فصلنامه گیاه‌پزشکی
(دانشگاه آزاد اسلامی شیراز)
جلد ۶، شماره ۱، سال ۱۳۹۳ (۸۵-۷۱)

اثر ضد قارچی عصاره نه گونه گیاهی روی ساق زخم توتون (*Rhizoctonia solani*)

سید افشین سجادی[1*]، غلامرضا مرادی[1]، هدی عاصمی[1]، فرهاد نقی‌زاده[1]، فرامرز رستمی[2]، محمد اکبرزاده[3]، محمدرضا نجفی[1]، زین‌العابدین شهادتی مقدم[1]

۱. مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش، بهشهر، ایران
۲. گروه شیمی، دانشگاه گنبد کاووس، گنبد کاووس، ایران
۳. مرکز تحقیقات کشاورزی مازندران، بخش آبخیزداری، ساری، ایران

چکیده

Rhizoctonia solani عامل ساق زخم توتون، از عوامل بیماری‌زای گیاهی با اهمیت است که در تمام نقاط دنیا پراکنده بوده و موجب خسارت محصول در کشورهای تولید کننده توتون می‌شود. هدف از این تحقیق بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی بر روی عامل ساق زخم توتون و انتخاب حلال مناسب برای عصاره‌گیری می باشد. در این تحقیق عصاره‌های نه گونه گیاهی (نعناع گربه‌ای، توتون، آویشن کوهی، رازیانه، پونه کوهی، زوفا، بادرنجبویه، بادرنجبویه پرپر و مریم گلی) با استفاده از حلال‌های آب، استون، هگزان، اتانل و متانول استخراج و فعالیت ضد قارچی آنها با غلظت‌های ۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام به روش طعمه مسموم در شرایط آزمایشگاه روی این قارچ بررسی شد. نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضد قارچی غلظت‌های مختلف عصاره‌ها نشان داد که گیاهان نعناع گربه‌ای، توتون، آویشن کوهی، رازیانه، زوفا و بادرنجبویه پرپر اثر بازدارندگی خوبی بر قارچ مورد بررسی در این مطالعه دارند. بیشترین تاثیر بازدارندگی مربوط به عصاره استخراجی با حلال متانول بود. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره متانولی توتون، نعناع گربه‌ای، آویشن کوهی، رازیانه، بادرنجبویه پرپر و زوفا بر قارچ بیماری‌زای مورد بررسی ۱/۵، ۱/۵، ۲، ۳، ۳ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بود. بنابراین به نظر می رسد بتوان در کنترل بیماری ساق زخم توتون از ترکیبات طبیعی این گیاهان، به ویژه نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: عصاره‌های گیاهی، ساق زخم، *Rhizoctonia solani*، توتون

---

* مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: sajjadi_a@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۳/۱۹، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۰۷/۰۶

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* L.) گیاهی از خانواده Solanaceae یکی از مهمترین گیاهان زراعی است که در اقتصاد کشورهای تولید کننده از جمله چین، یونان، ترکیه، برزیل، ژاپن و آمریکا نقش مهمی دارد و در آمد حاصله از فراورده‌های مختلف این گیاه رقم قابل توجهی از درآمد ملی کشورهای تولید کننده را تشکیل می‌دهد. هر روز میلیون‌ها نفر از مردم جهان بطور مستقیم و غیر مستقیم به زراعت، صنعت تولید و فروش فراورده‌های مختلف این گیاه اشتغال دارند. سطح زیر کشت این گیاه در جهان بیش از پنج میلیون هکتار و کل تولید توتون بیش از ۷ میلیون تن در سال است . در ایران سطح زیر کشت توتون سیگارت و سایر محصولات دخانی (توتون، چپق و تنباکو) در سال ۱۳۸۶ برابر با ۱۴۰۰۰ هکتار بوده که سطحی معادل ۸۶۷۸ هکتار مربوط به کشت توتون سیگارت داشت. در همین سال تولید کل محصولات دخانی بالغ بر ۱۶۴۸۵ تن بود، که سهم تولید سیگارت برابر با ۱۰۲۵۴ تن می‌باشد. این مقدار محصول توسط ۱۱۱۳۴ نفر کشتکار توتون تولید گردید (Sajjadi *et al*., 2012).

