فعالیت ضدقارچی اسانس گیاه دارویی میخک در برابر قارچ تریکودرما و دکمه‌ای

سمیه محمدی*[۱]، مهدی بهنامیان، سارا دژستان
[۱*] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق، اردبیل
[۲] گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق، اردبیل
[۳] گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه محقق، اردبیل
نویسنده مسئول: m_behnamian@uma.ac.ir

چکیده

قارچ‌های خوراکی از مهمترین منابع پروتئین غیرحیوانی می‌باشد. یکی از پاتوژن‌های مهم قارچی، گونه‌های تریکودرما (*Trichoderma harzianum*) می‌باشد که بیماری‌های حاصل از آن به عنوان مخرب‌ترین و خطرناک‌ترین بیماری‌های قارچی و خوراکی شناخته شده است. به دلیل وجود گونه غالب تریکودرما در بستر کشت قارچ دکمه‌ای و منسوخ شدن استفاده از قارچ‌کش‌های شیمیایی، اسانس‌های گیاهی جهت کنترل این بیماری مورد آزمایش و پژوهش قرار گرفته‌اند. در این تحقیق از اسانس گیاه میخک روی سه جدایه از قارچ تریکودرما و یک جدایه از قارچ دکمه‌ای استفاده شد. این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام گردید. نتایج نشان داد که اسانس میخک اثرات قابل توجهی در بازدارندگی و کشندگی سویه‌های مختلف قارچ تریکودرما و قارچ دکمه‌ای دارد، به‌طوری‌که بهترین فعالیت مهارکنندگی اسانس میخک برای سویه‌های AS، AK وASP قارچ تریکودرما و قارچ دکمه‌ای به ترتیب در غلظت‌های ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی پی ام، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی پی ام و ۱۵۰۰ پی پی ام مشاهده گردید، همچنین نتایج تفسیر اسانس نشان داد که اوژنول به مقدار ۸۵ درصد در اسانس میخک وجود داشت.

کلمات کلیدی: *Trichoderma harzianum*، قارچ دکمه‌ای، قدرت بازدارنگی، اثر کشندگی، اوژنول

مقدمه

گیاهان دارویی مخازن غنی از متابولیت‌های ثانویه و در واقع منبع اساسی بسیاری از مواد دارویی می‌باشند. اسانس‌های گیاهی مخلوط‌هایی از ترکیبات فرار تولید شده توسط ارگانیسم‌های زنده بوده که توسط روش‌های فیزیکی چون عصاره‌گیری، تقطیر از همه گیاه یا بخش‌هایی از گیاه بدست می‌آید. این ترکیبات بطور کلی بازمانده‌های ناشی از فرایندهای اصلی متابولیسم گیاهی به ویژه تحت تاثیر تنش‌ها می‌باشند که از نظر شیمیایی همگن نبوده و به صورت‌های مختلف اغلب با منشاء ترپنی مشاهده می‌شوند. خواص ضد قارچی اسانس‌ها شناخته شده است. قارچ دکمه‌ای از ارزش اقتصادی و توزیع جهانی بالایی برخوردار است و در مراحل رشد خود در معرض بسیاری از عوامل بیماری‌زا قرار می‌گیرد که مهمترین آن، گونه تریکودرما *Trichoderma harzianum* می‌باشد که در بسترهای کشت و پرورش قارچ دکمه‌ای مشاهده می‌شوند.

اسانس‌ها متشکل از مولکول‌های فراری مانند ترپنوییدها و ترکیبات معطر فنولی و آلیفاتیک هستند که ممکن است دارای خاصیت قارچ‌کشی باشند (Gavanji *et al.*, 2014). تاکنون گزارش‌های مختلفی در ارتباط با استفاده از اسانس‌های گیاهی جهت کنترل عوامل بیماریزای قارچی ارا ئه شده است، که نشان دهنده اثر کشندگی متفاوت اسانس‌های گیاهی است (Mnayer *et al.* 2014). میخک (*Syzygium aromaticum*) از خانواده Myrtaceae می‌باشد. اسانس میخک دارای بوی قوی و طعمی سوزاننده است و این اسانس در مجاورت هوا به رنگ تیره و غلیظ در می‌آید. در اسانس غنچه‌های میخک علاوه بر اوژنول، موادی نظیر پروپنیل-فنل، آلفا-کوپائن، کاریوفیلن، آلفا-هومولن، آلفا-فارنسن، کادینن و اکسید کاریوفیلن نیز یافت می شود. ماده اصلی میخک اوژنول می‌باشد و خواص ضد قارچی و ضد میکروبی آن به اثبات رسیده است (حبیبیان و همکاران، ۱۳۹۶).

