



بررسی اثرات ضدقارچی عصاره گیاهی چریش *Azadirachta indica* علیه

بیمارگر *Rhizoctonia solani*

نیما خالدی*^۱، جمیله ایرنگانی^۱، مینا حسینی حاجی عبدال^۱، مبینا هادی نژاد زرین آبادی^۱

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد بیماری شناسی گیاهی، گروه حشره شناسی و بیماری شناسی گیاهی، پردیس ابوریحان، دانشگاه تهران، تهران، ایران

* نویسنده مسئول: nkhaledi@ut.ac.ir

چکیده

در این مطالعه فعالیت ضدقارچی عصاره گیاه چریش *Azadirachta indica* مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، با استفاده از حلال های آب، متانول و اتانول عصاره اندام های مورد بررسی گیاه استخراج و اثر ضدقارچی آن روی بیمارگر *Rhizoctonia solani* بررسی شد. ارزیابی اثرات ضدقارچی عصاره های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی و بر اساس روش دیسک کاغذی با غلظت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ mg/paper انجام شد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که عصاره این گیاه اثر بازدارندگی (قارچ ایستایی) بر رشد قارچ مورد بررسی دارند.

کلید واژه: دیسک کاغذی، قارچ ایستایی، عصاره گیاهی، *Rhizoctonia solani Azadirachta indica*

مقدمه

گیاه چریش (*Azadirachta indica* (Neem) درختی است از خانواده Meliaceae می باشد. در شرایط مختلف و از قسمت های مختلف درخت چریش حدود ۱۰۰ ماده شیمیایی تولید می شود، بیشتر این مواد شیمیایی به کلاسی عمومی از ترکیبات طبیعی که Triterpenes و به طور اختصاصی تر Limonoide نامیده می شوند، تعلق دارند (Feuethake, 1983; Heyde et al., 1983). نتایج بدست آمده در تحقیق قربانیان و همکاران (۱۳۸۴) نشان می دهد که عصاره آبی برگ گیاه چریش بصورت وابسته به زمان، بدون هر گونه تاثیر معنی دار بر رشد قارچ *Aspergillus parasiticus* موجب مهار سنتز آفلاتوکسین می گردد. به نظر می رسد تاثیر مهاری عصاره بر تولید سم در مراحل اولیه مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین یعنی زمانی که ژن های مسوول بیوسنتز سم حداکثر فعالیت خود را در داخل سلول های قارچ دارند، رخ می دهد. حسینی نژاد (۱۳۸۴) ضمن بررسی اثر مشتقات چریش *A. indica* بر نماتد مولد غده ریشه *Meloidogyne javanica* در گوجه فرنگی مشاهده کرد که علیرغم کاهش معنی دار جمعیت نهایی، تعداد گره ها و توده های تخم نماتد در تمامی تیمارهای چریش، بیشترین کاهش نماتد و بیشترین افزایش رشد گیاه در مقایسه با شاهد در تیمار پودر مغز دانه چریش می باشد. پاسالار و همکاران (۱۳۸۹) عصاره آبی چریش روی صفات بارز جوانی علف هرز خردل وحشی از جمله درصد جوانه زنی، سرعت جوانه زنی، وزن تر و خشک، طول ساقچه و ریشچه گیاهچه های آن تاثیر منفی گذاشت. امروزه استفاده از عصاره های گیاهی به دلیل داشتن خواص دارویی، ضدقارچی، ضدباکتریایی و آنتی اکسیدانی متابولیت های ثانویه در کنترل عوامل میکروبی رو به پیشرفت است. برخی از گیاهان به علت دارا بودن یک سری ترکیبات فعال زیستی (متابولیت های ثانویه) دارای خاصیت ضد میکروبی می باشند. گیاهان بالغ بر یکصد هزار متابولیت ثانویه طبیعی با وزن مولکولی پائین تولید می کند (Dixon, 2001). بسیاری از این متابولیت ها در دفاع گیاه در مقابل آفات و امراض مؤثر می باشند (Cowan,