یکی از روش‌های نوین در جهت کنترل بیماری‌های گیاهی استفاده از مواد و ترکیبات طبیعی با منشا گیاهی است. در این بین اهمیت ترکیبات طبیعی گیاهان در کنترل انواع بیماری‌های گیاهی از جمله بیماری‌های قارچی، باکتریایی، ویروسی و نماتدها بسیار بارز و برجسته است. زیرا از یک سو برای تعدادی از عوامل بیماری‌زای خاکزاد و بذرزاد روش کنترل موثر و پایداری وجود ندارد (Hasanzadeh, 2005) و از سوی دیگر پیدایش پدیده مقاومت به انواع سموم شیمیایی مصنوعی، مسمومیت‌های ناشی از مصرف سموم شیمیایی به جانوران، آبزیان و حشرات مفید و نیز اثرات منفی باقیمانده‌های سموم، مشکلات زیادی را برای سلامت انسان و محیط زیست فراهم آورده است (Gupta & Tripata, 2011; Abdolmaleki *et al*., 2011). مصرف عصاره‌های گیاهی علاوه بر کاربرد آسان در کنترل بیماری‌های گیاهی، باعث کاهش هزینه‌های کنترل و جلوگیری از تخریب تعادل اکولوژیکی محیط می‌شود (Joseph *et al*., 2008).

قارچ عامل بیماری ساق زخم توتون، *Rhizoctonia solani* Kuhn است. این قارچ ازگروه قارچ‌های ناقص دئوترومیستها[1] است که کنیدی تولید نمی کنند. علائم بیماری ابتدا لکه‌های آبسوخته کوچک در طوقه مشاهده شده و این ناحیه به سرعت قهوه‌ای تیره و گود می‌شود. لکه می‌تواند کوچک مانده یا به طور کامل ساقه را احاطه کند. انشعابات ریسه‌ها (پیکر قارچ) قائمه و در محل انشعابات ریسه‌ها فرورفتگی وجود دارد. ریسه‌ها درشت و دارای دیوار عرضی است. کلنی قارچ ابتدا سفید رنگ ولی بعد به رنگ کرم و سرانجام به رنگ قهوه‌ای در می‌آید. این قارچ به صورت ریسه در مواد آلی خاک و یا اسکلروت (عضو مقاوم در شرایط نامساعد)

[1]. Deuteromycetes

زمستانگذرانی می‌کند (Lucas, 1975). کنترل این عامل بیماری‌زا با استفاده از قارچ‌کش‌ها، تناوب زراعی، ارقام مقاوم، کنترل بیولوژیک، استفاده از عصاره‌های گیاهی و روغن‌ها انجام می‌شود.

در تحقیقی قارچ‌های *R. solani*، *Fusarium oxysporum* f.sp. *nicotianae*، *Phytophthora nicotianae*، *Macrophomina phaseolina*، *Pythium aphanidermatum* و *P. Ultimum* var. *ultimum* به ترتیب با فراوانی ۳۴/۹۲، ۳۱/۲۲، ۲۲/۷۹، ۶/۶، ۴/۶۵، ۲/۲ و ۲/۲ درصد از مزارع توتون استان گلستان جداسازی و شناسایی شدند. قارچ *R. solani* با ایجاد بیماری ساق زخم گونه غالب قارچ بیماریزای مزارع توتون در استان گلستان گزارش شد (Sajjadi & Assemi, 2012).

با توجه به اینکه در مورد استفاده از عصاره‌های گیاهی با خاصیت ضد قارچی و کنترل کنندگی عوامل بیماری‌زای توتون تحقیقی صورت نگرفته است لذا بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی بر عامل ساق زخم توتون ضروری به نظر می رسد. هدف از این تحقیق بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی (نعناع گربه‌ای، توتون، آویشن کوهی، رازیانه، پونه کوهی، زوفا، بادرنجبویه، بادرنجبویه پرپر و مریم گلی) بر عامل ساق زخم توتون توتون و انتخاب حلال مناسب برای عصاره‌گیری بوده است.

مواد و روش ها

۱- تهیه نمونه گیاهی

مطابق با جدول یک نمونه‌های گیاهی در اواخر خرداد ۱۳۹۱ جمع آوری و تهیه و به آزمایشگاه بخش شیمی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش در شرق استان مازندران منتقل و در اسرع وقت اقدام به عصاره‌گیری شد.

جدول ۱- گونه‌های گیاهی جمع آوری شده

Table 1. collected plant species

plant's name	Location of Collection	Family	Plant species	Plant part
Tobacco	Tirtash Research Center	Solanaceae	*Nicotiana tabaccum*	Leaves
Fennel	Alamdeh montains	Apiaceae	*Foeniculum vulgare*	seed
Thyme	Galugah montains	Laminaceae	*Thymus pubescens*	Leaves
Nepeta	Galugah montains	Laminaceae	*Mentha pulegium*	Leaves
Salvia	Galugah montains	Laminaceae	*Salvia verticilata*	Leaves and flower
Catmint	Galugah montains	Laminaceae	*Nepeta cataria*	Leaves and flower
Balm	Galugah montains	Laminaceae	*Melissa officinalis*	Leaves and flower
Badrashbi	Galugah montains	Laminaceae	*Dracocephalum kotschyi*	Leaves
Hyssop	Alamdeh montains	Laminaceae	*Hyssopus angustifolious*	Leaves and flower

۲- آماده‌سازی بافت گیاهی

گیاهان فوق ابتدا شستشوی سطحی شده و سپس با هیپوکلریت سدیم ۲٪ در حدود ۵ دقیقه ضدعفونی و سپس با آب مقطر استریل سه مرتبه شسته شدند (Alam *et al.*,2011 ; Al-Rahman *et al.*, 2011). نمونه در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش نور مستقیم آفتاب خشک شد. سپس اندام های هوایی به وسیله آسیاب پودرشده و از الک یک مش عبور داده شد (Abdulaziz *et al.*, 2010).

