بررسی اثرات ضد قارچی تعدادی عصاره گیاهی بر رشد میسیلیومی *Sclerotinia sclerotiorum* قارچ عامل پوسیدگی یقه توتون*

سید افشین سجادی**[1]، غلامرضا مرادی[2]، فرهاد نقی‌زاده[2]، فرامرز رستمی[3]، محمد اکبرزاده[4]، هدی عاصمی[1]، محمدرضا نجفی[1] و زین‌العابدین شهادتی مقدم[5]

چکیده

قارچ پوسیدگی یقه توتون از عوامل مهم بیماری‌زای گیاهی می‌باشد که در تمام نقاط دنیا پراکنده بوده و می‌تواند موجب خسارت محصول در کشورهای تولیدکننده توتون گردد. مدیریت این عامل بیماری‌زا با استفاده از سموم شیمیایی، تناوب زراعی، ارقام مقاوم، کنترل بیولوژیک و هم‌چنین عصاره‌های گیاهی و روغن‌ها انجام می‌شود. عصاره‌های گیاهی برای مدیریت این عامل بیماری ارجحیت دارد، زیرا سموم شیمیایی گران قیمت بوده و مصرف آن‌ها آلودگی زیست محیطی به همراه دارد. این تحقیق با هدف بررسی اثر بازدارندگی عصاره‌های مختلف تعدادی گیاه دارویی در رشد قارچ عامل پوسیدگی یقه توتون در آزمایشگاه و انتخاب حلال مناسب برای عصاره‌گیری انجام شده است. در این تحقیق عصاره نه گونه گیاهی با استفاده از حلال‌های آب، استون، هگزان، اتانل و متانول استخراج شده و فعالیت ضد قارچی آن‌ها در شرایط آزمایشگاه روی قارچ عامل پوسیدگی یقه توتون در مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش در سال ۱۳۹۱ بررسی شد. آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه عامل و پنج تکرار انجام شد. عامل اول عصاره گیاهی شامل نه گونه گیاهی، عامل دوم حلال در پنج سطح (آب، استن، هگزان، اتانول و متانول) و عامل سوم غلظت (۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی پی ام) در نظر گرفته شد. بررسی حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های گیاهی با استفاده از روش اختلاط با محیط کشت انجام شد. نتایج نشان داد که عصاره گیاهان نعناع گربه‌ای، توتون، آویشن کوهی، رازیانه، زوفا و بادرنجبویه پرپر اثر بازدارندگی خوبی بر رشد قارچ مورد بررسی در این مطالعه داشتند. بیشترین اثر بازدارندگی مربوط به عصاره استخراجی با حلال متانول بود. هم‌چنین حداقل غلظت بازدارندگی عصاره متانولی توتون، نعناع گربه‌ای، آویشن کوهی، رازیانه، بادرنجبویه پرپر و زوفا بر قارچ‌های بیماری‌زای مورد بررسی ۱/۵، ۱/۵، ۲، ۳، ۳ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: عصاره گیاهی، پوسیدگی یقه، *Sclerotinia sclerotiorum*، زیست‌سنجی

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/۵/۸

*این مقاله قسمتی از طرح مصوب با شماره ۲-۳۰۱-۹۱ است که در مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش اجرا شده است.

** مسئول مکاتبه sajjadi_a@yahoo.com

۱و۲- به‌ترتیب محققین بخش گیاه‌پزشکی و شیمی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش (بهشهر)

۳- عضو هیأت علمی گروه شیمی دانشگاه گنبد

٤- عضو هیأت علمی بخش آبخیزداری مرکز تحقیقات کشاورزی مازندران

۵- محقق بخش بیوتکنولوژی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش (بهشهر)

