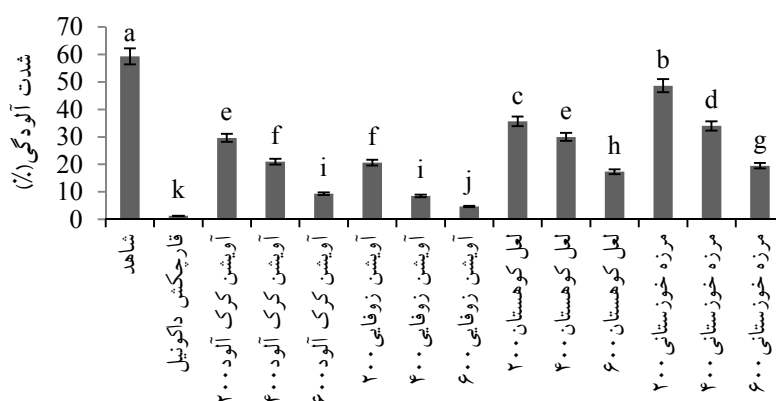
اثر تیمارهای آزمایش بر شدت آلودگی بوته‌های گوجه‌فرنگی به قارچ *Alternaria solani* در شرایط گلخانه تجزیه واریانس نشان داد که اثر تیمارهای آزمایش بر شدت آلودگی گیاهان در سطح ۱٪ آزمون توکی معنی‌دار بود (جدول ۲).

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر تیمارها بر شدت آلودگی گیاه گوجه‌فرنگی به قارچ *Alternaria solani* در شرایط گلخانه

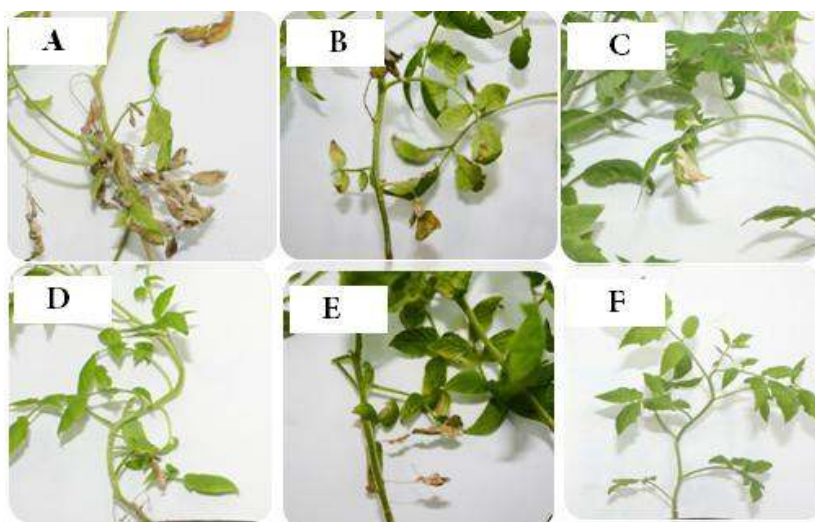
منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۱۳	۱۰۰۸/۹۸***
خطا	۲۸	۲/۸۳
ضریب تغییرات	-	۳/۱۳

***: معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪

نتایج نشان دادند که پس از تلقیح گیاهان با عامل بیماری، شدت آلودگی بوته‌های گوجه‌فرنگی به مرور زمان افزایش یافت. به طوری که پس از دو هفته از زمان تلقیح بیشترین (۵۹/۳۲٪) و کمترین (۱/۲۷٪) شدت آلودگی به ترتیب در شاهد منفی و شاهد مثبت (قارچ‌کش داکونیل)



شکل ۳- مقایسه میانگین اثر تیمارها بر شدت آلودگی بوته‌های گوجه‌فرنگی به قارچ *Alternaria solani* در گلخانه



شکل ۴- اثر غلظت ۶۰۰ ppm عصاره‌ها بر شدت آلودگی بوته‌های گوجه‌فرنگی

(A: شاهد، B: لعل کوهستان، C: آویشن زوفایی، D: آویشن کرک آلود، E: مرزه خوزستانی و F: قارچکش داکونیل)

