



تاثیر عصاره گیاه آویشن شیرازی *Zataria multiflora* بر خصوصیات مورفولوژیک 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

در این پژوهش تاثیر عصاره آویشن شیرازی *Zataria multiflora* بر رشد و تغییرات مورفولوژیک قارچ *Alternaria alternata* در شرایط *In vitro* و در غلظت های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام مورد بررسی قرار گرفت. در آزمون وزن خشک میسلیمومها، اضافه کردن ۳۰۰ ppm از عصاره های گیاهی به محیط کشت باعث کاهش شدید (بیش از ۷۵ درصد) در وزن خشک میسلیموم های قارچ هدف شد. در حضور ۵۰۰ ppm از عصاره گیاهی، قارچ *A. alternata* هیچ گونه میسلیمومی در محیط مایع تولید نکرد. مشاهدات میکروسکوپ نوری تغییرات مورفولوژیک زیادی را در میسلیموم های *A. alternata* در حضور ۳۰۰ ppm عصاره آویشن شیرازی نشان دادند. این تغییرات به صورت کاهش شدید اسپورزایی، چروکیدگی و کاهش قطر میسلیمومها، گرانوله شدن سیتوپلاسم، لویدار شدن و وزیکوله شدن انتهای میسلیموم و تغییر در ضخامت دیواره سلولی مشاهده شد.

کلمات کلیدی: آویشن شیرازی، تغییرات مورفولوژیک، عصاره های گیاهی، *Alternaria alternata*

مقدمه

گوجه فرنگی از محصولات مهم جالیزی دنیا می باشد و به خاطر داشتن ویتامینها و ترکیبات غذایی متنوع، نقش مهمی در سبذ غذایی خانواده ها دارد. یکی از مهمترین بیماریهای پس از برداشت گوجه فرنگی که موجب پوسیدگی میوه های انباری می شود بیماری آلترناریایی گوجه فرنگی است که بوسیله قارچ *Alternaria alternata* ایجاد می شود. یکی از روش های رایج برای کنترل بیماری های پس از برداشت استفاده از مواد شیمیایی به خصوص قارچکش ها می باشد. هرچند که این مواد تا حدودی می توانند از وقوع و پیشرفت بیماری جلوگیری کنند اما باقیمانده های این سموم روی میوه ها می تواند برای سلامت انسان مضر باشد (رسولی و همکاران، ۲۰۰۶). گیاهان عالی حاوی طیف وسیعی از متابولیت های ثانویه مانند فنلها، فلونوئیدها، کوئینولینها، تاننها، عصاره های روغنی، آلکالوئیدها، ساپونین ها و استرولها هستند. کاربرد عصاره گیاهان دارویی یک روش موثر در کنترل عوامل بیماری زا می باشد. این مواد دارای خاصیت های ضد میکروبی متنوعی هستند و برای انسان و محیط زیست نیز سمیت ندارند. یکی دیگر از ویژگی های مهم عصاره های گیاهی این است که به خاطر تنوع مواد موجود بر آنها احتمال پیدایش نژاد مقاوم از عامل بیماری

نسبت به آنها بسیار کم است (کارمو و همکاران، ۲۰۰۸). بنابراین کاربرد این مواد بر روی میوه ها و سبزیجات در کنترل عوامل بیماریزای آنها به خصوص پاتوژنهای قارچی بسیار موثر است و می تواند جایگزین مناسبی برای سموم و مواد شیمیایی باشند. آویشن شیرازی از مهمترین و معروف ترین گیاهان دارویی بومی ایران است. این گیاه دارای متابولیت های متنوعی هستند که هر کدام اثرات دارویی متفاوتی دارند. عصاره این گیاه بیشتر از تیمول و کارواکرول تشکیل شده و خواص ضد قارچی قوی دارد. یکی از مکانیسم های بازدارندگی رشد عصاره های گیاهی تاثیر آنها بر خصوصیات مورفولوژیک قارچ های هدف می باشد. در این پژوهش اثرات عصاره های آویشن شیرازی و مورفولوژی میسلیوم های قارچ *Alternaria alternata* و بیماریزایی آن روی میوه های گوجه فرنگی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

تعیین تاثیر عصاره های گیاهی بر وزن خشک بیومس قارچ

برای تهیه عصاره های 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 تعیین تاثیر عصاره های گیاهی بر وزن خشک قارچ، غلظت های مختلفی از این عصاره (۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام) را در محیط کشت مایع سیب زمینی - دکستروز - بروس یا PDB درون ارلن مایر اضافه شد. سپس ۵ میلی لیتر از سوسپانسیون اسپور قارچ به غلظت 10^6 (اسپور در میلی لیتر) از قارچ *Alternaria alternata* به محیط کشت درون ارلن ها اضافه گردید. برای هر غلظت چهار تکرار در نظر گرفته شد. ۱۵ روز بعد از انکوباسیون در دمای 25 ± 1 °C در انکوباتور شیکردار، محیط کشت از کاغذ صافی عبور داده شد و میسلیوم های قارچ استخراج و به مدت ۲۴ ساعت در آن در دمای 40 ± 1 °C قرار داده شدند. سپس وزن خشک میسلیوم ها با ترازو اندازه گیری شد و درصد بازدارندگی رشد (کاهش وزن خشک نسبت به شاهد) با فرمول زیر تعیین گردید.