IrHC2019

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و استخراج اسانس

در این تحقیق غنچه‌های خشک شده میخک با استفاده از آسیاب به شکل پودر در آمد. برای اسانس‌گیری با دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب در هر نوبت ۵۰ گرم از پودر حاصل مورد استفاده قرار گرفت. اسانس بدست آمده توسط سولفات سدیم خشک، آبگیری و در شیشه‌های تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (Davari and Ezazi 2016).

تجزیه و شناسایی ترکیبات اسانس

جهت شناسایی اجزای تشکیل دهنده اسانس میخک از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Egilent-7890A مجهز به ستون HP-5 استفاد شد. شناسایی مواد تشکیل دهنده اسانس‌ها با استفاده از پارامترهای مختلف از قبیل زمان بازداری، مطالعه طیف‌های جرمی و مقایسه این طیف‌ها با ترکیبات استاندارد و اطلاعات موجود در کتابخانه رایانه دستگاه GC-MS صورت گرفت (Farzaneh *et al.*, 2015).

آماده سازی و ارزیابی اثرات ضد قارچی اسانس

در این مطالعه از کشت‌های خالص قارچ بیماریزای تریکودرما و قارچ دکمه ای سویه A15 که روی محیط کشت حاصل از عصاره کمپوست بعلاوه اکسترگت آگار، رشد داده شده بودند، استفاده شد. برای ارزیابی اثر اسانس‌ها بر رشد جدایه‌های قارچی، از روش اختلاط اسانس با محیط کشت استفاده شد. برای این منظور از اسانس‌های مورد نظر در محلول توئین ۸۰ درصد، امولسیون تهیه گردید و محیط فاقد اسانس هم به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. مقادیر مناسبی از اسانس مورد نظر با غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰و ۱۵۰۰ پی پی ام (میکرولیتر در لیتر) به فلاسک‌های حاوی محیط کشت با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد اضافه و به هم زده شد تا امولسیون یکنواختی بدست آید. پس ازتوزیع محیط کشت در تشتک‌های پتری و انعقاد آن، دیسک قارچی به قطر ۱۰ میلی متر در وسط تشتک‌های پتری قرار داده شد. پتری‌های مایه‌زنی شده در انکوباتور با دمای ۲۴ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، رشد رویش‌هاله هر قارچ بطور روزانه و تا زمانی که محیط کشت تشتک‌های پتری شاهد توسط قارچ بطور کامل پر شود، اندازه‌گیری شد. حداقل غلظت بازدارندگی (minimum inhibitory concentration, MIC) پایین‌ترین غلظتی از اسانس بود که موجب ۱۰۰ درصد بازدارندگی در رشد گردید. عدم وقوع رشد چهار روز پس از انتقال دیسک قارچی از محیط کشت حاوی اسانس، محیط فاقد اسانس به عنوان حداقل غلظت قارچ‌کشی minimum fungicidal concentration = MFC در نظر گرفته شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی در ۳ تکرار انجام شد. تجزیه آماری با استفاده از نرم افزار SPSS صورت گرفت.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از تجزیه شیمیایی اسانس میخک در جدول ۱ ارائه شده است. تعداد ۱۷ ترکیب در اسانس میخک شناسایی گردید که مهمترین آنها اوژنول با مقدار ۸۵ درصد مشاهده گردید. از دیگر ترکیب‌های مهم شناسایی شده در اسانس میخک می‌توان به بتا کاریوفیلن (۴٪)، اوژنیل استات (۷/۳)، آلفاهیومولن (۰/۴٪) و بتا اوسیمن (۰/۳۷٪) اشاره کرد.