جدول ۳- تجزیه واریانس اثر حفاظتی تیمارهای آزمایش بر شدت آلودگی گیاه گوجه‌فرنگی به

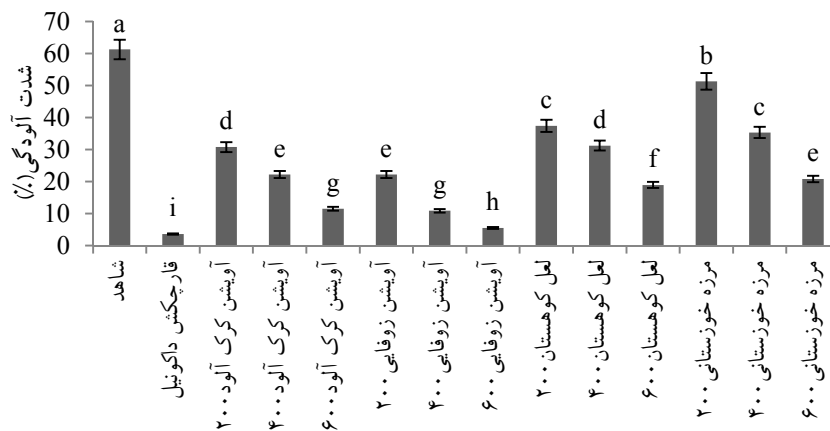
قارچ *Alternaria solani* در شرایط گلخانه

منابع تغییرات	درجه آزادی	میانگین مربعات
تیمار	۱۳	۱۴۸۹/۸۳***
خطا	۲۸	۸/۲۷
ضریب تغییرات	-	۲/۸۳

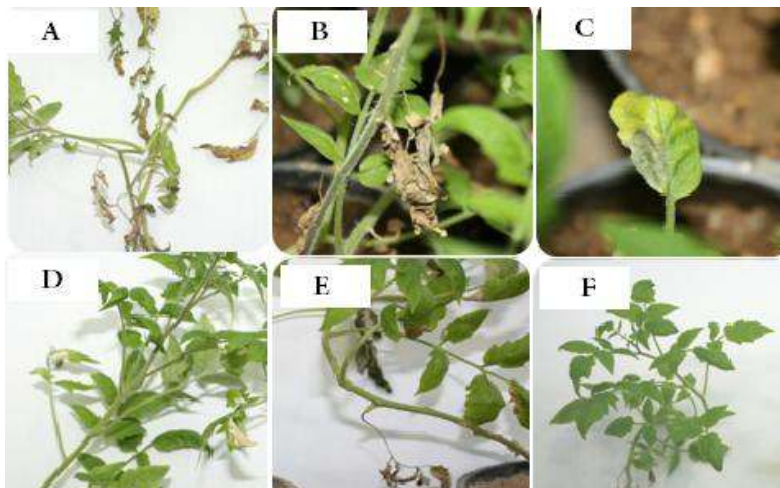
***: معنی‌داری در سطح احتمال ۱٪

بود. پس از آن غلظت های ۶۰۰ ppm عصاره آویشن زوفایی و ۴۰۰ ppm آویشن کرک آلود بدون اختلاف معنی دار با همدیگر قرار داشتند. در بین تیمارها نیز پس از شاهد منفی غلظت ۲۰۰ ppm لعل کوهستان با ۵۱/۳۲٪ دارای شدت آلودگی بیشتری بود و پس از آن غلظت ۲۰۰ ppm عصاره های مرزه خوزستانی و لعل کوهستان بدون اختلاف معنی دار با همدیگر دارای شدت آلودگی بیشتری نسبت به سایر تیمارها بودند (شکل های ۵ و ۶).