1999) که شناخت و بررسی آن ها می تواند کمک مؤثری به کنترل آفات و امراض بنماید. مقدار و حتی نوع این متابولیت ها در گیاهان به شرایط محیطی و جغرافیائی محل رویش بستگی دارد (Azlan et al., 2003). تقریباً بیست درصد از گیاهان شناخته شده در جهان در آزمون های زیستی مورد بررسی قرار گرفته اند (Suffredini et al. 2004). در این بین، گیاهان دارویی همواره به عنوان یکی از مهم ترین منابع ترکیبات فعال زیستی مورد توجه بوده اند (sheriff, et al., 2006). تا کنون خاصیت ضد میکروبی بسیاری از فراورده های طبیعی گیاهی مورد مطالعه قرار گرفته است (Cowan, 1999). اما اغلب آزمایشات انجام شده در مورد تأثیر عصاره گیاهی بر عوامل بیماریزای انسانی بوده است و آزمایشات کمتری به خصوص در ایران بر روی تأثیر این مواد بر عوامل بیماریزای گیاهی انجام شده است. در سالهای اخیر به دلیل بروز برخی مشکلات و تهدیدهای ناشی از مصرف سموم شیمیائی در سیستم های کشاورزی، گرایش زیادی به استفاده از پتانسیل بالقوه مواد بیولوژیکی در کنترل آفات، بیماریها و علف های هرز ایجاد شده است (Regnault – Roger, 1994). این روش تحقیق و پژوهش در مورد ترکیبات طبیعی که ممکن است منجر به کشف عوامل موثر در کنترل عوامل بیماریزای گیاهی (باکتری ها و قارچ ها) شود، از اهمیت بسیار برخوردار است (Muller et al. 1995, Pitaroki et al. 2003).

مواد و روش ها

مواد گیاهی

در این مطالعه اندام های مختلف (بذر، غلاف و برگ) گیاه چریش از منطقه سرباز استان سیستان و بلوچستان تهیه و پس از شستشو و خشک کردن، با استفاده از آسیاب خرد گردیدند، سپس بافت های آسیاب شده از الک یک مش عبور داده شد و برای استفاده در مراحل بعدی نگه داری گردیدند.

جدایه های قارچی

در این مطالعه از یک جدایه *R. solani* (جدا شده از ریشه لوبیا) که قبلاً بیماریزایی آن ها روی میزبان مربوطه اثبات شده بود، استفاده گردید.

عصاره گیری با استفاده از حلال های مختلف

عصاره گیری با آب: در این روش مقدار پنج گرم از بافت آسیاب شده با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر استریل مخلوط و در بن ماری جوش قرار داده شد. سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شده و به منظور تبخیر آب و استحصال عصاره در آون در دمای $50/5^{\circ}C$ قرار داده شد (Azimi et al. 2006).

عصاره گیری با متانول: در این روش مقدار پنج گرم از بافت آسیاب شده در ۱۰۰ میلی لیتر متانول به مدت ۲۴ ساعت در دمای $20^{\circ}C$ روی شیکر قرار داده شد. پس از این مدت ۷۵ میلی لیتر از محلول را برداشته، ۲۵ میلی لیتر آب مقطر استریل به آن اضافه گردید که حجم آن به ۱۰۰ میلی لیتر برسد، سپس هم حجم با آن هگزان اضافه گردید. این مخلوط دو ساعت روی شیکر قرار داده شد، سپس بخش های مختلف جدا گردید و بخش متانولی جهت تبخیر متانول و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد (Bahraminejad et al. 2008).

عصاره گیری با اتانول: استخراج مطابق روش قبلی انجام گردید.