۳- روش استخراج عصاره

۳-۱- عصاره‌گیری با آب

پنج گرم از بافت آسیاب شده در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر، مخلوط و یک ساعت در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس به مدت ۲۴ ساعت این مخلوط در محیط آزمایشگاه نگهداری شده و پس از اختلاط مجدد، عصاره استحصالی با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شده و به منظور تبخیر آب در آون در دمای ۵۵/۵ درجه سلسیوس قرار داده شد (Azimi *et al.*, 2006).

۳-۲- عصاره‌گیری با استون

پنج گرم از بافت آسیاب شده در ۱۰۰ میلی لیتر استون به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سلسیوس روی شیکر قرار داده شد. پس از این مدت بخش استونی جدا شد، سپس جهت تبخیر استون و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد. عصاره در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری شد (Shariff *et al.*, 2006).

۳-۳- عصاره‌گیری با هگزان

پنج گرم از بافت آسیاب شده در ۱۰۰ میلی لیتر هگزان به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد روی شیکر قرار داده شد. پس از این مدت بخش هگزانی جدا شد، سپس جهت تبخیر هگزان و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد. عصاره در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Shariff *et al.*, 2006).

۳-۴- عصاره‌گیری با متانول

پنج گرم از بافت آسیاب شده در ۱۰۰ میلی لیتر متانول به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۰ درجه سلسیوس روی شیکر قرار داده سپس ۷۵ میلی لیتر از محلول را برداشته، ۲۵ میلی لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد که حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر برسد، سپس هم حجم با آن هگزان اضافه شد. این مخلوط دو ساعت روی شیکر قرار داده شده، پس از این مرحله، بخش

های مختلف به کمک دکانتور جدا شده و بخش متانولی جهت تبخیر متانول و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد (Bahraminejad *et al*., 2011).

۳-۵- عصاره‌گیری با اتانول

استخراج مطابق با روش عصاره‌گیری با متانول انجام گرفت، با این تفاوت که در این مورد از هگزان استفاده نشد (Bahraminejad *et al*., 2011).

۴- تهیه عامل بیماری

جدایه R24 قارچ *R. solani* از کلکسیون بخش گیاهپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش تهیه شد و روی محیط کشت سیب زمینی دکستروز آگار کشت داده شد. تشتک‌های پتری در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای رشد قارچ‌ها نگهداری شد. برای تهیه مایه تلقیح جدایه R24 قارچ *R. solani* حدود ۲۵۰ گرم دانه گندم را داخل ارلن نیم لیتری ریخته و پس از اضافه کردن ۱۵۰ میلی لیتر آب مقطر به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شد تا آب در بذر نفوذ کند. سپس درب ارلن‌ها را با پنبه و فویل آلومینیوم پوشانده و دو بار، هر بار به مدت ۳۰ دقیقه درون اتوکلاو و به فاصله ۲۴ ساعت در دمای ۱۲۱ سلسیوس و فشار ۱/۱ اتمسفر سترون گردید. بعد از خارج کردن ارلن ها از اتوکلاو و سرد شدن آنها، تحت شرایط سترون زیر هود، قطعاتی از حاشیه کشت ۷ روزه جدایه R24 قارچ *R. solani* روی محیط کشت PDA به ارلن های حاوی گندم اتوکلاو شده اضافه شد. ارلن ها به مدت ۲۱ روز در انکوباتور با دمای ۲۴ سلسیوس نگهداری شود و هر چند روز یکبار آنها را تکان داده تا مایه قارچ درون ارلن ها به صورت توده بهم چسبیده در نیایند. برای مایه زنی قارچ *R. solani*، دو گرم دانه گندم حاوی قارچ در محل طوقه گیاهچه های توتون رقم کا ۳۲۶ که در ۵ گلدان یک کیلوگرمی نشا شده بود قرار داده شد (Sajjadi *et al*. 2012).