مقایسه میانگین نتایج نشان داد که اعمال تیمارها و بعد تلقیح گیاهان با عامل بیماری لکه موجی باعث آلوده سازی گیاهان شد، به طوری که شاهد منفی (۶۱/۲۸٪) و قارچ کش داکونیل (۳/۶۰٪) به ترتیب دارای بیشترین و کمترین شدت آلودگی به قارچ *Alternaria solani* بودند. مشاهده نتایج نشان داد که همه تیمارها به صورت معنی داری دارای شدت آلودگی کمتری نسبت به شاهد منفی بودند. در بین تیمارها کمترین میزان آلودگی پس از قارچ کش داکونیل مربوط به غلظت ۶۰۰ ppm عصاره آویشن زوفایی با ۵/۵۰٪ آلودگی



شکل ۵- مقایسه میانگین اثر حفاظتی تیمارهای آزمایش بر شدت آلودگی گیاه گوجه فرنگی به قارچ *Alternaria solani* در شرایط گلخانه



شکل ۶- اثر حفاظتی غلظت ۶۰۰ ppm عصاره ها بر شدت آلودگی بوته های گوجه فرنگی

(A: شاهد، B: لعل کوهستان، C: آویشن زوفایی، D: آویشن کرک آلود، E: مرزه خوزستانی و F: قارچ کش داکونیل)

بحث

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که عصاره متانولی آویشن زوفایی، آویشن کرک آلود، مرزه خوزستانی و لعل کوهستان رشد میسلیومی قارچ *Alternaria solani* را به طور کامل در شرایط آزمایشگاه متوقف نمود. این قدرت مهارکنندگی می تواند به دلیل بسته بودن پتری دیسک ها در شرایط آزمایشگاه باشد که باعث حفظ متابولیت های ثانویه عصاره ها در داخل محیط کشت شده است. همچنین، اختلاط عصاره ها با محیط کشت و تماس مستقیم عامل بیماری زا با این متابولیت ها، احتمالاً تأثیرگذاری تیمارها بر رشد میسلیومی قارچ در شرایط درون شیشه ای را افزایش داده است. اما در آزمایش دوم و سوم در شرایط گلخانه ای، اگرچه عصاره ها باعث کاهش رشد قارچ عامل بیماری شدند، ولی اثرهای بازدارندگی آنها ۱۰۰ درصدی نبود. در بین عصاره های مورد مطالعه، کاربرد عصاره آویشن زوفایی و آویشن کرک آلود کمترین شدت آلودگی را در پی داشت. بعکس، استفاده از عصاره گیاهان لعل کوهستان و مرزه خوزستانی به ویژه در غلظت های پایین (۲۰۰ ppm) تأثیر معنی داری در کاهش شدت آلودگی نداشت. اگرچه بررسی اثرهای ضد قارچی عصاره ها نشان داد با افزایش غلظت هر چهار عصاره مورد مطالعه، شدت آلودگی بوته های گوجه فرنگی به عامل بیماری لکه موی به طور معنی داری کاهش می یابد. بررسی اثر حفاظتی عصاره گیاهان دارویی بر بوته های گوجه فرنگی در مقابل عامل بیماری لکه موی در شرایط گلخانه ای نیز کارایی بالاتر عصاره های آویشن زوفایی و آویشن کرک آلود به ویژه در غلظت های ۴۰۰ و ۶۰۰ ppm را نسبت به عصاره گیاهان مرزه خوزستانی و لعل کوهستان تأیید کرد. بررسی اثرهای حفاظتی عصاره ها نیز نشان داد که با افزایش غلظت هر چهار عصاره مورد مطالعه، شدت آلودگی بوته های گوجه فرنگی به طور معنی داری کاهش می یابد. از آنجایی که برخی از مواد مؤثره گیاهان دارویی مانند تیمول و کارواکرول که دارای فعالیت ضد میکروبی می باشند، فرار بوده و پس از محلول پاشی بر روی گیاهان در هوای گرم درون گلخانه به سرعت تبخیر می شوند،

