**دوفصلنامه تحقیقات بیماری‌های گیاهی**
**سال پنجم، شماره دوم، پاییز و زمستان 1396**
**صص 68-55**

# اثر عصاره¬های نعناع گربه¬ای، توتون و آویشن کوهی بر قارچ عامل بیماری پوسیدگی یقه توتون

**سید افشین سجادی*[1]، محمد علی مختاری گل چالسری[2]، عبدالقیوم ابراهیمی[3]**

تاریخ دریافت: 95/5/31 تاریخ پذیرش:96/1/14

## چکیده

قارچ عامل بیماری پوسیدگی یقه توتون (*Sclerotinia sclerotiorum*) از عوامل مهم بیماری‌زا در توتون می‌باشد که در تمام نقاط دنیا پراکنده بوده و می‌تواند موجب ایجاد خسارت محصول در کشورهای تولید کننده توتون گردد. مدیریت این بیماری با سموم شیمیایی، ارقام مقاوم، مهار زیستی و همچنین با عصاره‌های گیاهی و روغن‌ها و غیره انجام می‌شود. در این تحقیق، اثر رقت‌های 1 و 2 در هزار عصاره نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی استخراج شده با حلال‌های آب، استون، هگزان، اتانل و متانول در شرایط آزمایشگاه روی قارچ عامل بیماری به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار بررسی شد. بررسی حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های گیاهی با روش اختلاط با محیط کشت انجام شد. عصاره نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی اثر بازدارندگی قابل‌توجهی بر رشد قارچ مورد بررسی داشتند. بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره متانولی، اتانولی و هگزانی بود. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره متانولی، اتانولی و هگزانی نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی بر قارچ مورد بررسی، 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. مهم‌ترین ترکیبات در عصاره گیاهی نعناع گربه‌ای شامل: منتانول، منتول، سایلن، تیمول، پیپرتنن، نوننال، کارواکرول، کامفور و لمونن، در عصاره گیاهی توتون شامل: گلوبولول، فیتول، نیکوتین، سایلن، ایمیدازول، لمونن و تونبرگول و در عصاره گیاهی آویشن کوهی شامل تیمول، آنتول ترانس، سایلن، کارواکرول، ایمیدازول و نوننال بود. بنابراین، عصاره گیاهان نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی می‌تواند به عنوان قارچ‌کش طبیعی جهت مهار قارچ عامل بیماری پوسیدگی یقه توتون مورد توجه باشد.

**واژه‌های کلیدی**: عصاره گیاهان نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی، پوسیدگی یقه توتون، *Sclerotinia sclerotiorum*.

[1]- مربی پژوهش، بخش گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش، تیرتاش، بهشهر، ایران.
[2]- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه گیاه‌پزشکی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.
[3]- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، واحد گرگان، دانشگاه آزاد اسلامی، گرگان، ایران.
*- نویسنده مسئول مقاله: sajjadia_a@yahoo.com

**مقدمه**

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) گیاهی از تیره سیب‌زمینی است که در اقتصاد کشورهای تولید کننده از جمله چین، یونان، ترکیه، برزیل، ژاپن و آمریکا نقش مهمی دارد. سطح زیر کشت این گیاه در جهان بیش از پنج میلیون هکتار و کل تولید توتون بیش از 7 میلیون تن در سال است. سطح زیر کشت توتون سیگارت در سال 1393 در ایران برابر با 6100 هکتار و تولید برگ خشک برابر با 11000 تن بوده است (Anonymous, 2012).

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* Bary موجب پوسیدگی یقه[1] درگیاهچه‌های توتون[2] می‌شود. علایم این بیماری در طی دوره رشد گیاهچه‌ها در خزانه به صورت پوسیدگی نرم و به رنگ قهوه‌ای در ساقه ظاهر می‌شود و به برگ‌ها توسعه می‌یابد و گیاهچه‌ها به سرعت نابود می‌شوند (Lucas, 1975). این بیماری از تمام مناطق توتون-کاری جهان گزارش شده است (Lucas, 1975) و به بیش از 400 گونه گیاهی خسارت وارد می‌کند. این بیماری در بیشتر مناطق توتون‌کاری استان‌های مازندران و گلستان شایع بوده و در برخی از خزانه‌ها تا 60% آلودگی مشاهده می‌شود و به طور متوسط تا 20% نشاهای موجود در سطح خزانه‌ها بر اثر این بیماری غیر قابل استفاده می‌شوند (Sajjadi and Assemi, 2012).

یکی از روش‌های نوین در جهت مهار بیماری‌های گیاهی استفاده از مواد و ترکیبات طبیعی با منشا گیاهی است. در این بین اهمیت ترکیبات طبیعی گیاهان در مهار انواع بیماری‌های گیاهی بارز و برجسته است؛ زیرا از یک سو برای تعدادی از عوامل بیماری‌زای خاکزاد و بذرزاد، روش مهار موثر و پایداری وجود ندارد (Hasanzadeh, 2005) و از سوی دیگر پیدایش پدیده مقاومت به انواع سموم شیمیایی، مسمومیت‌های ناشی از مصرف آنها در جانوران، آبزیان و حشرات مفید و نیز اثرات منفی باقیمانده سموم، مشکلات زیادی را برای سلامت انسان و محیط زیست فراهم آورده است (Gupta and Tripata, 2011; Abdolmaleki *et al*., 2011a). از این رو، بسیاری از کشورها با استفاده از فن‌آوری جدید تهیه و فرمولاسیون آفت‌کش‌های غیر شیمیایی از جمله آفت‌کش‌های با پایه گیاهی مبادرت به مهار تلفیقی بیماری‌های مهم گیاهی نموده‌اند (Amadioha, 2000).