۵- 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. غلظت‌های مختلف از عصاره‌های تهیه گردید و محیط کشت پس از اتوکلاو شدن در دمای ۱۲۱ سلسیوس و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای اتاق قرار داده شد تا دمای آن به حدود ۴۵-۴۰ سلسیوس برسد، سپس امولسیون یکنواخت عصاره به آن اضافه شد. قطر میسلیوم قارچ تا زمانی که سطح محیط کشت در تشتک‌های شاهد اشغال شود در ساعات معین اندازه‌گیری شد (Yanar *et al*., 2011). درصد بازداری از رشد میسلیوم قارچ با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Anil Sehajpal *et al*., 2009 ; Dissanayake & Kumari, 2012):

$$\text{درصد بازدارندگی} = \frac{\text{(قطر رشد میسلیوم در تشتک پتری تیمار - قطر رشد میسلیوم در تشتک پتری شاهد)}}{\text{قطر رشد میسلیوم در تشتک پتری شاهد}} \times ۱۰۰$$

طرح با ۱۳۵ تیمار در قالب طرح کاملا تصادفی به روش فاکتوریل با ۳ فاکتور اول (نه گونه گیاهی)، فاکتور دوم (پنج حلال)، فاکتور سوم (سه غلظت) در پنج تکرار انجام شد. سه غلظت عصاره گیاهی پس از بررسی مقدماتی تعیین شد.

حداقل غلظت بازدارندگی کامل عصاره‌های گیاهی از رشد قارچ‌ها طبق روش Marchetti *et al.* (2000) محاسبه شد. همچنین غلظتی که باعث ۵۰ درصد بازدارندگی[۲] رشد میسیلیومی قارچ می شود با بهره‌گیری از آنالیز پروبیت نرم افزار SPSS محاسبه گردید. به منظور بررسی ویژگی قارچ‌کشی[۳] یا قارچ‌ایستایی[۴] 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.

۶- *شناسایی ترکیبات عمده عصاره‌های گیاهی مورد آزمایش*

پس از تایید اثربخش بودن عصاره گیاهان مورد نظر عملیات خالص‌سازی عصاره انجام شده و با استفاده از روش‌های دستگاهی همچون کروماتوگرافی گازی کوپل شده با دتکتور جرمی ترکیبات موثر بر عوامل مورد نظر شناسایی شدند. به این منظور عصاره گیاهان به دستگاه GC-MS تزریق شده و طیف جرمی ترکیب‌ها بر اساس شاخص بازداری[۵] 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 بطول ۶۰ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، برنامه‌ریزی دمایی ستون از ۶۰ تا ۲۵۰ درجه با افزایش دمای ۴ درجه در دقیقه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، گاز هلیوم و دمای تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس بود.

2 . EC50: Half Maximal Effective Concentration
3. Fungicide
4. Fungistate
5 . Retention index

نتایج و بحث

۱- اثر بازدارندگی عصاره‌های گیاهی بر رشد میسیلیومی قارچ *R. solani*

در اثبات بیماریزایی همه توتون‌های ۵ گلدان آلوده شدند و در جداسازی مجدد قارچ *R. solani* مجددا جداسازی گردید که با خصوصیات قارچ اولیه مطابقت داشت. نتایج تجزیه واریانس تأثیر عصاره‌های گیاهی بر قارچ عامل ساق زخم توتون در جدول ۲ نشان داده که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت.

جدول ۲- تجزیه واریانس تأثیر عصاره‌های گیاهی بر درصد کنترل قارچ *R. solani*

Table 2. Variance analysis of effects of plant extract for control of *R. solani*

Source of variation (SOV)	Degrees of freedom	Means square
plant extracts	8	**33067
solvent	4	**2056
concentration	2	**273707
plant× solvent	32	**335
plant× concentration	16	**8286
solvent× concentration	8	**515
solvent× concentration× plant	64	**87
error	540	.3
Coefficient of variation		2.8

** significant at 1% probability level. **معنی دار در سطح احتمال ۱ درصد

مقایسه میانگین تأثیر عصاره‌های گیاهی بر قارچ عامل ساق زخم توتون نشان داد (جدول ۳) که نعناع گربه‌ای بیشترین و مریم گلی کمترین تأثیر بازدارندگی از رشد میسیلیوم را داشتند. مقایسه میانگین تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی بر قارچ بیماری‌زای توتون نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی، اثر بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ بیماری‌زای توتون بیشتر شد (جدول ۴). در بین حلال‌های مختلف، متانول بیشترین و آب مقطر استریل کمترین تأثیر بازدارندگی بر قارچ‌های بیماری‌زای توتون را داشتند. همانطور که در جدول ۴ مشخص است بعد از متانول، اتانول، هگزان و استون به ترتیب بهترین حلال جهت عصاره‌گیری بود. از آنجایی که اغلب ترکیبات گیاهی که دارای خواص ضدقارچی است، ترکیبات آلی اشباع شده یا ترکیبات آروماتیک هستند، از حلال‌های اتانولی یا متانولی برای استخراج آنها استفاده می شود. در واقع در بسیاری از مطالعات، از کاربرد آب به منظور جداسازی ترکیبات موثر گیاهی اجتناب شده است (Abdolmaleki *et al*., 2011).

