



بررسی اثرات ضد قارچی چند اسانس گیاهی در رشد قارچ عامل پوسیدگی سفید ساقه کلزا (*Sclerotinia sclerotiorum*) در شرایط آزمایشگاه

سمانه تیموری^{*}، کامران رهنما^۱

تاریخ دریافت: ۹۲/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۹۲/۴/۲۴

چکیده

استفاده از اسانس‌های گیاهی به عنوان عوامل ضد میکروبی در چند سال اخیر افزایش یافته است. در این بررسی فعالیت ضد قارچی اسانس‌های نعناع (*Mentha piperita*)، رازیانه (*Foeniculum vulgare*) و آویشن (*Thymus vulgaris*) روی قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاه به روش اختلاط اسانس با محیط کشت PDA در ۵ غلظت مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج مشخص کرد که اسانس نعناع تأثیر کافی بر روی رشد میسلیم قارچ نداشت به گونه‌ای که با شاهد در سطح یک درصد اختلاف معنی‌داری را نشان نداد. اسانس رازیانه مؤثرترین اثر بازدارندگی روی رشد قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* را داشت، چنانکه حداقل غلظت بازدارندگی اسانس رازیانه ۱۵۰ میکرولیتر در لیتر بود. در ضمن با افزایش غلظت اسانس آویشن میانگین قطر پرگنه قارچ کاهش یافت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد اسانس رازیانه می‌تواند به عنوان قارچکش طبیعی جهت کنترل بیماریارگر *S. sclerotiorum* مورد استفاده قرار گیرد و هم‌چنین مشخص شد که افزایش غلظت اسانس و نوع اسانس می‌تواند تأثیر متفاوتی بر این بیماریارگر داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: اسانس گیاهی، پوسیدگی سفید ساقه کلزا، رازیانه

^۱ - گروه گیاهپزشکی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
* - نویسنده مسئول مقاله: samaneh.teymoori@gmail.com

مقدمه

امروزه کاربرد ترکیبات شیمیایی به عنوان ارزانترین و متداولترین روش کنترل بیماری‌های گیاهی مورد توجه است. اما با توجه به کند بودن فرآیند تجزیه این مواد در طبیعت، مسمومیت برای انسان و سایر جانداران غیرهدف، ایجاد مقاومت و افزایش تعداد گونه‌های مقاوم در عوامل بیماری‌زای گیاهی و به‌خصوص قارچ‌ها، نیاز به پژوهش در راستای یافتن ترکیبات جدیدی که تجدید شونده، سازگار با محیط زیست و به آسانی قابل تهیه و تولید باشند ضروری است. کاربرد ترکیبات ثانویه گیاهان، عصاره‌ها و اسانس‌ها به عنوان عوامل ضد میکروبی در صنایع غذایی، گیاهپزشکی و داروسازی رو به افزایش است (Isman, 2000; Burt, 2004). افزایش سریع تقاضا برای تولید میوه‌ها و سبزیجات ارگانیک، کاربرد ترکیبات طبیعی مثل روغن‌های فرار (اسانس) را بالا می‌برد. اخیراً بیش‌تر مطالعات روی فعالیت ضد قارچی اسانس‌ها علیه پاتوژن‌های قارچی گزارش شده است (Kalemba and Kunicka, 2003). در هر حال مطالعات اندکی، روی فعالیت ضد قارچی اسانس‌ها علیه پاتوژن خاکزاد *Sclerotinia sclerotiorum* انجام شده است (Edris and Farrag, 2003; Pitarokili et al., 2003). این قارچ در سرتاسر جهان انتشار دارد و بر روی بیش‌تر از ۴۸۰ گونه گیاهی که محصولات روغنی را نیز شامل می‌شود بیماری‌زا است (Motallebi et al., 2008). پوسیدگی ساقه که به‌وسیله این قارچ ایجاد می‌شود یکی از بیماری‌های مهم در سویا و کلزا است (Hind et al., 2003). این بیماری در ایران تاکنون از روی میزبان‌های گوناگونی چون آفتابگردان، کلزا، شب بو و کاهو گزارش شده است (Barari et al., 2009, Aghajani et al., 2000). آلودگی گیاهان روغنی هر زمانی بعد از ظهور گیاهچه می‌تواند روی دهد. این قارچ سبب خسارت شدید روی راندمان محصولات دانه روغنی نظیر آفتابگردان، سویا و کلزا می‌شود (Gulhua, 2003). با توجه به تأثیر قارچ‌کش‌ها و ایجاد مقاومت در برابر آنها استفاده از عوامل کنترل بیولوژیک و مواد طبیعی مؤثره گیاهان به همراه سایر روش‌های پیشگیری و کنترل جایگاه ویژه‌ای در مدیریت تلفیقی این بیماری به خود اختصاص داده است. کاربرد ترکیبات معطر گیاهی و اسانس‌ها در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی به‌وسیله دانشمندان و محققین گوناگون مورد بررسی قرار گرفته است و اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی گیاهان متعددی بر روی تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها و قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی تعیین گردیده است. به عنوان مثال هادیان و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که عصاره گیاهان چریش، سیر، زردچوبه و زیتون تلخ می‌تواند به عنوان قارچ‌کش‌های طبیعی جهت کنترل بیمارگرهای قارچی مورد استفاده قرار گیرد. آثار با‌دارندگی از رشد میسلیم قارچ *Botrytis cinerea* به‌وسیله آویشن، میخک و نعناع نیز در سال ۱۹۹۸ مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که اسانس آویشن از رشد میسلیمی قارچ جلوگیری نمود (Antonov et al., 1998). هدف از این پژوهش بررسی پتانسیل اسانس‌های سه گیاه دارویی آویشن، نعناع و رازیانه در کنترل قارچ *S. sclerotiorum* می‌باشد.