مقدمه

توتون (*Nicotiana tabacum* Line) گیاهی از خانواده Solanaceae می‌باشد که 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 فرآورده‌های 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 هفت میلیون تن در سال است . در ایران سطح زیر کشت توتون سیگارت و سایر محصولات دخانی (توتون، چپق و تنباکو) در سال ۱۳۸٦ برابر با ۱٤۰۰۰ هکتار بوده که سطحی معادل ۸٦۷۸ هکتار مربوط به کشت توتون سیگارت بود (Assemi, 2012). در همین سال تولید کل محصولات دخانی بالغ بر ۱٦٤۸۵ تن بود که سهم تولید سیگارت برابر با ۱۰۲۵٤ تن بوده است. این مقدار محصول توسط ۱۱۱۳٤ نفر کشتکار توتون تولید گردید (Assemi, 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 سوی 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 سنتیتیک، مسمومیت‌های ناشی از مصرف سموم شیمیایی در جانوران، آبزیان و حشرات مفید و نیز اثرات منفی باقی‌مانده‌های سموم، مشکلات زیادی را برای سلامت انسان و محیط زیست فراهم آورده است (Gupta and Tripata, 2011; Abdolmaleki *et al*., 2011). از این رو بسیاری از کشورها با استفاده از فن‌آوری جدید تهیه و فرمولاسیون آفت کش‌های غیر شیمیایی از جمله آفت کش‌های با پایه گیاهی مبادرت به کنترل تلفیقی بیماری‌های مهم گیاهی نموده‌اند (Amadioha, 2000).

در حال حاضر چند آفت کش گیاهی تجاری در دنیا معرفی شده است. در ایران نیز یک باکتری‌کش گیاهی علیه بیماری آتشک گلابی به ثبت رسیده است. حجم تحقیقات انجام شده و در دست اجرای کشورها موید وجود یک تحول جدید در امر تامین بهداشت و سلامت تولیدات محصولات کشاورزی است. مزیت خانواده جدید ترکیبات طبیعی نسبت به روغن‌های نفتی یا معدنی، اثرات فرامیزبانی، امکان سم‌پاشی در مراحل مختلف رشد، تجزیه سریع توسط عوامل بیولوژیک و از بعد ساختمان شیمیایی، پیچیدگی ترکیبات و مشتقات آن‌ها است (Hasanzadeh, 2005). ماهیت ضدمیکروبی، تحریک مصونیت گیاه و جلوگیری از آلودگی‌های محیطی از دیگر مزایای آفت کش‌های طبیعی جدید است (Aye and Matsumoto, 2010).

قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* Bary موجب پوسیدگی یقه[1] در گیاهچه‌های توتون[2] می‌شود علایم این بیماری در طی دوره رشد گیاهچه‌ها در خزانه به صورت پوسیدگی نرم و به رنگ قهوه‌ای در ساقه ظاهرمی‌شود و به برگ‌ها توسعه می‌یابد و گیاهچه‌ها به سرعت نابود می‌شوند. در رطوبت نسبی بالا، میسلیوم کرکی سفیدی روی گیاهان را می‌پوشاند و بعد از مدتی سختینه‌های سیاهرنگ روی آن‌ها تشکیل می‌شود (Lucas, 1975). سختینه‌ها با ایجاد اندام نعلبکی شکلی به نام آپوتسیوم[3]، آسکوسپورهای هوابرد تولید می‌کنند که در انتشار بیماری نقش مهمی دارد. آسکوسپورهای تولید شده از آپوتسیوم‌های قارچ عامل بیماری در مزارع محصولاتی مانند کاهو، کلزا، آفتابگردان در آلودگی‌های اولیه خزانه‌های توتون نقش مهمی دارند (Sajjadi and Assemi, 2012). این بیماری از تمام مناطق توتون‌کاری جهان گزارش شده است (Lucas 1975) و به بیش از ٤۰۰ گونه گیاهی خسارت وارد می‌کند. بیماری در خزانه‌ها ظاهر شده و در صورت مساعد بودن شرایط، تعداد زیادی از نشاهای موجود را از بین می‌برد. این بیماری در بیشتر مناطق توتون‌کاری استان‌های مازندران و گلستان شایع است و در برخی از خزانه‌ها تا ٦۰ درصد آلودگی مشاهده می‌شود و به طور متوسط تا ۲۰ درصد نشاهای موجود در سطح خزانه‌ها بر اثر این بیماری غیر قابل استفاده می‌شوند (Sajjadi and Assemi, 2012). قارچ عامل بیماری از تیره

[1] Collar rot
[2] *Nicotianatabacum*
[3] apothecium

اسکلروتینیا[1] و راسته هلوشیالز[2] و شاخه آسکومیکوتا[3] می‌باشد (Lucas, 1975).