نتایج حاصل از فعالیت ضدقارچی غلظت‌های مختلف اسانس میخک در شکل‌های ۱ و ۲ مشخص شده است. بهترین فعالیت مهارکنندگی اسانس میخک برای سویه AK قارچ تریکودرما و قارچ دکمه ای در روز سوم مشاهده گردید، چون هر سه غلظت ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی پی ام اسانس میخک، بالاترین اثر ضدقارچی را در مقایسه با شاهد از خود نشان دادند. برای سویه AsP بهترین اثر ضدقارچی اسانس میخک در روز سوم برای غلظت ۱۵۰۰ پی پی ام مشاهده شد. همچنین برای سویه As، فعالیت ضدقارچی اسانس میخک برای غلظت‌های ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۱۵۰۰ پی پی ام، برای همه روزهای آزمایش نتایج تقریباً مشابهی نشان داد. اوژنول از مهمترین متابولیت‌های ثانویه در کنترل قارچها می‌باشد (Kishore *et al.*,2007). بررسی‌های قبلی نشان داده‌اند که قارچهای بیماری زا حساسیت بالایی به اسانس میخک دارند که این امر می‌تواند به دلیل

IrHC2019

وجود اوژنول بالا در اسانس گیاه میخک باشد (Suwitchayanon and Kunasakdakul, 2009). یحیی زاده و همکاران (۲۰۰۸) اثر رازیانه، میخک، آویشن و مریم گلی را روی رشد برخی قارچها بررسی کردند و نشان دادند آویشن و میخک در غلظت ۶۰۰ پی پی ام به طور کامل رشد قارچ را مهار می‌کنند ولی رازیانه و مریم گلی فاقد اثر مهار کنندگی روی این قارچها بوده اند.

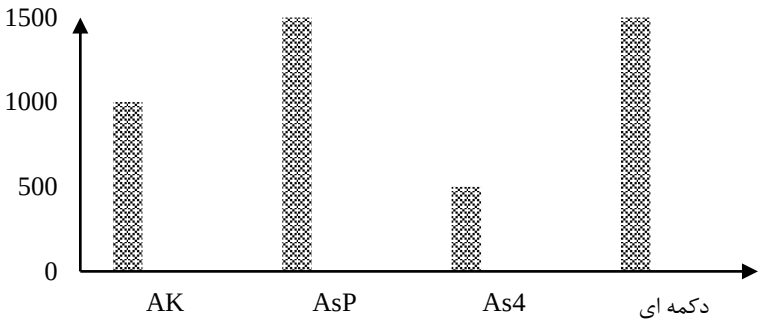
در تحقیقی دیگر مشخص گردید که اوژنول باعث جلوگیری از رشد اسپورهای قارچهای بیماریزا می‌شود که این امر مهمی در کنترل بیولوژیک می‌باشد، چون در کنترل بیولوژیک بحث قارچ ایستایی از اهمیت بالایی برخوردار است (Kishore and Pande, 2004). مشخص شده است که ترکیبات فنولی مانند اوژنول با تجزیه آنزیم‌ها و اسید آمینه‌هایی که در جوانه‌زنی قارچها نقش دارند، قادر به کنترل این قارچها می‌باشند (Suwitchayanon and Kunasakdakul, 2009). همچنین اوژنول با تاثیر بر دیواره سلولی برخی قارچها باعث تغییر حالت غیر طبیعی مسیلیوم‌های قارچ گردیده است (محمدی، ۱۳۹۱). با توجه به مطالب بالا اینگونه استنباط می‌گردد که درکل نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر با نتایج سایر محققین مطابقت داشته و در یک راستا می‌باشد. اختلاف در غلظت موثر در این تحقیق و سایر تحقیقات نیز ممکن است به عوامل مختلفی از جمله شرایط و روش انجام آزمایشات، نوع سویه قارچی مورد استفاده، روش اسانس‌گیری و مواد مورد استفاده جهت انجام آزمایشات بستگی داشته باشد، ولی نکته مهم و حایز اهمیت هم‌خوانی این نتایج با نتایج سایر تحقیقات مشابه است.

با توجه به نتایج این تحقیق و گزارشات قبلی، اسانس میخک می‌تواند جایگزین قارچ‌کش‌های شیمیایی گردد. با این وجود نیازمند مطالعات بیشتر و آزمایش‌های مختلف برای تاید این پیشتهاد می‌باشد.