مواد و روش‌ها

در این آزمایش از اسانس‌های آویشن، تهیه شده از پیکره رویشی گیاه (*Thymus vulgaris*)، اسانس نعناع تهیه شده از برگ گیاه (*Mentha piperita*) و اسانس رازیانه تهیه شده از میوه (دانه) گیاه (*Foeniculum vulgare*) استفاده شد. اسانس‌ها به‌وسیله تقطیر با بخار آب و با استفاده از دستگاه کلونجر به‌وسیله بخش باغبانی دانشگاه فردوسی مشهد تولید شدند. قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* عامل پوسیدگی سفید ساقه کلزا از بخش گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان دریافت گردید. بمنظور تجدید کشت قارچ یک حلقه از حاشیه پرگنه آن برداشته شده و روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار (PDA) که مناسب برای رشد اکثر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی می‌باشد، کشت داده شده تا در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گیرد. برای بررسی اثرهای ضد میکروبی اسانس‌ها از روش اختلاط با محیط کشت استفاده شد. برای این منظور از اسانس‌های مورد نظر در اتانول ۷۵ درصد، امولسیون تهیه شد. هم‌چنین اتانول ۷۵ درصد و محیط بدون اسانس به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDA پس از اتوکلاو، در دمای اتاق قرار داده شد تا دمای آن به ۴۲-۴۵ درجه سانتی‌گراد برسد. غلظت‌های ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکرولیتر در لیتر از

اسانس‌های آویشن، نعناع و رازیانه به‌گونه جداگانه با استفاده از دستگاه سمپلر در شرایط کاملاً استریل به فلاسک‌ها اضافه گردیده و هم زده شد تا امولسیون یکنواختی ایجاد گردد سپس محیط‌های حاصل بلافاصله به پتری‌های ۹ سانتی‌متری استریل منتقل گردید. حلال اتانول ۷۵ درصد و اسانس بلافاصله بعد از خنک شدن محیط و قبل از انجماد آن با غلظت‌های فوق به محیط اضافه گردید. پتری‌های شاهد حاوی همان مقدار از حلال اتانول ۷۵ درصد و آب مقطر حل شده در محیط PDA بودند. دیسک‌های قارچی فعال و جوان به قطر ۶ میلی لیتر از قارچ *S. sclerotiorum* که به‌وسیله چوب پنبه سوراخ کن برداشته شدند بر روی مرکز محیط قرار داده شد. بعد از مسدود نمودن دور پتری‌ها با پارافیلیم، پتری‌های تلقیح شده به درون انکوباتور با دمای 1 ± 25 انتقال یافتند. رشد شعاعی پرگنه قارچ در هر پتری روزانه اندازه گیری شد. برای هر تیمار ۴ تکرار در نظر گرفته شد. درصد بازدارندگی غلظت‌های گوناگون اسانس‌ها با بهره گیری از فرمول Abott محاسبه گردید.