پیراجنو و همکاران (Pirajno *et al*., 2004) در ایتالیا با استفاده از اسانس سه گونه گیاهی برگ بو[3]، نعناع فلفلی[4] و سداب[5] (از خانواده مرکبات) در سه غلظت 15، 30 و 45 میکرولیتر به ازای هر پلیت توانستند قارچ‌های *R. solani* و *Sclerotinia sclerotiorum* را تا 100% مهار نمایند. اوبونگویا و همکاران (Obongoya *et al*., 2010) اثرات عصاره گیاهان چریش[6]، توتون[7]، جعفری مکزیکی[8] و پروانش[9] را بر قارچ خاکزی بیماری‌زای لوبیا[10] در کنیا بررسی نمودند. عصاره گیاه چریش بیشترین اثر و گیاه پروانش کمترین اثر را در بازدارندگی رشد قارچ داشتند. در

[1]- Collar rot
[2]- *Nicotiana tabacum*
[3]- *Laurus nobilis*
[4]- *Mentha piperita*
[5]- *Ruta graveolens*
[6]- *Azadirachta indica*
[7]- *Nicotiana tabacum*
[8]- *Tagetes minuta*
[9]- *Vinca rosa*
[10]- *Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli*

تحقیقی مشخص شد با عصاره‌گیری، پروتئین‌ها و مواد تحریک‌کننده القا مقاومت هم در عصاره وجود دارد که با محلول‌پاشی بر روی گیاه، مقاومت گیاه به عوامل بیماری‌زا بیشتر می‌شود (Abad *et al*., 1996). آبد و همکاران (Abad *et al*., 1996) با بررسی اثرات ضدقارچی پروتئین اسموتین برگ توتون رقم ویسکونسین 38 نسبت به 18 قارچ بیماری‌زا، گونه‌های مختلف قارچ‌های فیتوفترا، فوزاریوم و بایپولاریس را حساس گزارش کردند و مکانیزم عمل را افزایش نفوذپذیری غشا پلاسمایی قارچ معرفی نمودند. نتایج تحقیقات عبدالملکی و همکاران (Abdolmaleki *et al*., 2011a) نشان داد که منتول، استرهای منتول و ترکیبات فلاونوییدی دارای فعالیت ضدمیکروبی می‌باشند. ترکیبات اصلی در عصاره گیاهی توتون، نیکوتین، لمونن، سایلن، تونبرگول[1]، پیریدین، فنانترن، فیتول[2]، گلوبولول[3] و ایمیدازول[4] بود. الرحماه و همکاران (Al-Rahmah *et al*., 2011)، گلوبولول، سایلن، سایلن، والنسن و اکالیپتول را ترکیبات موثر ضدقارچی در اکالیپتوس[5] معرفی کردند. حساسیت گونه‌های قارچی بسته بسته به نوع عصاره‌ها و غلظت‌های گوناگون آن متفاوت است. تفاوت در فعالیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی به ترکیب آن‌ها بستگی دارد. یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا به صورت تشدیدکنندگی با سایر ترکیب‌ها فعالیت ضدقارچی عصاره را باعث شود (Plotto *et al*., 2003). از آنجایی که اغلب ترکیبات گیاهی با خواص ضدقارچی، ترکیبات آلی اشباع شده یا ترکیبات آروماتیک هستند، از حلال‌های اتانولی یا متانولی برای استخراج آن‌ها استفاده می‌شود و در واقع در بسیاری از مطالعات، از کاربرد آب به منظور جداسازی ترکیبات موثر گیاهی اجتناب شده است (Abdolmaleki *et al*., 2011a).

این تحقیق با هدف تعیین فعالیت ضد قارچی عصاره گیاهان نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی بر رشد میسیلیومی قارچ بیماری‌زای *Sclerotinia sclerotiorum* و انتخاب حلال مناسب برای عصاره‌گیری انجام شده است.

## مواد و روش‌ها

### تهیه عصاره‌های گیاهی

نمونه توتون از مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش واقع در شرق مازندران و نمونه‌های نعناع گربه‌ای و آویشن کوهی از ارتفاعات کوهستانی سرخگریوه شهرستان گلوگاه واقع در شرق مازندران در اواخر خرداد 1393 تهیه گردید و به آزمایشگاه بخش شیمی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش منتقل و بلافاصله اقدام به عصاره‌گیری شد. بخش‌های گل و برگ نعناع گربه‌ای و آویشن کوهی و ضایعات برگ توتون پس از شستشوی سطحی، با هیپوکلریت سدیم 2% حدود 5 دقیقه ضدعفونی شده و سپس سه بار با آب مقطر سترون شسته شدند (Alam *et al*.,2011; Al-Rahmah *et al*., 2011;). سپس نمونه‌ها در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش نور مستقیم آفتاب خشک و پودر شده و از الک 1 مش عبور داده شدند (Abdulaziz *et al*., 2010). برای عصاره‌گیری 5 گرم از بافت آسیاب شده با 100