ارزیابی اثر بازدارندگی عصاره بر اساس روش دیسک کاغذی

در روش دیسک کاغذی (paper disc) مقدار ۱۰۰ میلی گرم از هر عصاره در یک میلی لیتر از حلال مناسب حل شد و مورد استفاده قرار گرفت (Meliss et al. 2005)، در بررسی اولیه مقدار ۵۰ میکرولیتر از هر عصاره در پنج مرحله هر دفعه ۱۰ میکرولیتر عصاره



روی دیسک کاغذی قرار داده شد و پس از هر دفعه اجازه داده شد تا کاملاً خشک شود و همچنین در مورد دیسک‌هایی که دارای مقادیر متفاوتی هستند متناسب با آن غلظت، تعداد دفعاتی متفاوتی عصاره به دیسک کاغذی تزریق می‌کنیم. مقدار صفر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که در این مورد فقط از حلال با غلظت مشابه استفاده گردید. به منظور بررسی اثر ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی از حاشیه روئیده، یک هفته‌ای قارچ روی محیط PDA قرص‌هایی به قطر شش میلی متر توسط چوب پنبه سوراخ کن تهیه و در وسط پتری حاوی محیط PDA قرار داده شد. در دمای 25°C در انکوباتور، قارچ گونه *R. solani* به علت اینکه سرعت رشد میسسیلیوم آن بیشتر است قطر پرگنه آن بعد از ۳۲ ساعت به مقدار مورد نظر میرسید، سپس دیسک‌های حاوی عصاره در فاصله معین از حاشیه روئیده قارچ قرار داده شد و در فواصل زمانی مختلف شعاع هاله‌ی بازدارندگی از روبرو، سمت چپ و راست دیسک کاغذی یادداشت برداری گردید. این آزمایش در چهار تکرار انجام شد و نتایج حاصله نیز با تکرار مجدد کل آزمایش تثبیت گردید و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ی دانکن در سطح یک درصد ($P < 0.01$) با استفاده از نرم افزار SAS (version 9.00) صورت گرفت.

. به منظور بررسی اثر قارچ‌کشی یا قارچ‌ایستایی عصاره‌ها، قرص‌های قارچی تیمارهایی که رشد قارچ در آنها مشاهده نگردید روی محیط PDA واکشت شد و رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت جدید بررسی گردید.

نتایج و بحث

عصاره‌های آبی حاصل از غلاف، برگ و بذر گیاه چریش علیه *R. solani* دارای خواص بازدارندگی بود (شکل ۱). در ارتباط با مقایسه بین غلاف، برگ و بذر چریش می‌توان گفت که مواد بازدارنده رشد *R. solani* در غلاف به طور قابل توجهی بیشتر از اندام‌های دیگر بوده است (جدول ۱). از بذر میوه و هسته چریش روغنی با طمع تلخ، با بوی سیر و ماده مؤثره‌ای به نام Azadirachtin همراه با مواد Solonnnin, Limonoid, Triterpenoid, Meliantroil و Nimbidin استخراج می‌شود (Feuethake, 1983; Heyde et al., 1983) و با توجه به اینکه متابولیت‌های زیادی از دسته آلکالوئیدها، استروئیدها، فلاونوئیدها و ساپونین‌ها از این گیاه استخراج شده است، می‌توان اثر قارچ‌کشی این گیاه را به Triterpenoid نسبت داد ولی با جداسازی متابولیت‌های ثانویه فوق الذکر و بررسی خواص قارچ‌کشی آنها می‌توان موضوع فوق را اثبات نمود. همچنین مقدار مواد مؤثره در اندام‌های مختلف این گیاه متفاوت است به عنوان مثال بیشترین مقدار ماده مؤثره چریش در غلاف آن یافت می‌شود. از این رو، ضروری به نظر می‌رسد اندام‌های این گیاه به صورت جداگانه از لحاظ بازدارندگی رشد قارچ در یک آزمایش جامع مورد بررسی قرار گیرند. Moslem و El-Kholie (۱۹۹۲) تاثیر قارچ‌کشی عصاره برگ و دانه گیاه چریش بر روی برخی قارچ‌های بیمارگر گیاهی انجام دادند و قارچ‌های *Fusarium oxysporum* و *Rhizoctonia solani* جزء قارچ‌های حساس بودند (Moslem, M.A. and E.M. El-Kholie, 1992). همچنین می‌توان پس از یافتن اندام گیاهی با بیشترین مواد بازدارنده و بهترین حلال برای دستیابی هر چه بیشتر این مواد گیاهان چریش روئیده در مناطق مختلف جغرافیایی را مطالعه نمود. باید توجه داشت که نوع حلال در استخراج مواد بازدارنده‌ی گیاه تأثیر بسزایی دارد از آنجایی که مطالعه ترکیبات طبیعی گیاهان، ممکن است منجر به کشف عوامل مؤثر در کنترل عوامل بیماری‌زای گیاهی (باکتری‌ها و قارچ‌ها) گردد، لذا انجام پژوهش‌های گسترده در این حوزه از اهمیت بسیاری برخوردار است (Nayeemulla Shariff et al., 2006; Cowan, 1999). با توجه به این که شرایط مختلف آب و هوایی فیزیولوژی گیاه را تحت تأثیر قرار داده و مقدار و حتی نوع متابولیت‌های ثانویه گیاه را متأثر می‌سازد (Peterson et al., 2005)، بررسی اثرات ضد میکروبی عصاره گیاهان واجد مواد بازدارنده در مناطق جغرافیایی مختلف پیشنهاد می‌گردد. همچنین از آنجایی که مراحل مختلف رشد گیاهان حاوی مقادیر و حتی انواع متفاوتی از متابولیت‌های مؤثر بر رشد قارچ‌ها

۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

می باشد (Crombie and Crombie, 1986) توصیه می شود مقدار و نوع متابولیت های ثانویه گیاه در مراحل مختلف رشد مورد بررسی قرار گیرد.

جدول ۱- شعاع بازدارندگی (Mean±SE) عصاره های استخراج شده برگ، غلاف و بذر چربش با استفاده از حلال های مختلف روی قارچ بیماری زای گیاهی *Rhizoctonia solani* در غلظت ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰ میلی گرم به ازای هر دیسک کاغذی به میلی متر.

غلظت mg/paper	اندام	شاهد	حلال	
			متانول	اتانول
۵	برگ	NEJ	NE	۶/۶۷±۰/۱۰
	غلاف	NEJ	NE	۹/۵۷±۰/۵۸EF
	بذر	NEJ	NE	۵/۰۲±۰/۱۵I
۱۰	برگ	NEJ	NE	۸/۴۳±۰/۱۰
	غلاف	NEJ	NE	۱۱/۵۱±۰/۶۴C
	بذر	NEJ	NE	۷/۱۴±۰/۴۲H
۱۵	برگ	NEJ	NE	۹/۱۱±۰/۱۰
	غلاف	NEJ	NE	۱۳/۲۰±۰/۲۶B
	بذر	NEJ	NE	۹/۱۱±۰/۳۱GF
۲۰	برگ	NEJ	NE	۱۰/۲۴±۰/۱۰
	غلاف	NEJ	NE	۱۳/۴۸±۰/۵۰B
	بذر	NEJ	NE	۱۷/۰۴±۰/۰۱A
				۱۱/۲۷±۰/۲۴CD

* (mm) خطای استاندارد میانگین، NE = فاقد تأثیر قارچ ایستایی

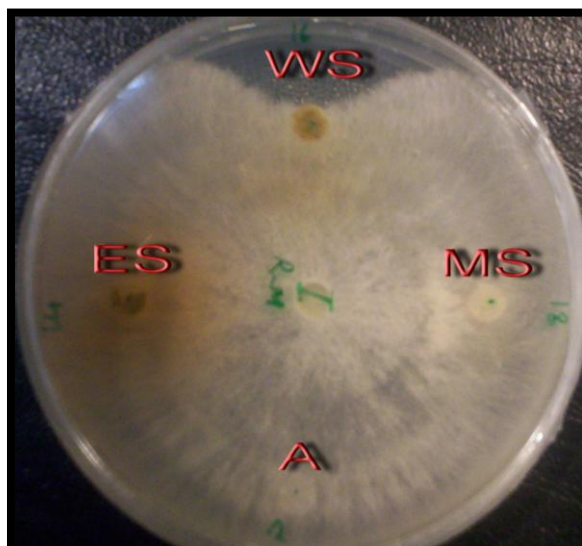
- اعداد جدول میانگین چهار تکرار است.