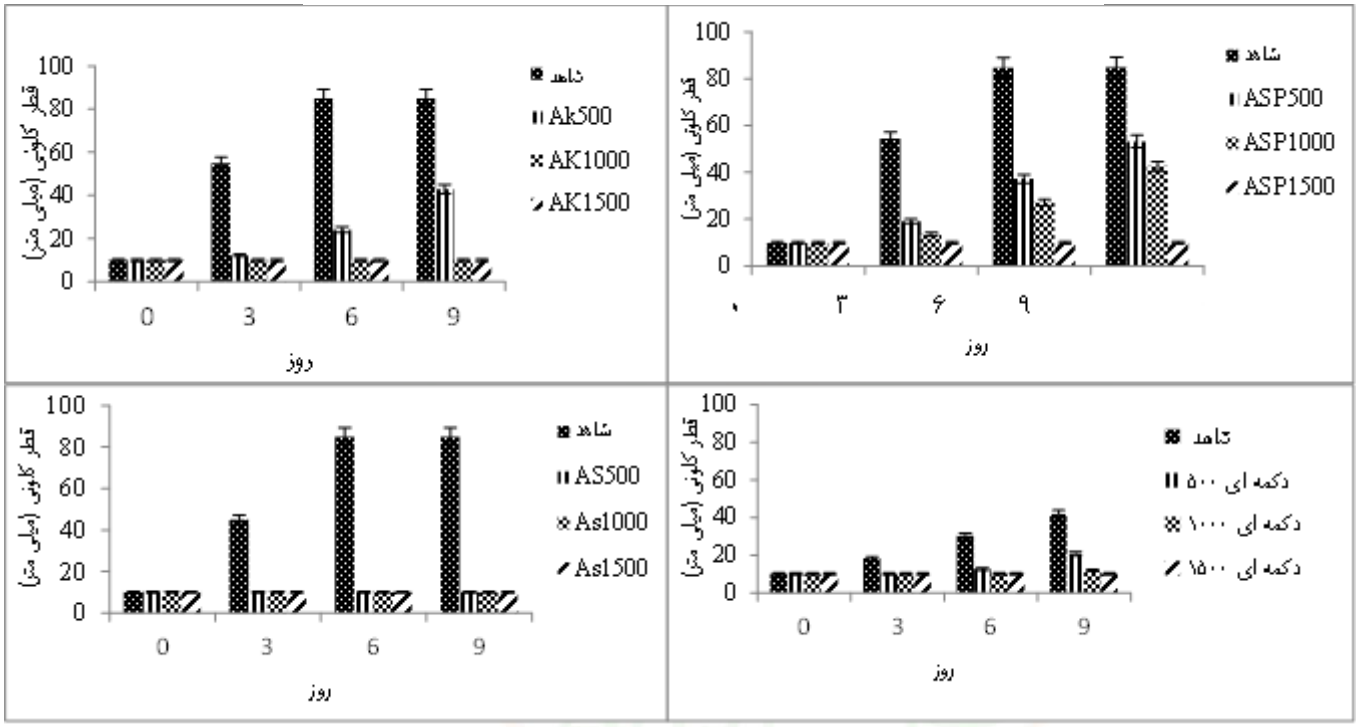
جدول ۱- ترکیب‌های شناسایی شده در اسانس میخک

ردیف	ترکیب	RI	درصد (٪)
۱	2-Heptanone	۸۸۹	۰/۰۵
۲	*α*-Pinene	۹۲۱	۰/۰۳
۳	*p*-Cymene	۱۰۲۳	۰/۰۲
۴	Limonene+1,8 Cineole	۱۰۲۹	۰/۰۱
۵	2-Heptyl acetate	۱۰۴۶	۰/۰۷
۶	(*E*)-*β*-Ocimene	۱۰۵۱	۰/۳۷
۷	2-Nonanone	۱۰۹۲	۰/۰۲
۸	Linalool	۱۰۹۸	۰/۰۲
۹	Methyl salicylate	۱۱۸۹	۰/۰۸
۱۰	*p*-Allyl phenol	۱۲۶۰	۰/۱۴
۱۱	Eugenol	۱۳۶۱	۸۵/۰
۱۲	*α*-Copaene	۱۳۷۲	۰/۱
۱۳	*β*-Caryophyllene	۱۴۱۲	۴/۰
۱۴	*α*-Humulene	۱۴۴۶	۰/۴
۱۵	Δ-Cadinene	۱۵۱۸	۰/۰۵
۱۶	Eugenyl acetate	۱۵۲۶	۷/۳
۱۷	Caryophyllene oxide	۱۵۷۳	۰/۱۲
مجموع درصد			**۹۷/۷۶**