$$IP = C - T / C * 100$$

IP = درصد بازدارندگی

C = میانگین قطر پرگنه قارچ در تیمار شاهد

T = میانگین قطر پرگنه قارچ در تیمار مورد نظر

میانگین رشد پرگنه برای هر قارچ در هر تکرار و برای هر پتری هر ۲۴ ساعت به مدت ۵ روز با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$D_i = \sum [(D_i + D_{i-1}) \times (t_i - t_{i-1})] / 2$$

به‌گونه‌ای که D_i بیانگر مقدار رشد هاله در زمان t_i است. داده‌های مربوط به میانگین رشد از راه جدول تجزیه واریانس (ANOVA) مورد تجزیه قرار گرفتند و نتایج آزمایش به‌صورت فاکتوریل و در قالب طرح کاملاً تصادفی به‌وسیله نرم افزار SAS مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. بمنظور صحت نتایج این آزمایش دو بار تکرار شد.

نتایج و بحث

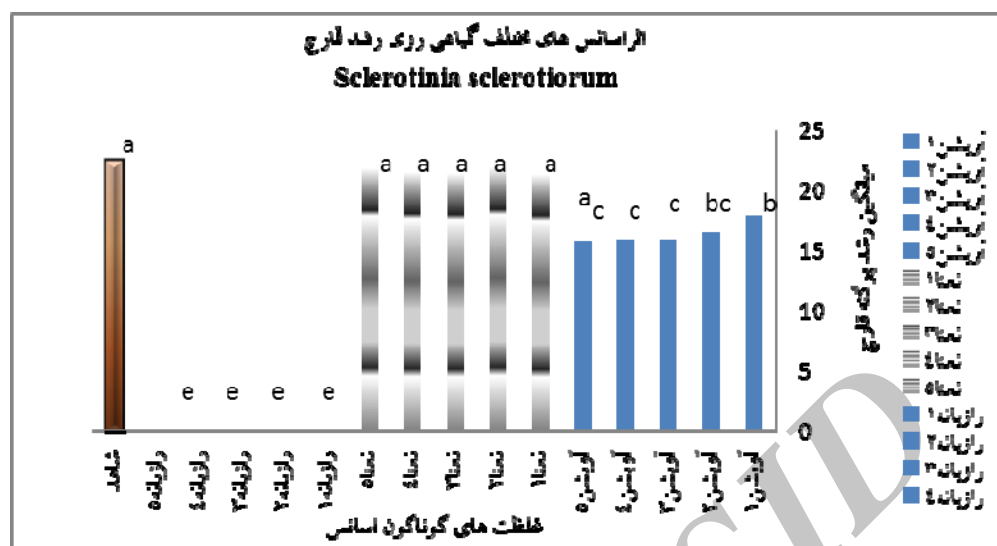
نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل این آزمایش نشان داد که اسانس‌های گوناگون گیاهی از نظر بازداری رشد میسلیموم قارچ با هم اختلاف معنی‌داری در سطح یک درصد دارند (جدول ۱). بمنظور تعیین مؤثرترین اسانس در رشد قارچ از روش مقایسه میانگین‌ها به‌وسیله آزمون LSD در سطح یک درصد استفاده شد.

جدول ۱- تجزیه واریانس اثرات ضد قارچی عصاره‌های مورد بررسی علیه *Sclerotinia sclerotiorum*

منبع تغییرات	درجه آزادی	مربع میانگین‌ها	MS	ضریب
تیمار	۱۴	۴۹۹۷/۲۳۴۴۸۳	۳۵۶/۹۴۵۳۲۰	۲۹۶/۱۱**
اثر عصاره‌ها	۲	۴۹۸۷/۸۷۸۵۲۳	۲۴۹۳/۹۳۹۲۶۲	۲۰۶/۸۶**
اثر دوز مصرفی	۴	۳/۶۴۶۵۳۳	۰/۹۱۱۶۳۳	۰/۷۶ ^{ns}
اثرات متقابل	۸	۵/۷۰۹۴۲۷	۰/۷۱۳۶۷۸	۰/۵۹ ^{ns}
خطا	۴۵	۵۴/۲۴۵۹۵۰	۱/۲۰۵۴۶۶	
کل	۷۹	۵۰۵۱/۴۸۰۴۳۳		