جدول ۳- مقایسه میانگین تأثیر عصاره‌های گیاهی بر درصد کنترل قارچ *R. solani*

Table 3. Mean comparison of effect of plant extracts on control of *R. solani*

plant's name	percent of control
Catmint	66.6 a
Tobacco (Burley 21 variety)	63.1 ab
Thyme	60.2 bc
Badrashbi	47 d
Fennel	45.7 de
Hyssop	44.7 def
Balm	39.4 g
Salvia	32.7 h
Nepeta	27.1 i

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی دار ندارند.

Means within each column followed by same letter are not significantly different at 0.01 probability level according to DMRT test.

جدول ۴- مقایسه میانگین تأثیر غلظت عصاره بر درصد کنترل قارچ *R. solani*

Table 4. Mean comparison of effects of plant extracts concentration of control percent of *R. solani*

Concentration (ppm)	percent of control
2000	72.6 a
1000	69.1 b
0	0 c

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی دار ندارند.

Means within each column followed by same letter are not significantly different at 0.01 probability level according to DMRT test.

مقایسه میانگین اثرات متقابل عصاره‌های گیاهی، حلال و غلظت بر درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم قارچ رایزوکتنیا سولانی نشان داد (جدول ۶) که عصاره نعناع گربه‌ای در غلظت-های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام عصاره‌گیری شده توسط همه حلال‌ها و عصاره‌های توتون و آویشن کوهی با حلال‌های هگزان، اتانول و متانول در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام با ۱۰۰درصد کنترل بیشترین و عصاره آبی مریم گلی با غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی‌پی‌ام بهترتیب با ۳۲ و ۳۳ درصد کمترین اثر بازدارندگی را داشتند.

جدول ۵- مقایسه میانگین تأثیر حلال بر درصد کنترل قارچ *R. solani*

Table 5. Mean comparison of effects of solvent of control of *R. solani*

Solvent	percent of control
Methanol	54.3 a
Ethanol	51.6 b
Hexzan	47 c
acetone	42.4 d
Water	41.8 d

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی دار ندارند.

Means within each column followed by same letter are not significantly different at 0.01 probability level according to DMRT test.

جدول ۶- مقایسه میانگین اثرات متقابل عصاره‌های گیاهی، حلال و غلظت بر درصد کنترل قارچ *R. solani*

Table 6. Mean comparison of interaction of plant extracts, concentration and solvent on control of *R. solani*

plant's name	Concentration (ppm)	percent of control				
		Water	acetone	hexzan	Ethanol	Methanol
Catmint	1000	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
	2000	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Tobacco (Burley 21 variety)	1000	83 d	86 c	100 a	100 a	100 a
	2000	88 bc	88.8 b	100 a	100 a	100 a
Thyme	1000	72 h	74.2 g	100 a	100 a	100 a
	2000	78.2 e	78.4 e	100 a	100 a	100 a
Fennel	1000	62 lmn	63.4 jkl	67 i	72 h	82 d
	2000	66.4i	67.2 i	72 h	77 ef	87 c
Badrashbi	1000	51.4 rs	61.2 n	71.4 h	74 g	82.2 d
	2000	57 p	67 i	77 ef	77.6 e	87 c
Hyssop	1000	57.2 p	59 o	63 kml	74 g	76 f
	2000	60 n	63.8 jk	64.8 j	78.2 e	78.2 e
Balm	1000	45v	54.2 q	57.4 p	59 o	63 kml
	2000	52.4 r	57.4 p	61 n	63.8 jk	64.8 j
Nepeta	1000	36 x	43.2 w	48.6 t	49.2 t	52.4 r
	2000	42 w	48 tu	54.4 q	57.2 p	59 o
Salvia	1000	32 y	32.4 y	35 x	42.2 w	48 tu
	2000	33 y	36 x	37.2 x	49.2 t	54.4 q

میانگین‌هایی که دارای حروف مشابه هستند در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی دار ندارند.

Means within each column followed by same letter are not significantly different at 0.01 probability level according to DMRT test.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌های گیاهی بر *R. solani* نشان داد که عصاره‌های آبی توتون در غلظت‌های ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۲۵۰۰ پی‌پی‌ام) و بالاتر و نعناع گربه‌ای در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۲۰۰۰ پی‌پی‌ام) و بالاتر و آویشن کوهی، رازیانه، بادرنجبویه پرپر و زوفا در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۳۰۰۰ پی پی ام) به طور کامل از رشد میسیلیوم قارچ بیماری‌زای توتون جلوگیری کرد (جدول ۷). حداقل غلظت بازدارندگی عصاره-های آبی و استونی توتون بر قارچ بیماری‌زای مورد بررسی ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود درحالیکه حداقل غلظت بازدارندگی عصاره هگزانی، اتانولی و متانولی توتون و نعناع گربه‌ای بر قارچ بیماری‌زای مورد بررسی ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره هگزانی، اتانولی و متانولی آویشن کوهی بر قارچ‌های بیماری‌زای مورد بررسی ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و رازیانه، بادرنجبویه پرپر ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. Suleiman (2011) در نیجریه گزارش کرد که عصاره برگ توتون و نیم بر روی قارچ‌های بیماری‌زای گوجه‌فرنگی اثر بازدارندگی دارد و عصاره توتون در مقایسه با نیم، قارچ‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم را بهتر کنترل می‌کند در حالیکه عصاره نیم، قارچ رایزوپوس را بهتر از عصاره توتون کنترل می‌نماید. با توجه به نتایج جدول ۸، عصاره هگزانی، اتانولی و متانولی نعناع گربه‌ای و توتون در جلوگیری از رشد قارچ رایزوکتنیا، کمترین EC50 را داشته و عصاره همه حلال‌های زوفا روی قارچ مورد بررسی، EC50 بیشتری نشان داد.

