



بررسی مکانیسم سمیت عصاره آویشن شیرازی *Zataria multiflora* بر رشد قارچ

Alternaria alternata

اسماعیل محمودی^{۱*}، احمدرضا احمدی^۱، داود نادری^۲

۱- گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، اصفهان، ایران؛ ۲- گروه علوم باغبانی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوراسگان، اصفهان، ایران

* e.mahmoudi@khuisf.ac.ir

چکیده

آویشن شیرازی با نام علمی *Zataria multiflora* از گیاهان مهم دارویی ایران است. در این پژوهش تاثیر عصاره آویشن شیرازی بر خصوصیات مورفولوژیک قارچ *Alternaria alternata* در شرایط آزمایشگاهی در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام مورد بررسی قرار گرفت. خاصیت قارچ کشی عصاره با دو روش ترکیبات فرار (VA) و غذای مسموم (PF) بررسی شد که به ترتیب در غلظت های ۲۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام عصاره گیاهی در دو روش به طور کامل از رشد قارچ جلوگیری شد. همچنین غلظت های ۱۰۰ و ۳۰۰ پی پی ام به ترتیب در دو روش VA و PF باعث بازدارندگی ۶۵ درصدی رشد قارچ شدند. عصاره آویشن شیرازی در غلظت های ۵۰۰ و ۳۰۰ پی پی ام در دو روش PF و VA دارای خاصیت قارچ کشی و بقیه غلظت ها خاصیت قارچ ایستایی نشان داد. در آزمون تندش کنیدی ها، غلظت ۵۰۰ پی پی ام به طور کامل از جوانه زنی دیکتیوسپورها در محیط کشت مایع جلوگیری کرد.

کلمات کلیدی: آویشن شیرازی، *Zataria multiflora*، *Alternaria alternata*، عصاره گیاهی

مقدمه

از آنجا که گیاهان دارویی در دنیا جهت تغذیه و درمان بیماریها بسیار مؤثر و از اهمیت خاصی برخوردار می باشند، شناسایی و کاربرد آنها به خصوص گونه های بومی کشور، مورد توجه محققان و پژوهشگران این رشته قرار گرفته است. کشور ما غنی از این گونه های مهم دارویی می باشد که می توانیم از آنها برای مبارزه با بیماریهای گیاهی و ضد عفونی کردن محصولات کشاورزی بخصوص محصولات انباری، در برابر آفات و بیماریها استفاده کنیم. گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss) یکی از گیاهان تیره نعناع و بومی نواحی مرکزی و جنوبی ایران می باشد. از خواص بسیار مهم این گیاه، اثرات ضد میکربی آن است که مطالعات متعددی بر روی آن صورت گرفته است. بیشتر این مطالعات علیه باکتری های بیماریزا و مخصوصا عوامل بیماریزای انسانی انجام گرفته است (تری پاتی و همکاران، ۲۰۰۹).

در ایران استفاده از عصاره های گیاهان برای کنترل بیماریهای گیاهی و تحقیقات از این نوع در سطح محدودی انجام گرفته که بیشتر آنها فقط به منظور تعیین خاصیت ضد میکروبی این گیاهان بوده است. ترکیبات ضد میکروبی بخصوص قارچکش با مکانیسم های مختلفی مانع از رشد قارچها می شوند که از مهمترین این مکانیسم ها می توان به تاثیر بر انتهای میسلوم و ایجاد بدشکلی در آن، بازداری از تندش اسپور، تاثیر بر بیوشیمی سلول و بازداری موقت رشد قارچ اشاره کرد (یحیی زاده و همکاران، ۲۰۰۸). لذا آشنایی با مکانیسم اثر مواد ضد میکروبی بخصوص عصاره های گیاهی بهتر می توان از آنها استفاده کرد. در این پژوهش



۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

تاثیر عصاره ی آویشن شیرازی بر تغییرات مورفولوژیک قارچ *Alternaria alternata* از عوامل مهم پوسیدگی میوه و سبزیجات مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

بررسی خاصیت ضد قارچی عصاره ی آویشن شیرازی

برای تهیه عصاره ی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، ۴ کیلوگرم از اندام های هوایی گیاه شامل برگ، گل و ساقه ها تهیه و بعد از خشک کردن و آسیاب کردن، عصاره آنها با روش کلونجر و با استفاده از اتانول ۸۰ درصد استخراج گردید.