تبخیر مواد فرار و کاهش غلظت مواد مؤثره عصاره ها را می توان از دلایل عدم بازدارندگی کامل تیمارها در شرایط گلخانه (برون شیشه ای) دانست. افزایش اثر مهارکنندگی عصاره ها بر رشد عامل بیماری زا متناسب با افزایش غلظت عصاره ها احتمالاً به دلیل افزایش مقدار متابولیت های ثانویه فنولی مانند کارواکرول و تیمول (Saidi *et al.*, 2012)؛ Saidi, 2014) و فعالیت ضد قارچی این ترکیب ها می باشد. متابولیت های ثانویه به عنوان مواد طبیعی نقش های مهمی در واکنش های دفاعی گیاه دارند. بسیاری از این متابولیت ها در دفاع گیاه در مقابل آفات و بیماری ها مؤثر می باشند (Enyiukwu *et al.*, 2014). از ترکیب های با خواص آنتی اکسیدانی به عنوان فرآورده های ثانویه گیاهان دارویی مورد مطالعه در این پژوهش می توان به ترکیب های فنولی اشاره نمود. ترکیب های فنلی موجود در گیاهان دارویی دارای قابلیت فیزیولوژیک بالایی هستند و به عنوان یک منبع آنتی اکسیدان طبیعی به شمار می روند. نقش اصلی آنتی اکسیدان ها حفاظت از سلول ها در برابر عوامل بیماری زا می باشد (Taskova *et al.*, 2002). از آنجایی که ترکیب غالب عصاره هر چهار گیاه مورد مطالعه تیمول و کارواکرول می باشد، بنابراین اثر ضد قارچی این عصاره ها را می توان به وجود این ترکیب ها در عصاره نسبت داد. تیمول و کارواکرول ترکیب های فنولی می باشند و از اجزای اصلی تشکیل دهنده اسانس و عصاره گیاهان دارویی از جمله گیاهان خانواده نعناع می باشند که اثرهای بازدارندگی آن بر روی تعدادی از میکروارگانیسم های بیماری زا همانند قارچ ها و باکتری ها به اثبات رسیده است (Behdad *et al.*, 2013). حساسیت گونه های قارچی با توجه به نوع عصاره و غلظت آنها متفاوت است، از این رو می توان تفاوت در فعالیت ضد قارچی عصاره های گیاهی را به اجزای تشکیل دهنده آنها نسبت داد. به طوری که یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت تشدیدکننده همراه با سایر ترکیب های موجود در عصاره موجب فعالیت ضد قارچی گردد (Plotto *et al.*, 2003). اثرهای ضد قارچی عصاره گیاهان دارویی و معطر می تواند ناشی از آسیب به DNA، میتوکندری و دیواره

غلظت عصاره‌ها، شدت آلودگی بوته‌ها به‌طور چشمگیری کاهش یافت. بنابراین استفاده عصاره آویشن زوفایی و آویشن کرک آلود با غلظت ۶۰۰ ppm به‌عنوان برنامه‌ای کاربردی برای کنترل بیولوژیک قارچ *Alternaria solani* عامل بیماری لکه‌موجی گوجه‌فرنگی توصیه می‌گردد.

منابع مورد استفاده

- Abdolmaleki, M., Salari, M. and Bahraminezhad, S., 2011. Antifungal activity of cinnamon (*Cinnamomum zelanicum*) crude extracts against some phytopathogenic fungi. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 44(3): 255-266.
- Agrios, G.N., 2004. *Plant Pathology*. Academic Press, India, 635p.
- Al-Rahman, N., Mostafa, A. and Abdel-Megeed, A., 2011. Antifungal and antiaflatoxigenic activities of some plant extracts. *African Journal of Microbiology Research*, 5(11): 1342-1348.
- Amin, G.H., Salehi sourmaghi, M.H., Zahedi, M., Khanavi, M. and Samadi, N., 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Olivera decumbens*. *Fitoterapia*, 76(7-8): 704-707.
- Babadaeye Samani, R., Shirali, R. and Alizadeh, A., 2015. Chemical composition, phenolic compounds, antioxidant and antimicrobial activity of the *Satureja khuzistanica* Bunge. essential oil in southern Iran. *Journal of Plant Ecophysiology*, 12(7): 150-163.
- Babagoli, M. and Ebrahimi, B., 2012. Effects of three essential oils on the growth of the fungus *Alternaria solani*. *Journal of Research in Agricultural Science*, 8(1): 45-57.
- Behdad, M., Etemadi, N.A., Behdad, E. and Zeinali, H., 2013. Antifungal effects of three plant essential oils against *Rhizopus stolonifer*, the cause of soft rot on strawberry fruit. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 29(2): 399-411.
- Burt, S., 2014. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 223-253.
- Enyiukwu, D.N., Awurum, A.N., Ononuju, C.C. and Nwanerij, A., 2014. Significance of characterization of Secondary metabolites from extracts of higher plants in plant disease management. *International Journal of Advance Agricultural Research*, 15(1): 8-28.
- Dev, U., Devakumar, C., Mohan, J. and Agarwal, P.C., 2004. Antifungal activity of aroma chemicals against seed-borne fungi. *Journal of Essential Oil Research*, 16: 496-499.