[1]- Thunbergol
[2]- Phytol
[3]- Globulol
[4]- Imidazole
[5]- *Eucalyptus globolus*

میلی لیتر حلال به مدت 24 ساعت در دمای 20 درجه سلسیوس روی شیکر قرار داده شد. برای عصاره‌گیری با آب، نمونه مخلوط شده با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره 1 صاف شده و برای تبخیر آب، در آون با دمای 55/5 درجه سلسیوس قرار داده شد (Azimi *et al*., 2006). برای عصاره‌گیری با استون و هگزان، حلال از نمونه مخلوط شده جدا شد و سپس جهت تبخیر حلال و استحصال عصاره زیر هود قرار داده شد. (Shariff *et al*., 2006). برای عصاره‌گیری با متانول و اتانول، به 75 میلی‌لیتر از نمونه مخلوط شده 25 میلی‌لیتر آب مقطر سترون اضافه شد و به آن 100 میلی‌لیتر هگزان اضافه شد. این مخلوط دو ساعت روی شیکر قرار داده شده و بخش‌های مختلف به کمک دکانتور جدا شده و بخش متانولی جهت تبخیر متانول و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد. عصاره‌گیری با اتانول با همین منوال انجام گرفت، با این تفاوت که در این مورد از هگزان استفاده نشد ( Bahraminejad *et al*., 2011).

**جداسازی عامل بیماری**

نمونه‌برداری از گیاهچه‌های مبتلا به پوسیدگی یقه در خزانه‌های توتون مرکز تحقیقات توتون تیرتاش و نیز خزانه‌های توتون روستاهای اطراف آن در بهار 1393 صورت گرفت. از نقاط آلوده خزانه‌ها که گیاهچه‌های واقع در آن‌ها دارای علایم آبسوختگی و نیز میسلیوم پنبه‌ای روی ساقه بودند نمونه‌هایی انتخاب شد. قطعاتی از نواحی حد فاصل بافت سالم و آلوده تهیه و پس از ضدعفونی سطحی روی محیط کشت آب آگار و سیب‌زمینی دکستروز آگار کشت شدند (Sajjadi and Assemi, 2012). پس از رشد قارچ ها، گونه‌های مشکوک به *S. sclerotiorum* جداسازی و خالص‌سازی شده و جهت شناسایی دقیق، خصوصیات جدایه‌ها با مشخصات ذکر شده توسط کوهن (Kohn, 1979) مطابقت داده شد. جدایه‌ها جهت آزمایش‌های بعدی در یخچال در دمای 5 درجه سلسیوس نگهداری شدند.

**ارزیابی اثر بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ**

عصاره‌های استحصال شده با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت جهت ارزیابی اثر ضدقارچی مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه محیط‌های کشت حاوی غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی ابتدا محلول 1% عصاره‌های گیاهی در آب مقطر استریل تهیه شد. ارلن‌های حاوی 100 میلی‌لیتر محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار (ساخت شرکت Micromedia) در دمای $^{o}C$ 121 و فشار یک اتمسفر به مدت 20 دقیقه اتوکلاو شده و در دمای اتاق قرار داده شد و بعد از اینکه دمای آن به حدود $^{o}C$ 45-40 رسید، مقدار0، 10 و 20 میلی‌لیتر از محلول 1% عصاره‌های گیاهی به ارلن‌ها افزوده تا غلظت‌های 0، 1000 و 2000 پی‌پی‌ام تهیه گردد. سپس به داخل تشتک‌های سترون ریخته شد. 48 ساعت پس از ریختن محیط در تشتک‌ها، دیسکی به قطر 7 میلی‌متر از حاشیه کشت سه روزه قارچ برداشته و در مرکز هر تشتک قرار داده شد. تشتک‌ها داخل انکوباتور در دمای 25 درجه سلسیوس نگهداری و تا زمان اشغال سطح محیط کشت در تشتک‌های شاهد میزان رشد میسلیومی (قطر پرگنه) در هر تشتک در ساعت معین (10 صبح) اندازه‌گیری و ثبت شد (Yanar *et al*., 2011). درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Anil Sehajpal and Parminder, 2009; Dissanayake and Kumari, 2012):

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{(قطر پرگنه قارچ در تشتک پتری تیمار - قطر پرگنه قارچ در تشتک پتری شاهد)}}{\text{قطر پرگنه قارچ در تشتک پتری شاهد}} \times 100$$

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. حداقل غلظت بازدارندگی کامل عصاره‌های گیاهی از رشد قارچ‌ها طبق روش مارچتی و همکاران (Marchetti *et al*., 2000) محاسبه شد. همچنین غلظتی که باعث 50% بازدارندگی[1] رشد میسیلیومی قارچ شد با بهره‌گیری از آنالیز پروبیت نرم افزار SPSS (ver. 9) محاسبه گردید. به منظور بررسی ویژگی قارچ‌کشی[2] یا قارچ‌ایستایی[3] عصاره‌های گیاهی، دیسک قارچی تیمارهایی که رشد قارچی در آن‌ها مشاهده نگردید روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار واکشت شد و رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت پس از یک هفته بررسی گردید.