جدول۷- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌های گیاهی بر رشد پرگنه قارچ *R. solani* (سانتیمتر) بر اساس روش اختلاط با محیط کشت

Table 7. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the plant extract (mg/ml) on *R. solani* colony growth (cm) in mix medium

plant's name	Minimum inhibitory concentration (MIC) (mg/ml)				
	Water	acetone	hexzan	Ethanol	Methanol
Catmint	2	2	1.5	1.5	1.5
Tobacco (Burley 21 variety)	2.5	2.5	1.5	1.5	1.5
Thyme	3	2.5	2	2	2
Fennel	3	3	3	3	3
Badrashbi	3	3	3	3	3
Hyssop	3	3	3	3	2.5

جدول **۸**- غلظت عصاره‌های گیاهی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای بازدارندگی پنجاه درصد رشد میسیلیومی (EC50) قارچ *R. solani*

Table 8. Plant extract concentration (mg/ml) on inhibitory 50 percent of *R. solani* mycelium

plant's name	inhibitory 50 percent of fungi mycelium growth (EC50) (mg/ml)				
	Water	acetone	hexzan	Ethanol	Methanol
Catmint	0.7	0.7	0.5	0.5	0.5
Tobacco (Burley 21 variety)	0.7	0.7	0.5	0.5	0.5
Thyme	0.9	0.8	0.7	0.7	0.7
Fennel	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1
Badrashbi	6.8	6.8	6.8	6.8	6.8
Hyssop	10	10	10	10	7.1

Obongoya *et al.* (2010) اثرات عصاره‌های گیاهان نیم، توتون، جعفری مکزیکی، پروانش بر قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. *Phaseoli* در کنیا بررسی نمودند. عصاره گیاه نیم بیشترین اثر و گیاه پروانش کمترین اثر را در بازدارندگی رشد قارچ داشتند. یک فرمولاسیون تجاری CH100 محتوی عصاره‌های برگ توتون و کلم برای کنترل تعدادی از بیماری‌های گیاهی از جمله سفیدک پودری خیار به ثبت رسیده است (Huang, 1994).

نتایج بدست آمده از واکشت دیسک‌های قارچی 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 می باشد ولی در خصوص عصاره آویشن کوهی، با توجه به رشد قارچ، نشان‌دهنده خاصیت قارچ ایستایی می‌باشد.

۲- ترکیبات عمده عصاره‌های گیاهی مورد آزمایش

ترکیبات اصلی در عصاره‌های گیاهی مختلف در جدول ۹ آمده است. ترکیبات منتانول و منتول بیشترین میزان متابولیت ثانویه موجود در عصاره گیاهی نعناع گربه‌ای می‌باشند. با توجه به اینکه این ترکیبات خاصیت ضدقارچی دارند (Abdolmaleki *et al*., 2011) بنابراین می‌توان این ترکیبات را به تنهایی و یا در تعامل با یکدیگر به عنوان عامل موثر در خاصیت ضدقارچی نعناع گربه‌ای مورد بررسی قرار داد. ترکیبات شیمیایی در عصاره آویشن کوهی شامل: تیمول، آنتول ترانس، آنیسول، نونانال و کارواکرول می‌باشد. 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 اکسدانی و ضدمیکروبی عصاره آویشن کوهی را به حضور این ترکیبات نسبت داد. وجود ترکیبات ثانویه از دسته مونو و سسکویترپن‌ها نظیر: تیمول، کارواکرول و گاما-تریپنن موجب خاصیت ضدقارچی عصاره‌های گیاهی می شود (Mahboubi *et al*., 2007) که در این تحقیق آویشن کوهی با ۳۸/۷۳٪ بیشترین مقدار تیمول را در بین عصاره‌های گیاهی دارا بود.