سلولی میکروارگانسیم‌ها باشد که در نهایت باعث مرگ میکروارگانسیم می‌شود (Yahyaabadi et al., 2011). برخی از محققان اعتقاد دارند که ترکیب‌های ضد میکروبی روغن‌های اسانس موجود در عصاره‌های گیاهی با عبور از غشای سلولی و در تعامل با آنزیم‌ها و پروتئین‌های غشایی، موجب نشت پروتون به سمت بیرونی سلول شده که باعث تغییر در سلول و در نهایت مرگ آنها می‌شود (Al-Rahman et al., 2011).

از آنجایی‌که ماده مؤثره اصلی موجود در بیشتر گیاهان مورد استفاده در این پژوهش پلی‌فنل تیمول یا کارواکرول می‌باشد (Saidi et al., 2012؛ Saidi, 2014)، بنابراین سازوکار عمل و مهارکنندگی رشد قارچ‌ها توسط این گیاهان احتمالاً به دلیل همین مواد پلی‌فنولی با فعالیت ضد میکروبی قوی می‌باشد. محققان به این نتیجه رسیده‌اند که استفاده از مواد با منشأ گیاهی (پودر، اسانس و یا عصاره) می‌تواند روش کاربردی بسیار مناسبی برای مهار پاتوژن‌های گیاهی باشد (Behdad et al., 2013). پژوهش‌های مشابه نشان داده‌اند که اسانس آویشن شیرازی در غلظت ۵۰۰ ppm اثر مهارکننده بر رشد میسلیم قارچ *Rhizopus stolonifer* داشته و این اثر را به ترکیب‌های موجود در اسانس آن گیاه (کارواکرول، تیمول، لینالول و پارا-سیمن) نسبت داده‌اند (Behdad et al., 2013). محققان اثر بازدارندگی عصاره برگ چند گیاه دارویی دیگر از جمله سیر، چریش و داتوره در مهار قارچ *Alternaria solani* در شرایط مزرعه و گلخانه را گزارش نموده و آن را به وجود ترکیب‌های فنولی موجود در عصاره این گیاهان نسبت دادند (Plotto et al., 2003؛ Nashwa & Abo-Elyours, 2012؛ Kohanmoo & Jamali, 2013).

به‌عنوان نتیجه‌گیری کلی باید گفت این پژوهش نشان داده که همه عصاره‌های مورد مطالعه باعث کنترل ۱۰۰ درصدی رشد قارچ *Alternaria solani* در شرایط درون شیشه‌ای شدند. در شرایط گلخانه‌ای، استفاده از عصاره گیاهان دارویی آویشن زوفایی و آویشن کرک آلود باعث کاهش رشد قارچ نسبت به شاهد شده و با افزایش