عبدالملکی و همکاران (Abdolmaleki *et al*., 2009) حداقل غلظت بازدارندگی[4] عصاره گیاه دارچین[5] را روی قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی مانند *Rhizoctonia solani*، *Fusarium oxysporum*، *Phytophthora drechsleri* و *Bipolaris sorokiniana* با استفاده از دو روش دیسک کاغذی و اختلاط با محیط کشت بررسی نمودند. نتایج نشان داد که عصاره این گیاه اثر بازدارندگی (قارچ ایستایی) بسیار خوبی بر رشد قارچ‌های مورد بررسی بود. بهرامی نژاد و همکاران (Bahraminejad *et al*., 2011) گزارش نمودند که تفاوت معنی داری بین حلال‌های آب، متانول، اتانول و استون درعصاره‌گیری گیاه دارویی خارخسک (از تیره اسپند) برای جلوگیری از رشد میسلیومی قارچ *Bipolaris sorokiniana* وجود ندارد. تی ارون و همکاران (Thieron *et al*., 1995) با استفاده از اسید دی کلروایزونیکوتینیک بیماری بلاست برنج را کنترل نمودند. پیراجنو و همکاران (Pirajno *et al*., 2004) در ایتالیا با استفاده از اسانس گیاهی سه گونه گیاهی برگ بو[6]، نعناع فلفلی[7] و سداب[8] (از خانواده مرکبات) در سه غلظت ۱۵، ۳۰ و ٤٥ میکرولیتر به ازای هر پلیت توانستند قارچ‌های *R. solani* و *S. sclerotiorum* را تا ۱۰۰ درصد کنترل نمایند.

لی و همکاران (Lee *et al*., 2007) خاصیت ضد قارچی اسانس ۳۹ گونه گیاهی را روی قارچ‌های بیماری‌زای خاکزی و انباری بررسی نمودند که چهارگونه گیاهی دارای خاصیت ضد قارچی بودند و مرزنگوش[9] از خانواده نعناع در شرایط آزمایشگاهی توانست قارچ‌های *Botriti scinerea*، *Colletotrichum gloesporioides*، *F. oxysporum*، *R. solani* و *Pythium ultimum* را به‌ترتیب به میزان ۵۵، ۷۸، ۷۰، ٦٨ و ۹۳ درصد کنترل نماید. هم‌چنین اکالیپتوس[10] عامل قارچ کپک خاکستری سیب را در انبار تا ۷۰ درصد کنترل کرد. اوبونگویا و همکاران (Obongoya *et al*., 2010) اثرات عصاره گیاهان نیم[11]، توتون[12]، جعفری مکزیکی[13] و پروانش[14] را بر قارچ خاکزی بیماری‌زای لوبیا[15] در کنیا بررسی نمودند. عصاره گیاه نیم بیشترین اثر و گیاه پروانش کمترین اثر را در بازدارندگی رشد قارچ داشتند.

با توجه به این‌که در مورد استفاده از عصاره‌های گیاهی با خاصیت ضد قارچی در مدیریت عوامل بیماری‌زای توتون تحقیقی صورت نگرفته است، لذا بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی بر برخی از عوامل بیماری‌زای توتون ضروری به نظر می‌رسد و این تحقیق باهدف بررسی فعالیت ضد قارچی عصاره‌های گیاهی بر بیماری پوسیدگی یقه توتون و انتخاب حلال مناسب برای عصاره‌گیری انجام شده است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

نمونه‌های گیاهی اواخر خرداد ماه سال ۱۳۹۱ جمع آوری شده (جدول ۱) و به آزمایشگاه بخش شیمی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش منتقل شدند و در اسرع وقت اقدام به عصاره‌گیری شد.

آماده‌سازی بافت گیاهی

نمونه‌های گیاهی جمع آوری شده پس از شستشوی سطحی با هیپوکلریت سدیم ۲٪ حدود ۵ دقیقه ضدعفونی شده و سپس سه بار با آب مقطر استریل شسته شدند (Alam *et al*., 2011; Al-Rahman *et al*., 2011). نمونه‌ها ابتدا در شرایط آزمایشگاه و دور از تابش نور مستقیم آفتاب خشک شدند و سپس اندام‌های هوایی به وسیله آسیاب پودر شده و از الک یک مش عبور داده شدند (Abdulaziz *et al*., 2010).