* معنی دار در سطح یک درصد

نتایج مقایسه میانگین‌ها در سطح یک درصد نشان داد که بین شاهد و اسانس نعناع اختلاف معنی‌داری وجود ندارد (شکل ۱) و این نشان دهنده عدم تأثیر کافی این اسانس با غلظت‌های مورد استفاده در آزمایش فوق روی رشد ریشه قارچ اسکروتینیا می‌باشد. افزایش غلظت اسانس آویشن رشد پرگنه قارچ را کاهش داد و در تیمار با اسانس رازیانه بیمارگر توانست فقط در غلظت ۷۵ میکرولیتر رشد کند و در غلظت‌های بالاتر هیچ رشدی مشاهده نشد و این نتیجه بیانگر این مطلب است که اسانس رازیانه بیش‌ترین تأثیر بازدارندگی را بر رشد قارچ مذکور داشته است.



شکل ۱- مقایسه میانگین رشد کلنی قارچ در تیمار شاهد با رشد کلنی در محیط کشت حاوی غلظت‌های گوناگون اسانس‌های آویشن، نعناع و رازیانه پس از ۴ روز نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

با افزایش غلظت اسانس آویشن رشد برگه قارچ کاهش یافت و تمام غلظت‌های مورد استفاده دارای اثر مهارکنندگی روی رشد قارچ بودند. اما هیچ کدام مانع رشد میسلیم‌های قارچ نگردیدند در نتیجه حداقل غلظت بازدارندگی این اسانس با غلظت‌های به کار برده شده در این آزمایش مشخص نشد. در مورد اسانس رازیانه فقط در غلظت ۷۵ میکرولیتر قارچ رشد داشت و در غلظت‌های ۱۵۰، ۳۰۰، ۶۰۰ و ۱۲۰۰ هیچ رشدی مشاهده نگردید، به گونه‌ای که حداقل غلظت بازدارندگی اسانس رازیانه ۱۵۰ میکرولیتر در لیتر بود. این نتیجه بیانگر این مطلب است که اسانس رازیانه بیش‌ترین تأثیر مهارکنندگی روی رشد قارچ عامل پوسیدگی سفید ساقه کلزا را داشت.

استفاده از اسانس‌ها در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی در سال‌های اخیر با توجه به بروز برخی مشکلات و تهدیدهای ناشی از مصرف سموم شیمیایی در سیستم‌های کشاورزی به عنوان یک روش بیولوژیک در کنترل آفات، بیماری‌ها و علف‌های هرز مطرح گردیده است. با وجود اینکه فعالیت ضد قارچی عصاره و اسانس گونه‌های گوناگون گیاهی از قبیل پونه کوهی و درمنه علیه *S. sclerotiorum* قبلاً گزارش شده (Edris and Farrag, 2003; Pitarokili *et al.*, 2003)، اما این اولین پژوهش در بررسی فعالیت ضدقارچی اسانس‌های آویشن، نعناع و رازیانه علیه این قارچ در شرایط آزمایشگاه است.