برای بررسی خاصیت ضد قارچی عصاره ی گیاهی از روش غذای سمی (Poisoned Food) و برای ترکیبات فرار عصاره از روش پتری دیش های وارونه استفاده شد. در این روش غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام (ppm) از عصاره ی گیاهی به محیط کشت استریل PDA درون پتری دیش اضافه شد. سپس یک دیسک به ابعاد ۵ میلی متر از محیط کشت همراه با میسلیوم های ۱۰ روزه قارچ در یک طرف پتری دیشها گذاشته و به مدت ۷ روز در دمای 25 ± 1 درجه ی سانتیگراد در انکوباتور قرار گرفتند. برای پتری های وارونه، درون یک پتری دیش استریل یک تکه پارچه ی ململ استریل آغشته به عصاره های گیاهی قرار داده و روی پتری دیش حاوی دیسک قارچ قرار داده شد. دهانه دو پتری دیش را روی هم قرار گرفت و بوسیله پارافیلیم کیپ شدند تا هیچ گونه جریان هوایی به درون پتری های وارونه ایجاد نشود. برای نمونه ی شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. سمیت قارچی که عبارت است از درصد بازدارندگی رشد میسلیوم های قارچ توسط عصاره ی گیاهی با فرمول زیر تعیین شد.

متوسط قطر کلونی در نمونه بیمار = dt ، متوسط قطر کلونی در شاهد = dc ، $100 \times ((dc-dt)/dc) =$ درصد بازدارندگی رشد میسلیوم قارچ

آزمون تندش اسپورها

برای بررسی تاثیر عصاره ی آویشن بر جوانه زدن اسپورهای قارچ آلترناریا، غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام عصاره در ۵ میلی لیتر محیط PDB درون لوله های شیشه ای ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرو لیتر از سوسپانسیون 10^6 اسپور در میلی لیتر قارچ به این محیط کشت اضافه و لوله ها به مدت ۲۰ ساعت در انکوباسیون شیکردار با دوره چرخشی ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. بعد از این مدت مقداری از محیط حاوی اسپور را روی لام قرار داده و با لاکتوفنول-کاتن بلو آن را فیکس گردید. با مشاهده لام ها زیر میکروسکوپ نوری درصد جوانه زنی اسپورها با شمارش جوانه زنی ۱۰۰ کنیدی محاسبه شد.

تعیین نوع سمیت عصاره ی *Zataria multiflora*

خاصیت قارچ کشی و قارچ ایستایی (Fungistatic/fungicidal) عصاره های گیاهی روی قارچ *A. alternata* بصورت زیر تعیین شد. ابتدا غلظت های مختلف عصاره (۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام) به محیط کشت PDA اضافه و سپس یک دیسک ۵ میلی متری از کشت ۱۰ روزه قارچ داخل پتری های حاوی عصاره گذاشته شد. سپس این پتری ها در دمای 25 ± 1 به مدت ۷ روز انکوباسیون گردید. بعد از طی دوره انکوباسیون، پتری دیش هایی که در آن قارچ اصلا رشد نکرده بود انتخاب و تکه قارچ اضافه شده به آن از روی محیط برداشته و به یک محیط حاوی PDA جدید که فاقد عصاره بود منتقل گردید و به مدت ۷ روز در دمای 25 ± 1 انکوباسیون شدند. بعد از این مدت، رشد مجدد قارچ نشانه ی خاصیت قارچ ایستایی عصاره ها و عدم رشد قارچ نشانه ی خاصیت قارچ کشی عصاره می باشد.