روش استخراج عصاره

عصاره‌گیری با آب

پنج گرم از بافت آسیاب شده با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و یک ساعت در حمام آب گرم قرار داده شد. سپس به مدت ٢٤ ساعت 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

[1] Sclerotiniaceae
[2] Helotiales
[3] Ascomycota
[4] MIC: Minimum Inhibitory Concentration
[5] *Cinnamomum zeylanicum*
[6] *Laurus nobilis*
[7] *Mentha piperita*
[8] *Rutagra veolens*
[9] *Origanum vulgare*
[10] *Eucalyptus citriodora*
[11] *Azadirachta indica*
[12] *Nicotiana tabacum*
[13] *Tagetes minuta*
[14] *Vinca rosa*
[15] *Fusarium oxysporum* f.sp. *Phaseoli*

آون با دمای ۵۵/۵ درجه سلسیوس قرار داده شد (Azimi *et al*., 2006).

عصاره‌گیری با استون

پنج گرم از بافت آسیاب شده در ۱۰۰ میلی لیتر استون به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۰ درجه سلسیوس روی شیکر قرار داده شد. پس از این مدت بخش استونی جدا شد و 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).

عصاره‌گیری با هگزان

استخراج مطابق با روش عصاره‌گیری با استون انجام گرفت (Shariff *et al*., 2006).

عصاره‌گیری با متانول

پنج گرم از بافت آسیاب شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۲۰ درجه سلسیوس روی شیکر قرار داده شد. سپس ۷۵ میلی‌لیتر از محلول برداشته شده و ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه شد و به این ترتیب حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسید و سپس هم حجم با آن هگزان اضافه شد. این مخلوط دو ساعت روی شیکر قرار داده شده و پس از این مرحله، بخش‌های 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).

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).

تهیه عامل بیماری

ایزوله قارچی از کلکسیون بخش گیاهپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش تهیه شد.

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 عصاره‌ها تهیه گردید و محیط کشت پس از اتوکلاو شدن در دمای ^{o}C ۱۲۱ و فشار یک اتمسفر به مدت ۲۰ دقیقه، در دمای اتاق قرار داده شد. بعد از این‌که دمای آن به حدود ^{o}C ٤٥-٤۰ رسید، امولسیون یکنواخت عصاره به آن اضافه شد. قطر میسلیوم قارچ تا زمان اشغال سطح محیط کشت در تشتک‌های شاهد در ساعات معین اندازه‌گیری شد (Yanar *et al*., 2011). درصد بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد (Anil Sehajpal *et al*., 2009; Dissanayake and Kumari, 2012):

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

آزمایش به صورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه فاکتور گونه گیاهی در نه سطح (توتون، نعناع گربه‌ای، آویشن کوهی، رازیانه، بادرنجبویه پرپر، پونه کوهی، مریم گلی، بادرنجبویه و زوفا)، حلال در پنج سطح (آب، استن، هگزان، اتانول و متانول) و غلظت در سه سطح (۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی پی ام) 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 مارچتی و همکاران (Marchetti *et al*., 2000) محاسبه شد. هم‌چنین غلظتی که باعث ۵۰ درصد بازدارندگی[1] رشد میسلیومی قارچ شد، با بهره‌گیری از آنالیز پروبیت نرم‌افزار 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

پس از تایید اثربخش بودن عصاره گیاهان مورد نظر، عملیات خالص‌سازی عصاره 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

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

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 ٦٠ متر و قطر ۰/۲۵ میلی‌متر، با برنامه‌ریزی دمایی ستون از ٦٠ تا ۲۵۰ درجه سلسیوس با افزایش دمای ٤ درجه در دقیقه، انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت، گاز هلیوم و دمای محفظه تزریق ۲۵۰ درجه سلسیوس بود.

نتایج و بحث

اثر بازدارندگی عصاره‌های گیاهی بر رشد میسیلیومی قارچ‌های بیماری‌زای توتون

نتایج تجزیه واریانس اثر عصاره‌های گیاهی بر پوسیدگی یقه توتون، اختلاف معنی‌دار تیمارها را نشان داد (جدول ۲). مقایسه میانگین اثر عصاره‌های گیاهی بر پوسیدگی یقه توتون نشان داد که نعناع گربه‌ای بیشترین و مریم گلی کمترین اثر بازدارندگی را روی رشد میسیلیوم قارچ اسکلروتینیا داشتند. با افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی، اثر بازدارندگی روی رشد میسیلیومی قارچ اسکلروتینیای توتون بیشتر شد. در بین حلال‌های مختلف، متانول بیشترین و آب مقطر استریل کمترین بازدارندگی را بر قارچ اسکلروتینیا داشتند که این نتایج با تحقیقات عبدالملکی و همکاران (Abdolmaleki *et al.*, 2011) مطابقت داشت. همان‌طور که در جدول ۳ مشخص است، بعد از متانول، اتانول، هگزان و استون به ترتیب بهترین حلال‌ها برای عصاره‌گیری بودند. 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.