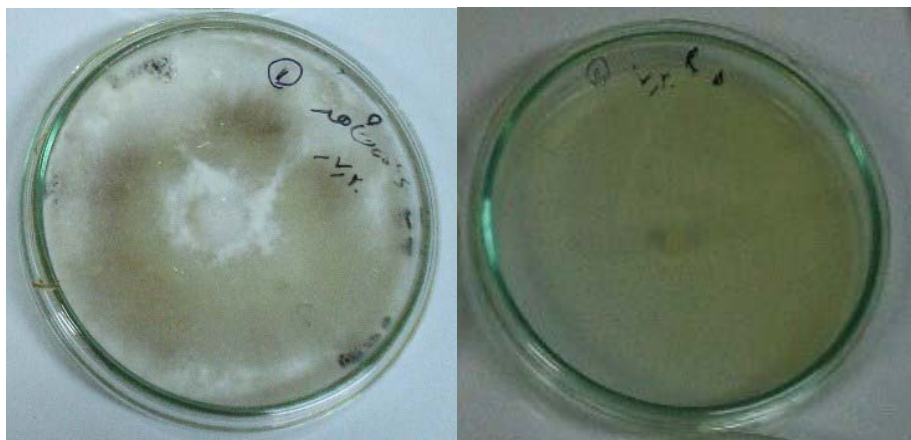
خاصیت ضد میکروبی اسانس گیاهان به ترکیبات شیمیایی آنها بستگی دارد. این نتایج در مورد اثر ضد میکروبی اسانس آویشن در سایر بررسی‌ها نیز تأیید شده و علت این امر وجود ترکیبات فنلی نظیر تیمول^۱ و کارواکرول^۲ می‌باشد (Cavalcanti *et al.*, 2006; Cowan, 1999). فکور و همکاران (۲۰۰۷) اثر ضدقارچی اسانس آویشن از راه مهار رشد قارچ *Aspergillus parasiticus* مولد آفلاتوکسین را بیان کردند. اسانس نعناع تأثیر چندانی در کنترل رشد قارچ *S. sclerotiorum* نداشت. به عبارت دیگر غلظت‌های استفاده شده در این آزمایش برای خاصیت ضدقارچی این اسانس کافی نبوده و باید غلظت‌های بیش‌تری از اسانس نعناع بکار رود. بررسی‌های رنجبر و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند که این اسانس کمترین تأثیر را بر روی قارچ‌های عامل پوسیدگی و کپک‌زدگی پس از برداشت میوه توت فرنگی شامل *Aspergillus niger* و *Botrytis cinerea* و *Rhizopus stolonifer* داشت. در مورد اثرات ضدباکتریایی اسانس نعناع گزارش‌های متنوعی وجود دارد نظیر اثر ضدباکتریایی

^۱- Thymol

^۲- Carvacrol

این اسانس بر روی باکتری‌های عامل بیماری نواری گندم و جو (*Xanthomonas translucens* pv. *translucens* و *X. t.* pv. *Cerealis*) که به‌وسیله بیکی و علیزاده (۲۰۰۶) معرفی شد و طی پژوهش‌های گوناگون نشان داده شده است که منتول^۱ موجود در اسانس نعنای دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد.

اسانس رازیانه فعالیت ضد قارچی قابل ملاحظه‌ای علیه *S. sclerotiorum* داشت (شکل ۲) به‌گونه‌ای که فقط در غلظت ۷۵ میکرولیتر بر لیتر قارچ رشد اندکی داشت و در غلظت‌های بالاتر مانع رشد قارچ گردید. خاصیت ضد میکروبی اسانس رازیانه مربوط به ترکیب آنتول^۲ می‌باشد که توانایی جلوگیری از رشد چندین قارچ بیماری‌زای گیاهی و انسانی را نشان داده است (Mimica-Dukic et al., 2003; Paster et al., 1995; Soyulu et al., 2006). پیغامی آشنایی و همکاران (۲۰۰۸) نیز بیان کردند که اسانس‌های میخک هندی و رازیانه فعالیت قارچ کشی قابل توجهی علیه *Botrytis cinerea* دارند.



شکل ۲- عدم رشد شعاعی ریشه قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* در پتری حاوی مقدار ۱۲۰۰ میکرولیتر اسانس رازیانه در مقایسه با تیمار شاهد پس از ۵ روز

حساسیت گونه‌های قارچی بسته به نوع اسانس و غلظت‌های گوناگون آن متفاوت است. تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس‌های گیاهی به ترکیب آنها بستگی دارد. یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به‌صورت تشدیدکنندگی با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضد قارچی اسانس را باعث شود (Plotto et al., 2003). نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اسانس رازیانه و آویشن روی رشد قارچ *S. sclerotiorum* اثر مهارکنندگی دارند و در شرایط آزمایشگاه می‌توان از اسانس رازیانه به عنوان قارچکش طبیعی جهت کنترل عامل پوسیدگی سفید ساقه کلزا استفاده نمود. همچنین مشخص شد که مقدار بازدارندگی از رشد میسلیمیوم قارچ به نوع اسانس و غلظت آن وابسته می‌باشد به‌گونه‌ای که گیاهان آویشن و نعنای باید در غلظت‌های بالاتری نسبت به رازیانه به کار برده شوند. امید است نتایج این پژوهش بتواند در کنار سایر آزمایش‌ها در رسیدن به اهداف مدیریت بیماری به‌وسیله روش‌های بیولوژیک سودمند باشد و به جای استعمال سموم متداول که دارای اثرات سوء برای مصرف‌کنندگان هستند در کنترل بیماری‌های گیاهی از اسانس‌های طبیعی استفاده شود که کمترین خطر را برای محیط زیست و سلامت انسان، دام و گیاه دارند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از استاد گرامی آقای مهندس افضلی مربی پژوهشی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی شهرستان مشهد بخش گیاهپزشکی به خاطر راهنمایی‌های ارزشمندشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