$$100 \times \left[\frac{\text{وزن نمونه شاهد}}{\text{وزن نمونه بیمار}} - 1 \right] = \text{درصد وزن خشک}$$

تغییرات میکروسکوپیکی میسلیوم های *A. alternata* در حضور عصاره های آویشن شیرازی

بمنظور تعیین مکانیسم قارچ کشی عصاره آویشن شیرازی بر قارچ *A. alternata*، دو غلظت ۳۰۰ و ۵۰۰ پی پی ام عصاره به محیط کشت PDA اضافه شد. سپس یک دیسک با ابعاد ۵ میلی متر از کشت ۵ روزه قارچ روی این پتری دیش ها قرار داده شد و در دمای 25 ± 1 °C درجه سانتی گراد به مدت ۴ روز انکوباسیون گردید. بعد از این مدت، از میسلیوم های انتهای کلونی قارچ اسلاید میکروسکوپی و بعد از فیکس کردن آنها با لاکتوفنول-کاتن بلو، زیر میکروسکوپ نوری مشاهده شدند و تغییرات مورفولوژیکی که در میسلیوم های قارچ ایجاد شده بررسی شد. برای مقایسه ی این تغییرات با شکل طبیعی میسلیوم ها، از قارچ رشد کرده در محیط PDA استفاده گردید.

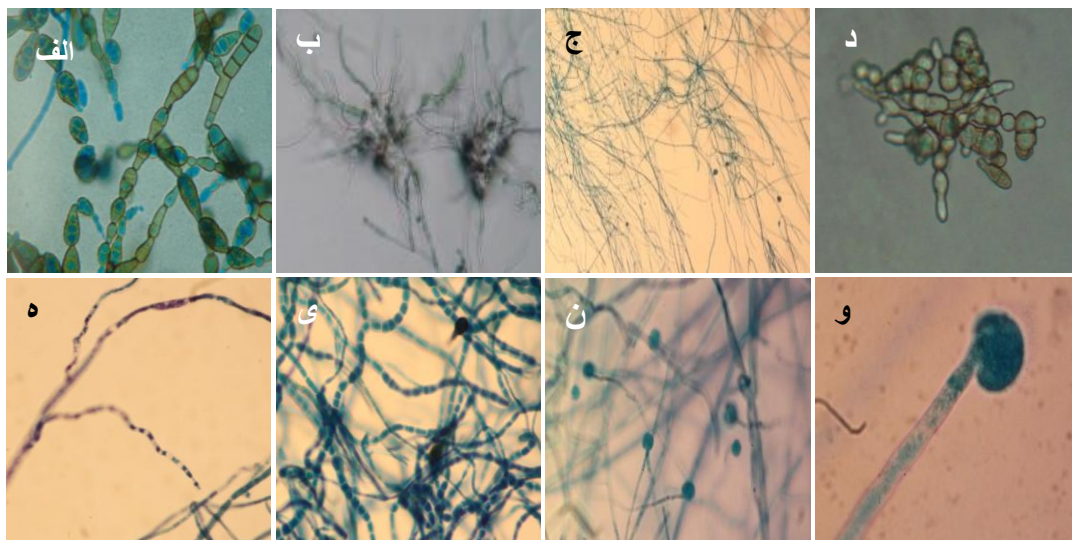
نتایج

در آزمون تاثیر عصاره ی آویشن شیرازی بر وزن خشک میسلیموم های قارچ آلترناریا، اضافه کردن ۳۰۰ ppm از عصاره های گیاهی به محیط کشت باعث کاهش شدید در وزن خشک میسلیموم های قارچ هدف شد (جدول ۱). در حضور ۵۰۰ ppm از عصاره آویشن شیرازی، قارچ مورد بررسی هیچ گونه میسلیمومی در محیط مایع تولید نکرد. در حقیقت این غلظت به طور کامل از رشد میسلیموم های قارچ جلوگیری کرد.

مشاهده میسلیموم های *A. alternata* تیمار شده با غلظت های مختلف عصاره ی آویشن شیرازی توسط میکروسکوپ نوری نشان می دهد که عصاره ی آویشن باعث تغییرات مورفولوژیک قابل مشاهده در میسلیموم ها و اسپوره های قارچ ها می شوند.