مقایسه میانگین اثرات متقابل عصاره‌های گیاهی، حلال و غلظت بر درصد بازدارندگی رشد میسیلیوم قارچ اسکلروتینیا نشان دادکه عصاره نعناع گربه‌ای در غلظت‌های 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 ۱۰۰ درصد بازدارندگی بیشترین و عصاره آبی مریم گلی با غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ پی پی ام با ۲۲ و ۲۳ درصد کمترین اثر بازدارندگی را داشتند (جدول ۳).

در جدول (۷) حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌های گیاهی بر اسکلروتینیا نشان داده شده است. عصاره‌های آبی توتون در غلظت‌های ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۲۵۰۰ پی‌پی‌ام) و بالاتر، 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 پی‌پی‌ام) به طور کامل از رشد میسیلیوم قارچ اسکلروتینیا جلوگیری کردند که به عبارت دیگر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) این عصاره‌ها است. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌های آبی و استونی توتون و نعناع گربه‌ای بر قارچ بیماری‌زای مذکور ۲/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود، درحالی‌که حداقل غلظت بازدارندگی عصاره اتانولی و متانولی توتون و نعناع گربه‌ای بر قارچ بیماری‌زای مورد بررسی ۱/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. حداقل غلظت بازدارندگی عصاره متانولی آویشن کوهی بر قارچ‌های بیماری‌زای مورد بررسی ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و رازیانه و بادرنجبویه پرپر ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. 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 کنترل می‌کند، در حالی‌که در مورد قارچ رایزوپوس برعکس بود. با توجه به نتایج جدول ۸، عصاره هگزانی، اتانولی و متانولی نعناع گربه‌ای و توتون در جلوگیری از رشد قارچ بیماری‌زای مورد بررسی، کمترین EC50 را داشته و عصاره همه حلال‌های زوفا روی قارچ مورد بررسی، EC50 بیشتری نشان داد.

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]، فلاون[4]، آنتراکن[5]، نوننال، فتالازین، سایلن[6]، پیریدین[7]، فنانترن، ایزوکوئینولین و متیل پیپرازین[8] بود. نتایج تحقیقات عبدالملکی و همکاران (Abdolmalekiet *al*., 2011) نشان داد که منتول، استرهای منتول و ترکیبات فلاونوییدی دارای فعالیت ضدمیکروبی می‌باشند.

ترکیبات اصلی در عصاره گیاهی توتون، نیکوتین، لمونن، سایلن، تونبرگول[9]، پیریدین، فنانترن، فیتول[10] و گلوبولول[11] بود. الرحمان و همکاران (Al-Rahman *et al*., 2011)، گلوبولول، سایلن، والنسن و اکالیپتولرا ترکیبات موثر ضدقارچی در اکالیپتوس[12] معرفی کردند.

ترکیبات اصلی در عصاره گیاهی در آویشن کوهی شامل تیمول، سایلن، آنتول ترانس، نفتالنول[13]، نوننال، فنانترن، آنیسول و کارواکرول بود. الرحمان و همکاران (Al-Rahman *et al*., 2011)، گلوبولول،سایلن، والنسن و اکالیپتول را ترکیبات موثر ضدقارچی در آویشن[14] معرفی کردند. ترپن‌ها با فرمول عمومی $(C_5H_8)_n$ ترکیب غالب یا ماده موثره اکثر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی می‌باشند. ترپن‌ها خود به چندین گروه مونوترپن‌ها ($C_{10}H_{16}$)، سزکوئی‌ترپن‌ها ($C_{15}H_{24}$)، دی‌ترپن‌ها ($C_{20}H_{32}$)، تری‌ترپن‌ها ($C_{30}H_{64}$)، و تتراترپن‌ها ($C_{40}H_{64}$) تقسیم می‌شوند که ترکیبات مهمی چون تیمول، اوگنول[15] و کارواکرول جزو فنل‌های مونوترپن[16] محسوب می‌شوند. ساختمان شیمیایی ترکیبات اخیر مرکب از ۱۰ کربن و ماهیت ضد میکروبی آن‌ها به سبب گروه هیدروکسیل در ساختمان شیمیایی آن‌ها است. نوع استقرار گروه هیدروکسیل روی حلقه فنلی موجب شده است که ترکیبات کارواکرول، تیمول و ... از یکدیگر متمایز گردند. مواد مذکور به طور ملایم سمی هستند. مشتقات ترپن‌ها نظیر ژرانیول، منتول و کامفور را ترپنویید[17] می‌گویند. این ترکیبات جزو متابولیت‌های ثانویه گیاهان و دارای ساختمان الکلی هستند. در خصوص ترکیبات غیر فنلی چون لمونن فعالیت‌های ضد میکروبی آن‌ها به سبب وجود گروه آلکالیل است (Hasanzadeh, 2005).