جدول **۹**- نوع و درصد ترکیبات شیمیایی در عصاره‌های گیاهی

Table 9. chemical composition of the plant extracts

Compound	RI*	Plant extracts					
		Tobacco	**Fennel**	Thyme	Catmint	Badrashbi	Hyssop
		percentage, %					
***Alfa*-thujone**	926	-	4.3	0.5	-	-	0.09
***Alfa*-pinene**	934	-	-	2.95	-	-	0.32
β-pinene	937	-	-	1.97	0.4	-	6.14
sabinene	961	-	-	0.76	-	-	0.48
myrcene	981	-	0.1	2.5	0.1	-	1.26
limonen	1039	0.81	3.1	-	0.3	15.8	0.71
fenchone	1071	-	7.2	-	-	-	-
linalool	1089	-	0.29	0.6	-	-	-
camphor	1151	-	0.4	-	0.4	-	-
menthol	1152	-	-	-	32.4	-	-
pinocamphene	1161	-	3	-	-	-	10.4
ninenal	1162	-	-	-	0.32	-	-
menthanol	1180	-	-	-	36.2	-	-
neral	1221	-	-	-	-	3.1	-
estragol	1224	-	3	-	-	-	-
geraniol	1226	-	-	4.6	-	5.7	-
carvacrol	1245	0.01	-	2.03	0.5	2.9	-
Anisaldehyde	1256	-	0.5	-	-	-	-
pipertenone	1266	-	-	-	1.7	-	-
Anethole trans	1279	-	75.8	-	-	-	-
thymol	1294	-	-	38.73	2.3	10.5	-
nicotine	1367	2.91	-	-	-	-	-
Caryophyllen	1424	-	-	-	0.4	11.3	5.17
Globulol	1581	18.1	-	-	-	6.1	-
Anthracene	1797	0.06	-	-	-	2.1	-
Thunbergol	2066	0.52	-	-	-	-	-
phytol	2124	2.68	-	-	-	-	-

***:** Retention index

تعدادی از ترکیبات با خواص آنتی اکسیدانی به عنوان فرآورده‌های ثانویه توسط گیاهان ساخته می شود که از جمله می توان به ترکیبات فنولی اشاره نمود که در مواجه گیاهان با گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شود. فرایند اثر ضدقارچی گیاه به واسطه ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌تواند از طریق آسیب به DNA، میتوکندری، آسیب به دیواره سلولی و نهایتاً مرگ میکروارگانسیم باشد (Yahya-abadi *et al*., 2011).

سه عامل موجب می شود با توجه به اینکه توتون دارای مواد ضدقارچی است ولی مورد حمله قارچ قرار می گیرد:

الف) مواد ضدقارچی در گیاهان بصورت نمک یا کمپلکس با عناصر و مواد دیگر در گیاهان قرار دارند و با عصاره گیری آزاد می شوند (Abad *et al*., 1996).

ب) غلظت مواد ضدقارچی در گیاه به اندازه‌ای نمی‌باشد که موجب جلوگیری از ورود قارچ پاتوژن نماید و با عصاره گیری غلظت بیشتر می‌شود (Abad *et al*., 1996).

ج) در محلی از گیاه که مواد ضدقارچی ساخته می‌شود با محلی که قارچ حمله می کند متفاوت است مثلا نیکوتین در ریشه ساخته می‌شود. همچنین در تحقیقی مشخص شد با عصاره گیری، پروتئینها و مواد تحریک کننده القا مقاومت هم در عصاره وجود دارد که با اسپری بر روی گیاه مقاومت گیاه به عوامل بیماریزا بیشتر می‌شود. آبد و همکاران (۱۹۹۶) با بررسی اثرات ضدقارچی پروتئین اسموتین برگ توتون رقم ویسکونسین ۳۸ نسبت به ۱۸ 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 این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره گیاهان نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی اثرات ضدقارچی خوبی بر روی عامل ساق زخم توتون دارند. متانول و اتانل بهترین حلال برای استخراج عصاره گیاهی می‌باشند. مهمترین ترکیبات موثر در عصاره نعناع گربه ای شامل: تیمول، لمونن، کامفور، منتول، منتانول و کارواکرول در عصاره توتون شامل: نیکوتین، تونبرگول، فیتول، گلوبولول و لمونن و در عصاره آویشن کوهی شامل: تیمول، آنتول ترانس، آنیسول، نوننال و کارواکرول می‌باشد.

با توجه به اینکه موضوع که شرایط آب و هوایی مختلف روی فیزیولوژی گیاه و در نهایت بر مقدار و حتی متابولیت‌های گیاهی دارای تاثیر می‌باشد (Abdolmaleki *et al*., 2011). همچنین مراحل مختلف رشدی آنها می‌تواند نتایج متفاوتی داشته باشد. بررسی اثر ضدقارچی عصاره گیاهان مختلف در مناطق جغرافیایی متفاوت و مراحل رشدی مختلف پیشنهاد می‌شود. همچنین با توجه به نتایج خوب اثرات ضدقارچی نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی بر روی قارچ عامل ساق‌زخم توتون، پیشنهاد می‌گردد اثرات ضدقارچی این عصاره‌های گیاهی بر روی عوامل بیماریزای توتون در سطح خزانه و مزرعه بررسی گردد.