**شناسایی ترکیبات عمده عصاره‌های گیاهی مورد آزمایش**

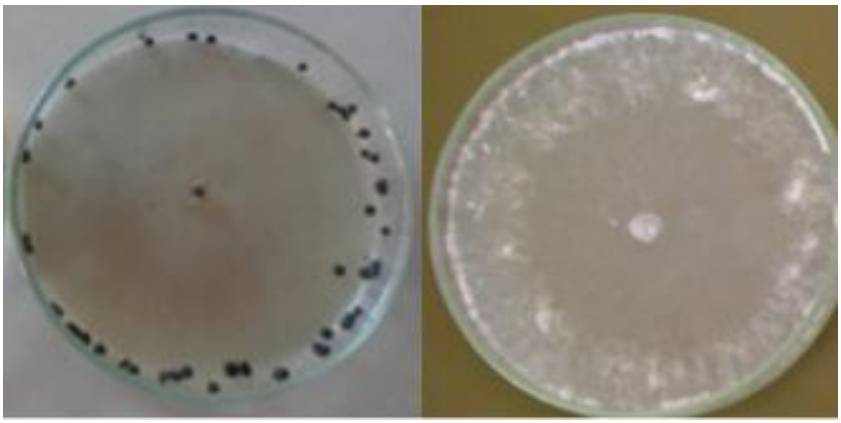
عملیات خالص‌سازی عصاره با استفاده از دستگاه روتاری یا تقطیر در خلا انجام شده و با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی کوپل شده با دتکتور جرمی، ترکیبات موثر بر بیماری شناسایی شدند. به این منظور عصاره گیاهان به دستگاه GC-MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها بر اساس شاخص بازدارندگی[4] و مقایسه طیف جرمی آن‌ها با ترکیب‌های پیشنهادی کتابخانه دستگاه انجام گرفت. درصد هر ترکیب با توجه به سطح زیر منحنی آن در طیف کروماتوگرام حاصل از دستگاه GC با روش نرمال کردن سطح منحنی و بدون محاسبه عامل تصحیح صورت گرفت (Adams, 1995). دستگاه گازکروماتوگراف متصل به طیف سنج جرمی از نوع Thermoquest-Finnigan مجهز به ستون 1-DB به طول 60 متر و قطر 0/25 میلی‌متر، با برنامه‌ریزی دمایی ستون از 60 تا 250 درجه سلسیوس با افزایش دمای 4 درجه سلسیوس در دقیقه، انرژی یونیزاسیون 70 الکترون ولت، گاز هلیوم و دمای محفظه تزریق 250 درجه سلسیوس بود.

## نتایج و بحث

### شناسایی عامل بیماری

از تمامی نمونه های به دست آمده از خزانه‌های آلوده به بیماری پوسیدگی یقه توتون، عامل بیماری *S. sclerotiorum* جداسازی شد و خصوصیات آن با مشخصات ذکر شده توسط کوهن (Kohn, 1979) مطابقت داشت (شکل 1) و جدایه‌ای که رشد سریعتر داشت انتخاب و برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

[1]- EC50: Half Maximal Effective Concentration
[2]- Fungicide
[3]- Fungistatistic
[4]- Retention index



شکل 1- رشد میسلیومی قارچ *S. sclerotiorum* پس از سه روز (راست) و تشکیل اسکلروت‌ها پس از پنج روز (چپ) بر روی محیط کشت سیب‌زمینی دکستروز آگار.

**اثر بازدارندگی عصاره‌های گیاهی بر رشد میسلیومی قارچ *Sclerotinia sclerotiorum***

اختلاف عصاره‌های گیاهی از لحاظ بازدارندگی بر قارچ عامل پوسیدگی یقه توتون در سطح احتمال 1 درصد معنی‌دار بود (جدول 1). نعناع گربه‌ای با بازدارندگی کامل در هر دو غلظت و در همه حلال‌ها بیشترین و عصاره آبی و استونی آویشن کوهی با 72/2% کمترین تأثیر بازدارندگی را روی رشد پرگنه قارچ داشتند. عصاره استونی توتون نسبت به عصاره آبی توتون در غلظت‌های مشابه اثر بیشتری بر بازدارندگی از رشد پرگنه این قارچ داشت. عصاره استونی و آبی توتون نسبت به آویشن کوهی در غلظت‌های مشابه از لحاظ بازدارندگی رشد قارچ برتری داشت. عصاره‌های متانولی، اتانولی و هگزانی توتون و آویشن کوهی در هر دو غلظت اثر مهارکنندگی کامل بر رشد پرگنه قارچ داشتند. (جدول 2؛ شکل 2)

جدول 1- تجزیه واریانس طرح کاملاً تصادفی تأثیر عصاره‌های گیاهی بر درصد کنترل پوسیدگی یقه توتون نسبت به شاهد