ترکیبات اصلی در عصاره گیاهی بادرنجبویه پرپر شامل تیمول، کارواکرول[18]، سیترال[19]، دی بنزوتیوفن، آنتول ترانس، ژرانیول، کاریوفیلن[20]، پروپیل بنزوئیک اسید، پنتانول[21]، نونال[22]، فنیل پیپرازین، پنتاسیلوگزان، پیریمیدین[23]، فنانترن[24]، سایلن، آنتراکن، پیریدین، برنئول[25]، فتالازین[26]، ایزوکوئینولین[27] و لمونن بود. لی و همکاران (Lee *et al*., 2007) ترکیبات موثر ضدقارچی شناسایی شده در علف لیمو[28] را ژرانیول، نرال[29] و لمونن معرفی کردند.

ترکیبات اصلی در عصاره گیاهی رازیانه شامل سایلن، استراگول[30]، پینوکامفن، لمونن[31]، فنچون[32]، آلفا-فنچون، آنتول ترانس[33]، اکتادکنوئیک اسید[34]، الئیک اسید[35]، آنیسول[36] و آنیسآلدهید[37] بود. میهایلوویچ و همکاران (Mihailovic *et al*., 2011) ترکیبات موثر ضدقارچی شناسایی شده در گیاه *Gentiana asclepiadea* L. را ژرانیول، آلفا پینن، نوننال و لمونن معرفی کردند.

[1] Thymol
[2] Menthol
[3] Menthanol
[4] Flavone
[5] Anthracene
[6] Silane
[7] Pyridine
[8] Methyl piperazin
[9] Thunbergol
[10] Phytol
[11] Globulol
[12] *Eucalyptus globolus*
[13] Naphthalenol
[14] *Thymus vulgaris*
[15] Eugenol (2-methoxy-4-(2-propenyl)phenol)
[16] monoterpenic phenols
[17] terpenoid
[18] Carvacrol
[19] Citral
[20] Caryophyllen
[21] Pentanol
[22] Nonenal
[23] Pyrimidine
[24] Phenanthrene
[25] Borneol
[26] Phthalazine
[27] Isoquinoline
[28] *Cymbopogon citratus*
[29] Neral
[30] Estragol
[31] Limonene
[32] Fenchone
[33] Anethole trans
[34] Octadecenoic acid
[35] Oleic acid
[36] anisole
[37] anisaldehyde

ترکیبات اصلی در عصاره گیاهی زوفا شامل سابینن[1]، فلاندرن[2]، پینوکامفن[3]، بتاپینن و آلفاپینن[4] بود. لی و همکاران (Lee *et al*., 2007) ترکیبات موثر ضدقارچی شناسایی شده در زیره سبز[5] را بتاپینن، گاماترپینن و کومینآلدهید معرفی کردند.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که عصاره گیاهان نعناع گربه‌ای، توتون و آویشن کوهی اثرات ضدقارچی خوبی روی عامل پوسیدگی یقه توتون دارند و متانول و اتانول بهترین حلال برای استخراج عصاره گیاهی می‌باشند.

سپاسگزاری

بدین وسیله از مدیریت و معاونت محترم پژوهشی مرکز تحقیقات و آموزش تیرتاش به خاطر مساعدت در اجرای طرح نهایت قدردانی و تشکر می‌شود و هم‌چنین از زحمات سایر همکاران تقدیر و تشکر می‌شود.