جدول ۱- اثر غلظت های مختلف عصاره *Zataria multiflora* روی وزن خشک *Alternaria alternata*

غلظت های عصاره (ppm)	وزن خشک (میلی گرم + SE)	درصد بازدارندگی رشد بر اساس وزن خشک
شاهد (صفر ppm)	۲/۳ ± ۲۸۷/۷۱	-
۱۰۰	۱/۲ ± ۱۶۲/۴۶	۴۴/۳۴
۲۰۰	۱/۹۸ ± ۱۰۸/۰۷	۶۲/۴۴
۳۰۰	۱/۰۱ ± ۷۲/۳۳	۷۴/۸۷
۵۰۰	۰۰/۰۰	۱۰۰/۰۰



شکل ۱- تصاویر میکروسکوپی رشد میسلیموم های قارچ *Alternaria alternata* در حضور غلظت ۳۰۰ ppm عصاره آویشن شیرازی بعد از هفت روز انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد. (الف و ب): کنیدی زایی و جوانه زنی کنیدی های قارچ *A. alternata*، کنیدی ها و کنیدی زایی نرمال و کنیدی ها دارای لوله تندش طبیعی؛ غلظت ۳۰۰ ppm از عصاره باعث ایجاد بدشکلی در میسلیموم ها، کاهش قطر میسلیموم، جلوگیری از کنیدی زایی (د)، ممانعت از تندش کنیدی (ج)، چین خوردگی، متراکم شدن و گرانوله شدن سیتوپلاسم و جدا شدن سیتوپلاسم از دیواره سلولی (ه)، افزایش شدید کلامیدوکنیدی در میسلیموم های قارچ (ی)، پیدایش ساختارهای متورم و بدشکلی انتهای میسلیموم (ن، و) می شود.



مطالعات میکروسکوپی نشان می دهد که در غلظت صفر ppm از عصاره (تیمار شاهد)، رشد میسلیم ها طبیعی و به صورت یکدست، دارای سیتوپلاسم مشخص، کنیدی زایی و جوانه زنی طبیعی دارند (شکل ۱). تیمار کردن قارچ با ۳۰۰ ppm از عصاره گیاهی باعث کاهش شدید کنیدی زایی و جوانه زنی کنیدی های آلترناریا شده است. همچنین کنیدی های جوانه زده لوله تندش کوتاه تری نسبت به شاهد داشتند. سایر تغییرات به صورت کاهش قطر میسلیم، چروکیدگی و بدشکلی شدید میسلیم ها، پیدایش ذرات گرانولی در سیتوپلاسم، جدا شدن سیتوپلاسم از دیواره سلولی میسلیم، افزایش زیاد کلامیدوکنیدی ها پیدایش ساختارهای وزیکولی و متورم در انتهای میسلیم مشاهده شد (شکل ۱). گزارشات مختلفی در مورد اثرات عصاره های گیاهی بر متابولیسم سلول های قارچی و نهایتاً تغییرات آنزیمی و ساختاری در آنها انجام شده است (تری پاتی و همکاران، ۲۰۰۹). بر اساس اطلاعات ما تاکنون گزارشی مبنی بر اثرات عصاره های گیاهی بخصوص آویشن شیرازی بر خصوصیات رشدی *A. alternata* به ثبت نرسیده است و این اولین گزارش از اثرات تخریبی عصاره آویشن بر ساختمان این بیمارگر گیاهی می باشد. البته مطالعات مشابهی روی قارچ های *Fusarium oxysporum* و *Aspergillus flavus* انجام شده است که مکانسیم اثر گیاهان مورد استفاده روی این قارچ ها متفاوت از مکانسیم اثر آویشن شیرازی بوده است (موریرا و همکاران، ۲۰۱۰).

نتیجه گیری کلی

عصاره های گیاهی همانند آویشن شیرازی باعث ممانعت از فعالیت آنزیم های سلول های قارچ *A. alternata* شوند که این امر منجر به تخریب دیواره سلول، تخریب سیتوپلاسم و ارگانل های سلولی و در نهایت مرگ میسلیم ها و ممانعت رشد قارچ می شوند.

منابع

- Carmo ES, Lima EO, De Souza EL, De Sousa FB, 2008. Effect of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39: 91-97.
- Moreira ACP, Oliviera MJ, Wanderley PA, Carmo ES, De Souza EL. 2010. chemical composition and antifungal activity of *Hyptis Sualveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 41: 28-33.
- Rasooli I, Rezaei MB, Allameh, A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*, 17: 359-364.
- 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.

The Effects of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil on the morphogenesis of *Alternaria alternata*

Esmail 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@khuisf.ac.ir

Abstract

The present study aimed to evaluate the effects of essential oil of three Iranian medicinal plants, *Zataria multiflora* different concentrations (0, 100, 200, 300 and 500 ppm) on the growth and morphogenesis of *Alternaria alternata* Keissl in *in vitro* condition. The effect of essential oil on the yield of mycelial weight was observed and it was found that at 500 ppm concentration no mycelium was recorded and 100% inhibition was observed. Microscopic observations using Light Microscope (LM) showed morphogenic changes in the test fungus with 300 ppm of the *Z. multiflora* oil. These changes included a significant decrease and loss of conidiation, severe collapsed and squashed hyphae, a decreased hyphal diameter and granulation of cytoplasm. The treatment with the oil also resulted in a highly lobate and bulbous anomalous structure on the hyphal tips. Findings of the current study suggest that essential oils could be used as an alternative for chemicals for control of phytopathogenic fungi.

Keywords: *Alternaria alternata*, Essential oil, Morphogenesis change, Shiraz oregano, *Zataria multiflora*