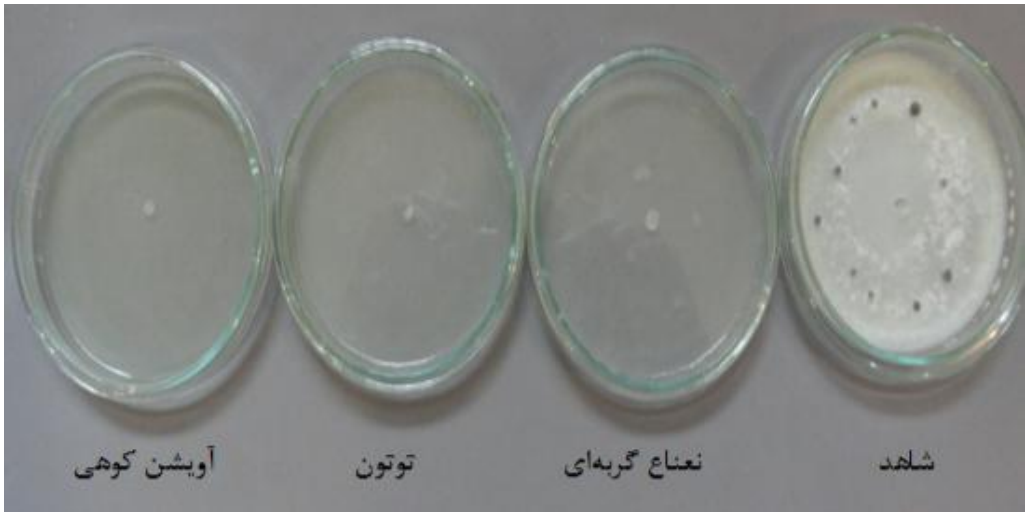
| منابع تغییرات | درجه آزادی | میانگین مربعات درصد کنترل |
|---|---|---|
| عصاره‌های گیاهی | 2 | 13913** |
| حلال | 4 | 4105** |
| غلظت | 2 | 379841** |
| گیاه× حلال | 8 | 414** |
| گیاه× غلظت | 4 | 3501** |
| غلظت × حلال | 8 | 1033** |
| گیاه× حلال× غلظت | 16 | 105** |
| خطا | 90 | 1/28 |
| ضریب تغییرات ( درصد) | | 2/3 |

** معنی‌دار در سطح احتمال 1 درصد

جدول 2- مقایسه میانگین اثرات متقابل عصاره‌های گیاهی، حلال و غلظت بر درصد بازدارندگی از رشد پرگنه قارچ اسکلروتینیا اسکلروتیوروم

| گیاه | غلظت (ppm) | آب | استون | هگزان | اتانول | متانول |
|---|---|---|---|---|---|---|
| نعناع گربه‌ای (*Nepeta cataria*) | 0 | 0j | 0j | 0j | 0j | 0j |
| | 1000 | 100a | 100a | 100a | 100a | 100a |
| | 2000 | 100a | 100a | 100a | 100a | 100a |
| توتون (*Nicotiana tabaccum*) | 0 | 0j | 0j | 0j | 0j | 0j |
| | 1000 | 81/6e | 84/8d | 100a | 100a | 100a |
| | 2000 | 86/8c | 88/8b | 100a | 100a | 100a |
| آویشن کوهی (*Thymus pubescens*) | 0 | 0j | 0j | 0j | 0j | 0j |
| | 1000 | 72/2h | 72/2h | 100a | 100a | 100a |
| | 2000 | 77/7f | 77/7f | 100a | 100a | 100a |

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال 1 درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.




شکل 2- اثر بازدارندگی عصاره متانولی نعناع گربه‌ای توتون و آویشن کوهی در رقت 2000 قسمت در میلیون بر رشد قطر پرگنه قارچ *S. sclerotiorum*.

با افزایش غلظت عصاره‌های توتون و آویشن کوهی، اثر بازدارندگی روی رشد پرگنه قارچ بیشتر شد (جدول 3). در بین حلال‌های مختلف، متانول، اتانول و هگزان بیشترین و آب مقطر و استون کمترین تأثیر بازدارندگی را بر رشد پرگنه قارچ اسکلروتینیا داشتند (جدول 3) که این نتایج با تحقیقات عبدالملکی و همکاران (Abdolmaleki *et al.*, 2011a) همخوانی داشت. عصاره‌های آبی توتون در غلظت‌های 2/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر و نعناع گربه‌ای در غلظت 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و بالاتر و آویشن کوهی در غلظت 3 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به طور کامل از رشد پرگنه قارچ اسکلروتینیا جلوگیری کردند حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های استونی توتون و نعناع گربه‌ای

بر قارچ بیماری‌زای مذکور 2/5 و 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، درحالی‌که حداقل غلظت بازدارندگی عصاره هگزانی، اتانولی و متانولی توتون و نعناع گربه‌ای بر قارچ بیماری‌زای مورد بررسی 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (جدول 3). حداقل غلظت بازدارندگی عصاره هگزانی، اتانولی و متانولی آویشن کوهی بر قارچ بیماری‌زای مورد بررسی 1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و عصاره استونی و آبی آویشن کوهی به ترتیب 2/5 و 3 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود.

عصاره هگزانی، اتانولی و متانولی نعناع گربه‌ای و توتون در جلوگیری از رشد قارچ بیماری‌زای مورد بررسی با 0/5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کمترین EC50 (بازدارندگی 50% رشد میسیلیومی) را داشته و عصاره آبی آویشن کوهی با 0/9 میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین EC50 را داشت. عصاره آبی و استونی توتون و نعناع گربه ای و عصاره هگزانی، اتانولی و متانولی آویشن کوهی دارای EC50 0/7 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند و همچنین عصاره استونی آویشن کوهی دارای EC50 0/8 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جدول 4).