جدول ۱- گونه‌های گیاهی جمع‌آوری شده

Table 1. Collected plant species

plant 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 flowers
catmint	Galugah montains	Laminaceae	*Nepeta cataria*	leaves and flowers
balm	Galugah montains	Laminaceae	*Melissa officinalis*	leaves and flowers
badrashbi	Galugah montains	Laminaceae	*Dracocephalum kotschyi*	leaves
hyssop	Alamdeh montains	Laminaceae	*Hyssopusang ustifolious*	leaves and flowers

جدول ۲- تجزیه واریانس اثر حلال و غلظت‌های مختلف عصاره‌های گیاهی بر بازدارندگی از رشد میسیلیومی قارچ *S. sclerotiorum*

Table 2. Variance analysis for the effects of solvent and different concentrations of plant extracts on *S. sclerotiorum* mycelium growth inhibition

S.O.V.	D.F.	Means square
plant extracts	8	18546**
solvent	4	3308**
concentration	2	343331**
plant × solvent	32	377**
plant × concentration	16	4658**
solvent × concentration	8	1033**
solvent × concentration × plant	64	97**
error	540	1.09
C.V. (%)		2.3

**معنی‌دار در سطح احتمال ۱ درصد

**significant at 1% of probability level.

[1] sabinene
[2] Phellanderene
[3] pinocamphone
[4] alpha-pinene
[5] *Cuminum cyminum*

جدول ۳- مقایسه میانگین اثرات متقابل عصاره‌های گیاهی، حلال و غلظت بر بازدارندگی از رشد میسیلیومی قارچ ***S. sclerotiorum***

Table 3. Mean comparison of interaction effects of plant extracts, concentration and solvent on *S. sclerotiorum* mycelium growth inhibition

plant's name	Concentration (ppm)	control percent				
		water	acetone	hexzan	ethanol	methanol
catmint	0	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}
	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)	0	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}
	1000	81.6 ^{e}	84.8 ^{d}	100 ^{a}	100 ^{a}	100 ^{a}
	2000	86.8 ^{c}	88.6^{b}	100 ^{a}	100 ^{a}	100 ^{a}
thyme	0	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}
	1000	71.8 ^{jk}	72.2 ^{jk}	100 ^{a}	100 ^{a}	100 ^{a}
	2000	76.2 ^{gh}	78.4^{ef}	100 ^{a}	100 ^{a}	100 ^{a}
fennel	0	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}
	1000	51.2 ^{t}	55.4 ^{s}	61 ^{no}	66.4 ^{m}	72 ^{jkl}
	2000	52.4 ^{t}	57.2 ^{qr}	62.4 ^{n}	67 ^{i}	76.4 ^{gh}
badrashbi	0	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}
	1000	51.4 ^{t}	61.2^{no}	71.4 ^{h}	74 ^{ij}	77.2^{fgh}
	2000	55.4 ^{s}	65 ^{m}	77 ^{gh}	77.6 ^{gh}	87 ^{c}
hyssop	0	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}
	1000	54.2 ^{s}	57 ^{q}	61 ^{no}	74 ^{i}	76 ^{h}
	2000	56 ^{qrs}	61.8 ^{no}	62.8 ^{no}	78.2 ^{f}	78.2 ^{f}
balm	0	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}
	1000	32.4 ^{w}	32.2 ^{w}	51.4 ^{t}	59 ^{p}	63^{n}
	2000	36.4 ^{v}	38.4 ^{u}	56 ^{qrs}	63.8 ^{n}	64.8 ^{m}
nepeta	0	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}
	1000	32 ^{w}	36.2 ^{v}	43.6 ^{ut}	48.2 ^{ut}	52.4 ^{t}
	2000	33 ^{w}	38 ^{u}	46.4 ^{ut}	51.2 ^{t}	56.4 ^{qrs}
salvia	0	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}	0 ^{z}
	1000	22^{y}	26.4^{x}	32^{w}	34.2^{v}	36 ^{v}
	2000	23^{y}	27^{x}	33.2 ^{w}	35.2^{v}	36.4 ^{v}

میانگین‌های دارای حروف مشابه در هر ستون در سطح احتمال ۱ درصد اختلاف معنی‌دار ندارند.

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

جدول٤- حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره‌های گیاهی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بر رشد پرگنه قارچ (سانتی‌متر) ***S. sclerotiorum*** بر اساس روش اختلاط با محیط کشت

Table 4. Minimum inhibitory concentration (MIC) of the plant extract (mg/ml) on fungi S. *sclerotiorum* colony growth (cm) according to mix medium method

plant's name	Minimum inhibitory concentration (MIC)				
	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 ۵- غلظت عصاره‌های گیاهی (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) دارای بازدارندگی پنجاه درصد رشد میسیلیومی (EC50) قارچ *S. sclerotiorum* در شرایط آزمایشگاه

Table 5. plant extract concentration (mg/ml) for 50 percent inhibitory of *S.sclerotiorum* mycelium growth (EC50)

plant name	50 percent inhibitory of fungi mycelium growth (EC50)				
	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	10

شکل۱- اثر بازدارندگی عصاره‌های گیاهی در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام با حلال متانول بر قارچ *S. sclerotiorum*

Figure 1. Inhibition effect of plant extracts in 1000 ppm concentration with methanol solvent on *S. sclerotiorum*

References

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.