نتایج و بحث

در تعیین خاصیت قارچ کشی و بازدارندگی رشد عصاره ی آویشن شیرازی بر اساس درصد بازدارندگی رشد میسلیم ها از دو روش غذای مسموم و متابولیت های فرار اندازه گیری شد. در روش غذای مسموم، غلظت ۵۰۰ppm از عصاره های آویشن شیرازی به طور کامل از رشد قارچ در محیط کشت بعد از ۷ روز جلوگیری کرد. در غلظت های ۳۰۰ppm و ۲۰۰ppm از عصاره، رشد کلونی قارچ به طور معنی داری کاهش نشان داد. اما غلظت ۱۰۰ ppm بازدارندگی زیادی در مقایسه با شاهد (صفر ppm عصاره) بر رشد میسلیم های *A. alternata* نداشت (جدول ۱). اثر غلظت ۵۰۰ppm از عصاره های آویشن شیرازی بر میسلیم های قارچ آلترناریا به صورت قارچ کشی (Fungicidal) تعیین شد به نحوی که بعد از انتقال میسلیم های تیمار شده با این غلظت از عصاره به محیط کشت جدید عاری از عصاره، هیچ گونه رشد میسلیم مشاهده نشد. سایر غلظت های عصاره ی گیاهی با توانایی های مختلف خاصیت قارچ ایستایی (Fungistatic) نشان دادند. به عبارت دیگر در غلظت های پایین، عصاره با خاصیت قارچ ایستایی مانع از رشد میسلیم های آلترناریا می شود (جدول ۱).

نتایج آزمون متابولیت های فرار نشان می دهد که در غلظت های ۲۰۰ppm، ۳۰۰ppm و ۵۰۰ppm عصاره ی گیاهی، به طور کامل از رشد قارچ *A. alternata* در محیط کشت مصنوعی جلوگیری شد. همانطور که در جدول ۱ مشاهده می شود فعالیت متابولیت های فرار موجود در عصاره ی گیاهی بسیار قوی تر از ترکیبات مایع این گیاه است و در غلظت های پایین بازدارندگی شدیدتری نسبت به روش غذای مسموم روی قارچ هدف نشان می دهند. مکانیسم سمیت در این روش برا غلظت های ۳۰۰ppm و ۵۰۰ppm قارچ کشی و برای ۲۰۰ppm قارچ ایستایی تعیین شد. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) برای عصاره ی آویشن شیرازی در دو روش غذای مسموم و متابولیت های فرار به ترتیب ۵۰۰ppm و ۲۰۰ppm بدست آمد (جدول ۱). این غلظت ها پایین تر از سایر غلظت های گزارش شده در مطالعات قبلی است (گندمی و همکاران، ۲۰۰۹).

جدول ۴-۲- تاثیر عصاره آویشن شیرازی بر بازدارندگی رشد، نوع سمیت و درصد جوانه زنی اسپورهای قارچ *Alternaria alternata* در شرایط *In vitro*

غلظت عصاره گیاهی (ppm)	درصد بازدارندگی رشد عصاره (PF)	نوع سمیت عصاره (PF)	درصد بازدارندگی متابولیت های فرار	نوع سمیت متابولیت های فرار	درصد جوانه زنی اسپورها
شاهد (صفر ppm)	-	-	-	-	۱۰۰
۱۰۰	۳۷/۵	ND	۷۳/۶	ND	۶۸/۶
۲۰۰	۶۳	(S) ۵۹/۳۱	۱۰۰	(S) ۸۹/۴	۳۷
۳۰۰	۸۷/۷	(S) ۸۷/۶۳	۱۰۰	(C) ۱۰۰	۹/۸
۵۰۰	۱۰۰	(C) ۱۰۰	۱۰۰	(C) ۱۰۰	۰/۰

آزمایش دو با و هر بار در ۴ تکرار انجام شد و اعداد حاصل میانگین تکرارها می باشند

PF: روش سمیت غذایی یا Poisoned food؛ S: عصاره دارای خاصیت قارچ ایستایی است؛ C: عصاره دارای خاصیت قارچ کشی است؛ ND: تعیین نشد.