^۱- Menthol
^۲- Anethole

References

1. Aghajani M A, Safaie N and Alizadeh A. 2009. Impact of *Sclerotinia* stem rot on canola yield in Golestan province. *Journal of Plant Production* 16(4): 109-124.
2. Antonov A, Stewart A and Walter M. 1998. Inhibition of conidium germination and mycelia growth of *Botrytis cinerea* by natural products. *Newzealand Plant Protection*. 159-164.
3. Barari H, Zamani-zadeh H, Ershad J and Forotan A. 2000. Distribution of canola stems white rot in Mazandaran. *Proceeding of the 14th Iranian Plant Protection congress*. Abstract. P. 295.
4. Beiki F and Alizadeh A. 2006. Antibacterial effects of some herbal essential oils and plant extracts on the causal agent of bacterial leaf streak in wheat and barely. *Journal of Agriculture and Natural Resources*. 13(5): 1-13.
5. Burt S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology* 94: 223-253.
6. Cavalcanti C T, Camara R, Mariano R L, Willadino L, Marcelino C and Ulisses C. 2006. Antimicrobial Action of Essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 527-535.
7. Cowan MM. 1999. Plant Protection as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564-582.
8. Edris A E and Farrag E S. 2003. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. *Nahrung/ Food*. 47: 117-121.
9. Fakoor M H, Allameh A, Rasooli I and Mazaheri M. 2007. Antifungal effects of *Zataria multiflora* Boiss. and *Thymus eriocalyx* (Ronniger) Jalas essential oils on aflatoxin producing *Aspergillus parasiticus*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*. 23: 269-277.
10. Gulhua L. 2003. Engineering *Sclerotinia sclerotiorum* resistance in oilseed crops. *Afr. J. Biotechnol.* 2: 509-516.
11. Hadian Sh, Shamloo P, Monazm K and Khandooz E. 2011. Effect of some aqueous plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* casual agent of tomato. *J. Plant Science Res.* 21: 68-77.
12. Hind T L, Ash G J and Muray G M. 2003. Prevalence of *Sclerotinia* stem rot of canola in new south wales. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 43 :2. 163-168.
13. Isman B M. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*. 19: 603- 608.
14. Kalembe D and Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*. 10 (10): 813-829.
15. Mimica-Dukic N, Kujundzic S, Sokovic M and Couladis M. 2003. Essential oil composition and antifungal activity of *Foeniculum vulgare* Mill. obtained by different distillation conditions. *Phytotherapy Research* 17: 368–371.
16. Motallebi M, Afshari Azad H and Zamani M R. 2008. Polygalacturonase production by *Sclerotinia sclerotiorum*, causal agent of canola stem rot: Parameter optimization using Taguchi approach. *World Applied Sciences Journal* 3(1): 96-101.
17. Paster N, Menasherov M, Ravid U and Juven B. 1995. Antifungal activity of oregano and thyme essential oils applied as fumigants against fungi attacking stored grain. *Journal of Food Protection* 58: 81–85.
18. Peighami-Ashnaei S, Farzaneh M, Hadian J, Sharifi-Tehrani A and Ghorbanpoor M. 2008. Evaluation of antifungal activity of some plant essential oils against the grey mold of apple caused by *Botrytis cinerea*. *Agricultural research* 7(3): 1-10.
19. Pitarokili D, Tzakou O, Loukis A and Harvala C. 2003. Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *Agriculture Food Chemistry* 51:3294-3301.
20. Plotto A, Roberts D and Roberts R G. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of Tomato (*Lycopersicon Esculentum*). *Acta Horticulturae* 628: 737-745.

21. Ranjbar H, Farzaneh M, Hadian J, Mirjalili M H and Sharifii R. 2009. Effect of some essential oils on Post harvest of strawberry. *Pajouhesh and Sazandegi* 81: 54-60.
22. Soylu E M, Soylu S and Kurt S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathologia* 161: 119-128.

Archive of SID

Archive of SID