جدول3- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌های گیاهی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر رشد پرگنه قارچ اسکلروتینیا اسکلروتیوروم بر اساس روش اختلاط با محیط کشت

| گیاه | حلال | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | آب | استون | هگزان | اتانول | متانول |
| نعناع گربه‌ای (*Nepeta cataria*) | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| توتون (*Nicotiana tabaccum*) | 2/5 | 2/5 | 1 | 1 | 1 |
| آویشن کوهی (*Thymus pubescens*) | 3 | 2/5 | 1 | 1 | 1 |

جدول4- غلظت عصاره‌های گیاهی(میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای بازدارندگی پنجاه درصد رشد پرگنه (EC50) قارچ اسکلروتینیا اسکلروتیوروم در شرایط آزمایشگاه

| گیاه | حلال | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | آب | استون | هگزان | اتانول | متانول |
| نعناع گربه‌ای (*Nepeta cataria*) | 0/7 | 0/7 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| توتون (*Nicotiana tabaccum*) | 0/7 | 0/7 | 0/5 | 0/5 | 0/5 |
| آویشن کوهی (*Thymus pubescens*) | 0/9 | 0/8 | 0/7 | 0/7 | 0/7 |

نتایج بدست آمده از واکشت دیسک‌های قارچی اسکلروتینیا که در تیمارهای عصاره‌های گیاهی رشد قارچی نداشتند، نشان داد که در غلظت‌های مورد نظر عصاره‌های گیاهی نعناع گربه‌ای و توتون، رشد نکردند که این حالت نشان دهنده فعالیت قارچ‌کشی عصاره‌های گیاهی نعناع گربه‌ای و توتون می‌باشد ولی در خصوص عصاره آویشن کوهی، با توجه به رشد قارچ، نشان‌دهنده خاصیت قارچ ایستایی بود.

**ترکیبات عمده عصاره‌های گیاهی مورد آزمایش**

ترکیبات اصلی در عصاره گیاهی نعناع گربه‌ای شامل تیمول[1]، منتول[2]، منتانول[3]، نوننال[4]، فتالازین، سایلن[5]، پیریدین[6]، فنانترن، ایزوکوئینولین و متیل پیپرازین[7] بود. مشتقات ترپن‌ها نظیر ژرانیول، منتول و کامفور را ترپنویید[8] می‌گویند. این ترکیبات جزو متابولیت‌های ثانویه گیاهان و دارای ساختمان الکلی هستند (Hasanzadeh, 2005). منتول به فراوانی در نعناع گربه‌ای (32/4%) وجود دارد. ترکیبات اصلی در عصاره گیاهی در آویشن کوهی شامل تیمول، سایلن، آنتول ترانس، نفتالنول[9]، نوننال، فنانترن، آنیسول و کارواکرول بود. الرحماه و همکاران (Al-Rahmah *et al*., 2011)، گلوبولول، سایلن، والنسن و اکالیپتول را ترکیبات موثر ضدقارچی در آویشن[10] معرفی کردند. سلیمان (Suleiman, 2011) در نیجریه گزارش کرد که عصاره برگ توتون و نیم بر قارچ‌های بیماری‌زای گوجه‌فرنگی اثر بازدارندگی داشته و عصاره توتون در مقایسه با نیم، قارچ‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم را بهتر مهار می‌کند در حالی‌که در مورد قارچ رایزوپوس برعکس بود.

خاصیت ضدقارچی عصاره گیاهی توتون را می‌توان به ترکیبات نیکوتین (2/91%)، سایلن (1/7%)، فیتول (2/68%)، ایمیدازول (1/5) و گلوبولول (18/1%) نسبت داد. در تحقیقی با محلول‌پاشی نیکوتین به نسبت یک در هزار به بوته‌های توتون موجب مهار 71/62% روی قارچ‌های خاکزی بیماری‌زای توتون (*Rhizoctonia solani* و *Phytophthora nicotianae*) شدند (Sajjadi *et al*., 2014).

در تحقیقاتی بیان شد که برخی از عصاره‌های گیاهی به جهت خاصیت آب گریزی و ترکیباتی که در آن‌ها موجود است موجب مهارکنندگی قارچ‌ها می‌شوند. این خاصیت موجب می‌شود که آن‌ها بتوانند در غشای دیواره سلولی قارچ و میتوکندری نفوذ کنند وبا اختلال در ساختار آن‌ها شده موجب نشت یونی به خارج سلول و در نهایت مرگ آن شوند (Burt, 2004). گروهی از محققان اعتقاد دارند که ترکیبات ضدمیکروبی 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-Rahmah *et al*., 2011).

ترکیبات منتانول و منتول به ترتیب با 36/2% و 32/4% بیشترین میزان متابولیت ثانویه موجود در عصاره گیاهی نعناع گربه‌ای می‌باشند. با توجه به اینکه این ترکیبات خاصیت ضدقارچی دارند (جدول 5) (Abdolmaleki *et al*., 2011b) بنابراین می‌توان این ترکیبات را به تنهایی و یا در تعامل با یکدیگر به عنوان عامل مؤثر در خاصیت ضدقارچی نعناع گربه‌ای مورد بررسی قرار داد.