- vulgar* essential oils from Eastern Cape Province of south Africa. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 7: 68-78.
- Narayanasamy, P.N., 2002. Microbial Plant Pathogen and Crop Disease Management. Science Publishers USA, 572p.
 - Nashwa, S.M.A. and Abo-Elyours, A., 2012. Evaluation of various plant extracts against the early blight disease of tomato plants under greenhouse and field conditions. Plant Protection Science, 48(2): 74-79.
 - Pitaroki, D., Couladis, M., Ptsikos-Panayotarou, N. and Tzakou, O., 2002. Composition and antifungal activity on soil-borne pathogens of the essential oil of *Salvia sclarea* from Greece. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 51: 289-301.
 - Plotto, A., Roberts, D. and Roberts, R.G., 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest diseases control of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Acta Horticulture, 628: 737-745.
 - Rasooli, I., Moosavi, M.L., Reazee, M.B. and Jaimand, K., 2002. Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. Agriculture Science Technology, 4: 127-133.
 - Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S. and Radica, M., 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. Food Chemistry, 91: 621-632.
 - Saidi, M., 2014. Antioxidant activities and chemical composition of essential oils from *Satureja khuzistanica*, *Oliveria decumbens* and *Thymus daenensis*. Journal of Essential Oil Bearing Plants, 17(3): 513-521.
 - Saidi, M., Ghafourian, S., Zarin-Abaadi, M., Movahedi, K. and Sadeghifard, N., 2012. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of black thyme (*Thymbra spicata* L.) essential oils. Romanian Archives of Microbiology and Immunology, 71(2): 61-69.
 - Salek Mearaji, H., Salek Naghdi, R. and Tafreshi, Kh., 2014. Suppressiveness of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and fennel (*Foeniculum vulgare*) essential oils on *Fusarium oxysporum*. Journal Management System, 3(2): 57-68.
 - Sokovic, M. and Griensven, L., 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of cultivated button mushroom *Agaricus bisporus*. European Journal of Plant Pathology, 116: 211-224.
 - Farhang, V., Amini, J. and Javadi, T., 2015. Effect of essential oil of garlic, mancozeb and metalaxyl-mancosib on three species of *Phytophthora* fungi. Plant growth factors of plants, 4(1): 44-65.
 - Foroughi, M., Mohammadi, S. and Ghasemi, A., 2013. Antifungal activity of five medical herbs on the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. Journal of Microbial World, 5(3): 115-121.
 - Harris, C.A., Renfrew, M.J. and Woolridge, M.W., 2001. Assessing the risk of pesticide residues to consumers: recent and future developments. Food Additives and Contamination, 18: 1124-1129.
 - Kohanmoo, M.A. and Jamali, F., 2013. Antifungal action essential oils multi medicinal plants on the *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* fungi. Biological Control of Pests and Plant Diseases, 2(1): 27-33.
 - Latha, P., Anand, T., Ragupathi, N., Prakasam, V. and Samiyappan, R., 2009. Antimicrobial activity of plant extracts and induction of systemic resistance in tomato plant by mixtures of PGPR strains and zimmu leaf extracts against *Alternaria solani*. Biological Control, 50: 85-93.
 - Leung, A.Y. and Foster, S. 1996. Encyclopedia of common natural ingredients: used in food, and cytotoxicity of *Carthamus lanatus*. Fitoterapia, 6: 540-544.
 - Mahboubi, M., Feizabadi, M.M., Haghi, Gh. and Hosseini, H., 2008. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil from *Oliveria decumbens* Vent. Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants, 24(1): 56-65.
 - Mathur, K. and Shekhawat, K.S., 1986. Chemical control of early blight in Kharif sown tomato. India Journal Mycology Plant Pathology, 16: 235-238.
 - Mohamad-Zarin Abaadi, M., Saidi, M. and Mohamadi, Y., 2017. Essential oil Screening and antioxidant activity of *Satureja bachtiarica* Bunge. population in Ilam Province for Isolation of Promising Chemotypes. Eco-Phytochemical Journal of Medicinal Plants, 5(2): 13-23.
 - Mohamad-Zarin Abaadi, M., Saidi, M. and Movahedi, Kh., 2012. Chemical composition and anti-bacterial and anti-oxidant properties of *Thymbra spicata*. 7th Iranian Horticultural Science Congress, Isfahan University of Technology, Isfahan, 5-7 of September: 2548-2550.
 - Morton, J.F., 1977. Major Medicinal Plants Botany, Culture and Uses. Charles C. Thomas Publisher, Bannerstone House, 431p.
 - Muyima, N.Y.O., Nziweni, S. and Mabinya, L.V., 2004. Antimicrobial and antioxidant activities of *Tagetes mimuta*, *Lippia javanica* and *Foeniculum*