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. [In Persian with English Abstract].

Abdolmaleki M, Bahraminejad S, Salari M, Abbasi S, Panjehkeh N (2011) Study of antifungal effect of *Menthapi perita* 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.

Adams RP (1995) Identififcation of essential oil components by gas-chromatography/mass spectroscopy. Allured Publishing. Carol Stream. 404 pp.

Alam A, Tripathi A, Vats S, Behera KK, Sharma V (2011) *In vitro* antifungal efficacies of aqueous extract of *Dumortiera hirsute* (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.

Amadioha AC (2000) Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of Azadirachta indica. Crop Protection 11: 287-290.

Anil Sehajpal S, Parminder K (2009) Evaluation of plant extracts against *Rhizoctonia solani* causing sheath blight of rice. Journal of Plant Protection Sciences 1(1): 25-30.

Assemi H (2012) Production optimization of *Helicoverpa armigera* nucleopolyhedro virus on tobacco budworm.Islamic Aazad University Arak Branch Faculty of Agriculture & Natural Resources, Ph.D. Thesis in Entomology. 100 pp. [In Persian with English Abstract].

Aye SS, Matsumoto M (2010) Effect of some plant extracts on *Rhizoctonia* spp. and *Sclerotium hydrophilum*. Journal of Medicinal Plants Research 5(16): 3751-37.

Azadbakht M (2008) Taxonomy of medical plants. Institute publications of Teymorzadeh. 401 pp. [In Persian with English Abstract].

Azimi AA, Delnavaz HB, Mansour GA (2006) Antifungal effect of aqueous alcoholic and phenolic extracts of seed and leaves of *Sorghum bicolour* against *Fusarium solani* and *Fusarium poa*. Medical Plant 6 (1): 26-32.

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: 16193-16201.

Dissanayake MLMC, Kumari WKMT (2012) Efficacy of various plant extracts to control *Fusarium* wilt of *Polysciasbal fouriana* variety Marginata. Asian Journal of Experimental Biology Science 3(1): 129-135.

Gupta SK, Tripathi SC (2011) Fungi toxic 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.

Lee SO, Choi GJ, Jang KS, Lim HK, Cho KY, Kim JC (2007) Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. Plant Pathology Journal 23(2): 97-102.

Lucas GB (1975) Disease of tobacco. Third Edition. Biological Consulting Associates, Releight, North Carolina. 621 pp.

Mihailovic V, Vukovic N, Niciforovic N, Solujic S, Miadenovic M, Maskovic P, Stankovic M (2011) Studies on the antimicrobial activity and chemical composition of the essential oils and alcoholic extracts of *Gentiana asclepiadea* L. Journal of Medicinal Plants Research 5 (7): 1164-1174.

Obongoya BO, Wagai SO, 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.

Pirajno G, Scarito G, 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): 329-341.

Sajjadi A, Hosseininejad A, Assemi, H (2012) Determination of damage of root knot nematode (*Meloidogyne incognita*) on some tobacco commercial cultivars. Iranian Journal of Plant Pathology 80 (1): 13-22. [In Persian with English Abstract].

Sajjadi A, Assemi H (2012) Evaluation of *Trichoderma* isolates for biocontrol of tobacco collar *Sclerotinia* rot in Golestan province. Iranian Journal of Applied Plant Protection 1(2): 73-84. [In Persian with English Abstract].

Shariff N, Sudarshana MS, Umesha S, Hariprasad P (2006) Antimicrobial activity of *Rauvolfia tetraphylla* and *Physalis minima* leaf and callus extracts. African Journal of Biotechnol 5(10): 946-950.

Suleiman MN (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 (4): 217-220.

Thieron M, Reisener HJ, Scheinpflug H (1995) Systemic acquired resistance in rice: Regulation of host defense reaction. pp. 493-502. 11th International Reinhardsbrum Symposium, Friedrichroda, Thuringia, Germany.

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: 8291-8295.