---

[1]- Thymol
[2]- Menthol
[3]- Menthanol
[4]- Nonenal
[5]- Silane
[6]- Pyridine
[7]- Methyl piperazin
[8]- terpenoid
[9]- Naphthalenol
[10]- *Thymus vulgaris*

جدول 5- نوع و درصد ترکیبات شیمیایی در عصاره‌های گیاهی

| Compound | RI* | Tobacco توتون | Thyme آویشن کوهی | Catmint نعناع گربه ای |
|---|---|---|---|---|
| | | percentage, % | | |
| *Alfa*-thujone | 926 | - | 0/5 | - |
| *Alfa*-pinene | 934 | - | 2/95 | - |
| β-pinene | 937 | - | 1/97 | 0/4 |
| sabinene | 961 | - | 0/76 | - |
| Imidazole | 965 | 1/5 | 1/8 | - |
| myrcene | 981 | - | 2/5 | 0/1 |
| limonen | 1039 | 0/81 | - | 0/3 |
| fenchone | 1071 | - | - | - |
| linalool | 1089 | - | 0/6 | - |
| Silane | 1098 | 1/7 | 3/5 | 3/4 |
| nonenal | 1103 | - | 1/1 | 0/9 |
| camphor | 1151 | - | - | 0/4 |
| menthol | 1152 | - | - | 32/4 |
| pinocamphene | 1161 | - | - | - |
| ninenal | 1162 | - | - | 0/32 |
| menthanol | 1180 | - | - | 36/2 |
| neral | 1221 | - | - | - |
| estragol | 1224 | - | - | - |
| geraniol | 1226 | - | 4/6 | - |
| carvacrol | 1245 | - | 2/03 | 0/5 |
| Anisaldehyde | 1256 | - | - | - |
| pipertenone | 1266 | - | - | 1/7 |
| Anethole trans | 1279 | - | 4/5 | - |
| thymol | 1294 | - | 38/73 | 2/3 |
| nicotine | 1367 | 2/91 | - | - |
| Caryophyllen | 1424 | - | - | 0/4 |
| Globulol | 1518 | 18/1 | - | - |
| Anthracene | 1797 | 0/06 | - | - |
| Thunbergol | 2066 | 0/52 | - | - |
| phytol | 2124 | 2/68 | - | - |

ترکیبات شیمیایی در عصاره آویشن کوهی شامل: تیمول (38/73%)، آنتول ترانس (4/5%)، نوننال (1/1%) و کارواکرول (2/03%) بود. کارواکرول موجب آشفتگی در غشای پلاسمایی، نشت درون سلولی ATP و یون‌های پتاسیم و در نهایت مرگ سلول بیمارگر می‌شود (Foroughi *et al.*, 2013) بنابراین شاید بتوان فعالیت‌های آنتی اکسیدانی و ضدمیکروبی عصاره آویشن کوهی را به حضور این ترکیبات نسبت داد. وجود ترکیبات ثانویه از دسته مونو و سسکویترپن‌ها مانند تیمول، کارواکرول و گاما-تریپنن موجب خاصیت ضدقارچی عصاره‌های گیاهی می‌شود (Mahboubi *et al*., 2007) که در این تحقیق آویشن کوهی با 38/73% بیشترین مقدار تیمول را در بین عصاره‌های گیاهی دارا بود.

## نتیجه گیری

عصاره گیاهان نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی اثرات ضدقارچی قابل توجهی بر قارچ عامل پوسیدگی یقه توتون داشت. متانول، اتانول و هگزان حلال مناسبی برای استخراج عصاره گیاهان در این زمینه تشخیص داده شد. مهم‌ترین ترکیبات موثر در نعناع گربه‌ای تیمول، فلاون، آنتراکن، نوننال، فتالازین و سایلن، در توتون نیکوتین، تونبرگول، فیتول، گلوبولول، لمونن و سایلن و در آویشن کوهی تیمول، آنتول ترانس، آنیسول، نوننال، کارواکرول و سایلن بودند.

**References**


1. Abad LR, D'Urzo MP, Liu D, Narasimban ML, Reuveni, M, Zhu JK, Niu, X, Singh NK, Hasegawa PM and Bressan RA. 1996. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. Plant Science 118: 11–23.
2. Abdolmaleki M, Bahraminejad S and Abbasi S. 2011a. Study of antifungal effects of some of plant extracts for four plant pathogen fungi. Medical Plants 38: 148–155.
3. Abdolmaleki M, Bahraminejad S, Salari M, Abbasi S and Panjehkeh N. 2011b. Study of antifungal effect *Mentha piperita* L. on plant pathogen fungi. Medical Plants 38: 26–34.
4. Abdulaziz A, Al-Askar, Y and Rashad M. 2010. Efficacy of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* on Pea. Journal of Plant Protection Research 50: 239–243.
5. Adams R P. 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. Carol Stream: Allured Publishing. 404 p.
6. Alam A, Tripathi A, Vats S, Behera K K and Sharma V. 2011. *In vitro* antifungal efficacies of aqueous extract of *Dumortiera hirsuta* (Swaegr.) Nees against sporulation and growth of postharvest phytopathogenic fungi. Archive for Bryology 103: 1–9.
7. Al-Rahmah N, Mostafa A and Abdel-Megeed A. 2011. Antifungal and antiaflatoxigenic activities of some plant extracts. African Journal of Microbiology Research 5: 1342–1348.
8. Amadioha A C. 2000. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica*. Crop Protection 19: 287–290.
9. Anil Sehajpal S and Parminder K. 2009. Evaluation of plant extracts against *Rhizoctonia solani* causing sheath blight of rice. The Journal of Plant Protection Sciences 1: 25–30
10. Anonymous. 2012. Statistical repertoire of Iranian Tobacco Company. 52 p. (In Persian)
11. Azimi A A, Delnavaz H B and Mansour G A. 2006. Antifungal effect of aqueous alcoholic and phenolic extracts of seed and leaves of *Sorghum bicolour* against *Fusarium solani*, *Fusarium poa*. Medical Plant 6: 26–32. (in Persian)
12. Bahraminejad S, Abbasi S and Fazlali M. 2011. *In vitro* antifungal activity of 63 Iranian plant species against three different plant pathogenic fungi. African Journal of Biotechnology 10: 16193–16201.
13. Burt S. 2004. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods- a review. International Journal of Food Microbiology 94: 223–253.
14. Dissanayake MLMC and Kumari WKMT. 2012. Efficacy of various plant extracts to control *Fusarium* wilt of *Polyscias balfouriana* variety Marginata, Asian Journal of Experimental Biological Science 3: 129–135.