- and Grout. M.Sc. (Ag) Thesis, Tamil Nadu Agricultural University, Coimbatore, India.
- Yahyaabadi, S., Zibanejad, E. and Doudi, M., 2011. Effect of some of plant extracts on the growth of two *Aspergillus* species. *Journal of Herbal Drugs (An International Journal on Medicinal Herbs)*, 2(1): 69-81.
 - Yazdanpanah, L., Aminaii, M.M., Panahi, B., Emamifar, M. and Mahdian, M., 2011. Effect of antifungal essential oil from *Satureja hortensis* on *Alternaria citri*. *Plant Production Technology*, 2(2): 81-90.
 - Taheri Dehkordi, A., Khojaste, M. and Khandan Mirkohi, A., 2014. Biocontrol ability of some essential oils against *Botrytis cinerea*, the causal agent of apple gray mold. *Biological Control of Pests & Plant Diseases*, 3(1): 77-86.
 - Taskova, R., Mitova, M., Najdenski, H., Tzvetkova, I. and Duddeck, H., 2002. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Carthamus lanatus*. *Fitoterapia*, 6: 540-544.
 - Vijayan, M., 1989. Studies on early blight of tomato caused by *Alternaria solani* (Ellis and Martin) Jones

Effects of hydro-alcoholic extract of some medicinal plants on control of *Alternaria solani* fungus causing tomato early blight disease

S. Esmaili¹, M. Rafiei¹, M. Saidi^{2*}, S. Beigi³, Z. Tahmasebi⁴, M. Mohamadi⁵ and M. Kohzadi⁶

1- M.Sc. graduated, Department of Horticultural Sciences, College of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

2*- Corresponding author, Department of Horticultural Sciences, College of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

E-mail: msaidi@ilam.ac.ir

3- Department of Plant Protection, Jahaad-e- Keshavarzi, Ilam, Iran

4- Department of Agronomy and Plant Breeding, College of Agriculture, Ilam University, Ilam, Iran

5- Ph.D. student, Department of Horticultural Sciences, College of Agriculture, Zanzan University, Zanzan, Iran

6- Department of Natural Resources and Watershed, Ilam, Iran

Received: November 2018

Revised: May 2019

Accepted: May 2019

Abstract

Tomato early blight disease, caused by *Alternaria solani* fungus, is one of the most important diseases of tomato in the world, and also in Iran. In order to investigate the antifungal activity of some medicinal plants to control this fungus, separate experiments were conducted in a completely randomized design under *in vitro* and greenhouse conditions. In the first experiment, the effect of concentrations of 200, 400 and 600 ppm of hydro-alcoholic extract (70% methanol and 30% water) of *Thymbra spicata* L., *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas, *Satureja khuzistanica* Jamzad and *Oliveria decumbents* Vent. with the negative (distilled water) and positive (Daconil, 3 g l⁻¹) controls on the growth of *A. solani* fungus was studied under *in vitro* conditions. The results of the first experiment indicated complete inhibiting of fungal colony growth in all treatments. In the second experiment, 72 hours after contamination of tomato plants with *A. solani* fungus in an isolated greenhouse, contaminated plants were sprayed with the above-mentioned treatments and monitored for the disease symptoms 14 days later. In the third experiment, the protective effect of the above-mentioned treatments was studied. The results of the second and third experiments showed that with an increase in the extract concentration, the inhibitory and protective effects of the treatments increased. Although all treatments reduced the disease severity compared to the control, the concentrations of 600 ppm of *T. spicata*, 600 ppm of *T. eriocalyx* and 400 ppm of *T. spicata*, respectively had the most effective inhibitory and protective effects on the growth of fungus studied. Therefore, the use of the above treatments is recommended as a practical method for biological control of *A. solani*.

Keywords: Antifungal activity, *Thymbra spicata* L., *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas, *Satureja khuzistanica* Jamzad, *Oliveria decumbents* Vent.