IrHC2019



شکل ۱- حداقل غلظت بازدارندگی(MIC) اسانس میخک برای برای سویه‌های مختلف تریکودرما و قارچ دکمه ای



شکل ۳- حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) اسانس میخک برای قارچ خوراکی دکمه‌ای و قارچ بیماریزای تریکودرما

منابع

حبیبیان، س.، صادقی، ح.، رحیمی، ر. و ابراهیمی، عزیزالله. ارزیابی اثر ضد قارچی عصاره‌های آبی گل ختمی و گل میخک علیه جدایه‌های قارچی آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم. نشریه دامپزشکی در پژوهش و سازندگی، شماره ۱۱۵.

محمدی، ص. ۱۳۹۱. اثر ضدقارچی عصاره آبی و اوژنول گیاه میخک بر رشد قارچ *Fusarium oxysporum* f.sp. sesame عامل زردی و پژمردگی کنجد. فصلنامه دانش نوین کشاورزی پایدار، (۳) ۸.

Davari M, Ezazi R. 2016. Study on the effects of four medicinal plant essential oils and two *Trichoderma* species on biocontrol of grapefruit rot fungi. Biological Control of Pests and Plant Diseases 5: 1-12.

Farzaneh M, Kiani H, Sharifi R, Reisid M, Hadiana J. 2015. Chemical composition and antifungal effects of three species of *Satureja* (*S. hortensis*, *S. spicigera*, and *S. khuzistanica*) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology 109: 145-151.

IrHC2019

Gavanji S, Mohammadi E, Larki B, Bakhtari A. 2014. Antimicrobial and cytotoxic evaluation of some herbal essential oils in comparison with common antibiotics in bioassay condition. Integrative Medicine Research 3: 142-152.

Kishore GK, Pande S, Harish S. 2007. Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. Plant Disease 91: 375-379.

Kishore GK, Pande S. 2004. Natural fungicides for management of phytopathogenic fungi. Annual Review of Plant Pathology 3: 331-356.

Mnayer D, Fabiano-Tixier AS, Petitcolas E, Hamieh T, Nehme N, Ferrant C, Fernandez X, Chemat F. 2014. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of six essentials oils from the Alliaceae family. Molecules 19: 20034-20053.

Suwitchayanon P, Kunasakdakul K. 2009. In vitro effects of clove and turmeric extracts controlling crucifer pathogens. Journal of Agricultural Technology 5: 193-199.

Yahyazadeh, M., R. Omidbaigi, R. Zare and H. Taheri. 2008. Effect of some essential oil on mycelial growth of *Penicillium digitatam* sacc. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24(8): 1445-1450.

Antifungal activity essential oil Clove against Trichoderma and Button Mushroom

Somayeh Mohammadi[1]*, Mahdi Behnamian[2], Sara Dezhsetan[3]
[1*] Department of Horticultural Science, University of Mohaghegh, Ardabil
[2] Department of Horticultural Science, University of Mohaghegh, Ardabil
[3] Department of Agronomy and Plant Breeding, University of Mohaghegh, Ardabil
[*]*Corresponding Author:* m_behnamian@uma.ac.ir

Abstract
Edible fungi are one of the most important sources of protein. One of the most important fungal pathogens is trichoderma (*Trichoderma harzianum*) a disease that has been identified as the most destructive and most dangerous fungal and edema disease. Due to the presence of a dominant *Trichoderma* species in the fungus cultivation site and the use of chemical fungicides, plant essential oils have been tested for this disease. In this research, essential oil of clove was used on three isolates from *Trichoderma* fungus and a mushroom button isolate. This research was carry out as a factorial experiment in a completely randomized design with three replications. The results showed that clove oil has significant lethal and inhibitory effects. The best inhibitory activity of Clove Oil was observed for AK, AS and ASP strain of *Trichoderma* and Mushroom Button on the concentration of 1000 and 1500 - 500, 1000, 1500 as well as 1500 ppm (respectively),. Also, the results of the essential oil analysis showed that eugenol was 85% Clove oil.

Keywords: *Trichoderma harzianum*, Clove, lethal and inhibitory effects, Eugenol

IrHC2019