15. 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: 115–121.
16. Gupta SK and Tripathi SC. 2011. Fungitoxic activity of *Solanum torvum* against *Fusarium sacchari*. Plant Protection Science 47: 83–91.
17. Hasanzadeh N. 2005. Technological implication of natural products in plant diseases management with special emphasis on fire-blight. Agriculture Science 1: 53–68.
18. Kohn L M. 1979. De limitation of economically important plant pathogenic *Sclerotinia* species. Phytopathology 69: 881–886.
19. Lucas G B. 1975. Disease of Tobacco, 3rd edition, Biological consulting Associates. Releight: North Carolina. 621 p.
20. Mahboubi M, Feizabadi MM, Haghi K and Hossini H. 2007. Antimicrobial activity and chemical metabolites' of essential oil from *Oliveria decumbens* Vent. Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants 24: 56–65 (In Persian).
21. Marchetti O, Moreillon P, Glauser P, Bille J and Stanglard D. 2000. Potent synergism of the combination of fluconazole and cyclosporine in *Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 44: 2373–2381.
22. Obongoya B O, Wagai S O and Odhiambo G. 2010. Phytotoxic effect of selected crude plant extracts on soil-borne fungi of common bean. African Crop Science Journal 18: 15–22.
23. Pirajno G, Scarito G and Salamone A. 2004. Fungistatic activity of essential oils of *Laurus nobilis, Mentha piperita*, and *Ruta graveolens* against *Rhizoctonia solani* Kunn and *Sclerotinia sclerotiorum* (L) De Bary. Journal of plant pathology 84(4): 329.
24. 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.
25. Sajjadi A and Assemi H. 2012. Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of tobacco collar sclerotinia rot in golestan province. Iranian Journal of Applied plant protection 1: 73–84.
26. Sajjadi A, Assemi H, Najafi, M R and Moradi Gh R. 2014. Study on effect of some plant extracts on tobacco of soilborne pathogen fungi. Annual Report Tirtash Research and Education Center: 149–170.
27. Shariff N, Sudarshana M S, Umesha S and Hariprasad P. 2006. Antimicrobial activity of *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts. African Journal of Biotechnology 5: 946–950.
28. Suleiman M N. 2011. Antifungal properties of leaf extract of neem and tobacco on three fungal pathogens of tomato (*Lycopersicon Esculentum* Mill). Advances in Applied Science Research 2: 217–220.

29. Yanar Y, Gokce A, Kadioglu I, Cam H and Whalon M. 2011. *In vitro* antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato. African Journal of Biotechnology 10: 8291–8295.

# The effect of catmint, tobacco and thyme extracts on *Sclerotinia sclerotiorum* causal agent of tobacco collar rot

A. Sajjadi*[1], M. Mokhtari[2], A. Ebrahimi[3]

**Abstract**

*Sclerotinia sclerotiorum* is an important phytopathogen causing tobacco collar rot which distributed worldwide and can impose high yield losses in tobacco growing countries. The disease management is possible by use of fungicides, resistant cultivars, biological control and use of plant extracts and essential oils. Crude extracts of catmint (*Nepeta cataria*), tobacco (*Nicotiana tabaccum*) and thyme (*Thymus pubescens*) were prepared by water, acetone, hexane, ethanol and methanol with concentrations of 1000 and 2000 ppm. The effect of those extracts against the fungus was examined *in vitro* in a factorial experiment based on completely randomized design with three replications. Minimal inhibitory concentration of extracts was determined by agar diffusion method. Crude extracts of tobacco, catmint and thyme had remarkable antifungal activity. Hexane, ethanol and methanol were the best solvents to extract antifungal compounds. Minimal inhibitory concentration of hexane, ethanol and methanol extracts of catmint, tobacco and thyme were 1 mg/ml as tested on the fungus. The most important components of extracts of catmint were menthanol, menthol, sailen, thymol, pipertenone, nonenal, carvacrol, camphor and limonene; in extracts of tobacco, globulol, phytol, nicotine, sailen, imidazole, limonene and thunbergol; and in extracts of thyme, thymol, anethole trans, sailen, carvacrol, imidazole and nonenal. Therefore, extracts of catmint, tobacco and thyme can be considered as natural fungicides for control of causal agent of tobacco collar rot.

**Key words:** extracts of catmint, tobacco and thyme, tobacco collar rot, *Sclerotinia sclerotiorum*.

[1]- Research Instructor, Department of Plant Protection, Tirtash Research and Education Center, Behshahr, Iran.
[2]- MSc. Student, Department of Plant Pathology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.
[3]- Professor, Department of Plant Pathology, Gorgan Branch, Islamic Azad University, Gorgan, Iran.
*Corresponding author: Sajjadi_a@yahoo.com