نتایج مربوط به آزمایش جوانه زنی کنیدی های *A. alternata* در حضور عصاره ی آویشن بیانگر خاصیت Genstatic یا ممانعت از تندش عصاره این گیاه می باشد. غلظت ۵۰۰ppm به طور کامل و غلظت های ۳۰۰ppm و ۲۰۰ ppm با درصد بالا از جوانه زنی



۱۱ و ۱۲ اسفندماه ۱۳۹۰ دانشگاه آزاد اسلامی خوراسگان دانشکده کشاورزی

کنیدی های قارچ *A. alternata* جلوگیری کردند (جدول ۱). ماهانتا و همکاران (۲۰۰۷) بیان کردند که تاثیر عصاره *Cymbopogon citrates* بر اسپورزایی ممکن است نتیجه ای از اثرات متابولیت های فرار باشد که در سطح میسلیم های در حال رشد آزاد می شود. از آنجا که در این پژوهش مشخص شد که متابولیت های فرار عصاره آویشن شیرازی خاصیت ضد قارچی خیلی قوی دارند لذا برای درک بهتر تاثیر عصاره بر اسپورزایی باید این مطالعات بر اساس تغییر فاز رویشی به زایشی در قارچ ها بررسی شود.

نتیجه گیری کلی

همان طور که در این مطالعه نشان داده شد آویشن شیرازی به عنوان نمونه ای از این گیاهان دارویی مفید، دارای خواص ضد میکروبی با مکانیسم های متنوع و خواص فومیگانتی قوی است که می توان از آن برای ضد عفونی میوه ها و مواد غذایی قبل از انبارداری و حمل و نقل استفاده کرد.

منابع

- Gandomi H, Misaghi A, Akhondzadeh A, Bokaei S, Khosravi A, Abbasifar A, Jebelli A. 2009. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on growth and aflatoxin formation by *Aspergillus flavus* in culture media and cheese. Food and Chemical Toxicology, 47: 2397-2400.
- Mahanta JJ, Chutia M, Bordoloi M, Pathak MG, Adhikary RK, Sarma TC. 2007. *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. spawns. Flavour and Fragrance Journal, 22: 525-530.
- Tripathi A, Sharma N, Sharma V. 2009. In vitro efficacy of *Hyptis suaveolens* L. (Poit.) essential oil on growth and morphogenesis of *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Massey) Snyder & Hansen. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 25: 503-512.
- Yahyazadeh M, Omidbaigi R, Zare R, Taheri H. 2008. Effect of some essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 24:1445-1450.

The study of toxicity effect of *Zataria multiflora* Boiss essential oil on the growth of *Alternaria alternata*

Esmaeil Mahmoudi^{1*}, Ahmadreza Ahmadi¹, Davood Naderi²

1-Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Khorasgan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

2-Department of Horticulture, Faculty of Agriculture, Khorasgan Branch, Islamic Azad University, Isfahan, Iran

* e.mahmoudi@khuif.ac.ir

Abstract

Zataria multiflora Boiss known as Shiraz Oregano (in Iran) is one of the valuable Iranian medicinal plants. In this study, *Z. multiflora* essential oil was tested *in vitro* on the growth and



morphogenesis of *Alternaria alternata* Kessl. at 100, 200, 300 and 500 ppm concentrations. The fungitoxicity of the oil was measured by percentage radial growth inhibition using the poisoned food technique (PF) and volatile activity assay (VA). The mycelial growth of the test fungus was completely inhibited at 500 and 200 ppm concentration of oil in PF and VA, respectively. The sublethal doses, 300 and 100 ppm inhibited about 65% of fungal growth after seven days of incubation and delayed conidiation as compared with the control. The essential oil was shown fungicidal activity at 500 and 300 ppm concentrations in PF and VA, respectively. Determination of conidial germination in the presence of oil was also carried out and it was found that the oil exhibited 100% inhibition of conidial germination at 500 ppm concentration.

Key Words: *Alternaria alternata*, essential oil, Shiraz oregano, *Zataria multiflora*