سپاسگزاری

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش به خاطر مساعدت در اجرای طرح، قدردانی و تشکر می‌گردد.

منابع

Abad, L. R., D' Urzo, M. P., Liu, D., Narasimban, M. L. Reuveni, M., Zhu, J. K. Niu, X., Singh, N. K. Hasegawa, P. M., & Bressan, R. A. 1996. Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization. *Plant Science*. 118. 11-23.

Abdolmaleki, M., Salari, M., Bahraminejad, S., Abbasi, S., Panjehkeh, N.. 2008. Antifungal activity of cinnamon (*Cinnamum zelanicum*) crude extracts against some phytopathologenic fungi. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 44 (3) 255-261.

Abdolmaleki, M., Bahraminejad, S., Salari, M., Abbasi, S., Panjehkeh, N. 2011. Study of antifungal effect *Mentha piperita* L. on plant pathogen fungi. *Medical Plants*, 38: 26-34.

Abdolmaleki, M., Bahraminejad, S., Abbasi, S. 2011. Study of antifungal effects of some of plant extracts for four plant pathogen fungi. *Medical Plants*, 38: 148-155.

Abdulaziz, A., Al-Askar, Y., Rashad, M. 2010. Efficacy of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* on Pea. *Journal of Plant Protection Research*, 50 (3). 239-243

Adams, R. P. 1995. *Identififcation of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Allured Publishing. Carol stream.

Alam, A., Tripathi, A., Vats, S., Behera, K. K. & 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.

Al-Rahman, N., Mostafa, A. & Abdel-Megeed, A. 2011. Antifungal and antiaflatoxigenic activities of some plant extracts. *African Journal of Microbiology Research*, 5(11). 1342-1348

Azadbakht M. 1999. *Taxonomy of Medical Plants. Institute publications Teymorzadeh*, Iran (In Persian).

Bahraminejad, S., Abbasi, S. & Fazlali, M. 2011. In vitro antifungal activity of 63 Iranian plant species against three different plant pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*. 10. 72. 16193-16201

Dissanayake, M. L. M. C. & Kumari, W. K. M. T. 2012. Efficacy of various plant extracts to control *Fusarium* wilt of *Polyscias balfouriana* variety Marginata, *Asian Journal Experimental Biological Science*, 3 (1): 129-135.

Foroughi, M., Mohammadi, S., Ghasemi, A. 2013. Antifungal activity of five medical herbs on the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani*. *Journal of Microbial World*, 5 (3): 115-121.

Gupta, S. K. & Tripathi, S, C. 2011. Fungitoxic activity of *Solanum torvum* against *Fusarium sacchari. Plant Protection Science*, 47. 3. 83-91

Hasanzadeh N. 2005 Technological implication of natural products in plant diseases management with special emphasis on fireblight. *Agriculture Science*, 1: 53-68.

Huang, J. W. 1994. Control of chinese leek rust with a plant nutrient formulation. *Plant Pathology*, 3: 9-17.

Joseph, B., Ahmad Dar, M. & Kumar, V. 2008. Bioefficacy of plant extracts to Control *Fusarium solani* f. sp.*melongenae*incitant of Brinjal Wilt. *Global Journal of Biotechnology*, 3(2): 56-59.

Lucas, G. B. 1975. *Disease of Tobacco*, 3rd edition, Biological Consulting Associates, Releight, North Carolina.

Mahboubi, M., Feizabadi, M. M., Haghi, K. & Hossini, H. 2007. Antimicrobial activity and chemical metabolites' of essential oil from *Oliveria decumbens* Vent. *Iranian Journal of Medical and Aromatic Plants* ,24(1): 56-65 (In Persian).

Obongoya, B. O., Wagai, S. O. & Odhiambo, G. 2010. Phytotoxic effect of selected crude plant extracts on soil-borne fungi of common bean. *African Crop Science Journal*, 18(1). 15-22.

Sajjadi A. & Hosseininejad A, Assemi, H. 2012. Determination of damage of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on some of tobacco commercial cultivar. *Iranian Journal of Plant Pathology*, 80 (1) 13-22.

Sajjadi, A. & Assemi, H. 2012. Identification of pathogenic soilborne fungi of tobacco in Golestan province fields. *Applied Plant Protection*, 1 (3). 233-248.

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*, 2011, 2 (4): 217-220

Yanar, Y., Gokce, A., Kadioglu, I., Cam, H. & Whalon, M. 2011. In vitro antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato. *African Journal of Biotechnology*, 10. 42. 8291-8295

Yahya-abadi, S., Zeabanejad, E., Doudi, M. 2011. Effect of plant extracts on growth of *Aspergillus* fungi. *Journal of Herbal Drugs*, 2 (1): 69-81.