- اعدادیکه با حروف مختلف نشان داده شده اند در آزمون دانکن در سطح یک درصد ($P < 0.01$) با یکدیگر تفاوت معنی دار دارند.

- LSD یا Least Significant Difference حداقل تفاوت معنی دار = ۰/۹۵

شکل ۱- اثر بازدارندگی عصاره متانولی گیاه چربش در غلظت ۱۰ mg/paper بر رشد مسیلیومی قارچ *Rhizoctonia solani*

(A) شاهد، (MS) عصاره متانولی بذر، (ES) عصاره اتانولی بذر، (WS) عصاره آبی بذر





با علم به اینکه حلال های مختلف می توانند مقادیر و انواع متفاوتی از متابولیت های موجود در گیاه را استخراج کنند، تکرار آزمایش های انجام شده در این تحقیق با استفاده از حلال های دیگر توصیه می گردد. تشخیص دقیق ساختار شیمیایی و میزان بازدارندگی متابولیت های استخراج شده در تحقیق حاضر در دست بررسی می باشد.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه مشاهده گردید که عصاره غلاف آبی چریش *Azadirachta indica* نسبت به حلال های متانولی و اتانولی و همچنین قسمت های برگ و بذر چریش بر روی رشد قارچ بیماریگر *Rhizoctonia solani* تاثیر منفی گذاشت.

منابع

- جعفری م. و توحیدفر م. (۱۳۸۵). گیاهان تراریخته **Bt**. ایمنی، مزیت ها و اثرات بالقوه در کنترل حشرات آفت. دانشگاه رازی - کرمانشاه. مجموعه مقالات اولین همایش بیوتکنولوژی کشاورزی. صفحات ۳۳ تا ۴۵.
- صارمی، ح. (۱۳۸۴). فوزاریوم، اکولوژی و تاکسونومی. انتشارات جهاد دانشگاهی مشهد. ۱۵۳ صفحه.
- 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 bicolor* against *Fusarium solani*, *Fusarium poa*, in Persian). *Medical Plant*, 6, 1.
- Bahraminejad, S., Asenntorfer, R. E., Riley, I. T., Zwer, P., Schultz, C. J. and Schmidt, O. 2008. Genetic variation of flavonoid defense compound concentration in oat (*Avena sativa* L.) entries and testing of their biological activity. *Australasian Plant Breeding Conference*, Christchurch, New Zealand 18-21. pp. 1127-1132
- Meliss T.G.S, S. M Simas, Terezinha GFM, Cardarelli P, Therezinha B. and Tomassini C.B. 2005. Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Mem inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 100(7): 779-782.
- Moosavy MH, Basti AA, Misaghi A, Salehi TZ, Abassfar R, Mousavi HAE, Alipoour M, Razavi NE, Gandomi H and Noori N. 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food modes system and on the bacterial cell membranes. *Food Research International* 41: 1050-1057.
- Nayeemulla S., 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*, vol.5, No.10: 16.



Effects of antifungal Crude extracts of plant *Azadirachta indica* against the pathogen *Rhizoctonia solani*

Nima Khaledi^{1*}, Jamileh Irandegani¹, Mina Hosseini haji abdal¹ and Mobina hadinezhad zarrinabadi¹

1-M.Sc. Student of Plant pathology, Department of Entomolgy and Plant pathology, Aboureyhan Campus, University of Tehran, Tehran, Iran

Email : nkhaledi@ut.ac.ir

Abstract

In this study the antifungal activity of extracts of plant *Azadirachta indica* (Neem) was studied. For this purpose, using the solvents Water, Methanol and Etanol of organs of plant extract and its antifungal effect on the pathogen *Rhizoctonia solani* was investigated. Evaluate the antifungal effects of plant extracts in the laboratory and was based on a paper disk with a concentration of 5, 10 , 15 and 20 mg/paper was done. The results showed that the deterrent effect of extracts of these plant (fungistatic) on fungal growth are discussed.

Key words: Paper discs, fungistatic, plant extracts, *Azadirachta indica*, *Rhizoctonia solani*