

## فعالیت ضد قارچی اسانس زیره سبز و رزماری در گندم آلوده به قارچ *Bipolaris sorokiniana*

نیر محمدخانی<sup>۱\*</sup>، علی یکتا<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۹۷/۷/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۲/۶

۱- استادیار مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه و بنیاد ملی نخبگان

۲- فارغ التحصیل کارشناسی گیاهان دارویی، مرکز آموزش عالی شهید باکری میاندوآب، دانشگاه ارومیه

\* مسئول مکاتبه: Email: n.mohammadkhani@urmia.ac.ir

### چکیده

پوسیدگی معمول ریشه ناشی از قارچ *Bipolaris sorokiniana* یکی از مهم‌ترین بیماری‌های گندم می‌باشد که با توجه به خاک زی‌بودن این بیماری، به وسیله کنترل شیمیایی به راحتی خنثی نمی‌شود. در این تحقیق اثر اسانس زیره سبز، رزماری و اسانس ترکیبی این دو گیاه بر رشد گندم تحت تنش بیماری القا شده با قارچ *Bipolaris sorokiniana* مطالعه شد. اسانس بسیاری از گیاهان دارای اثرات ضد قارچی هستند. جهت استحصال اسانس از روش تقطیر با آب توسط کلونجر استفاده شد و پس از به دست آوردن اسانس، جداسازی ترکیبات توسط کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی (GC-MS) نشان داد که بیشترین ماده تشکیل دهنده اسانس زیره 3-Caren-10-al (% ۲۷/۱۳)، برای رزماری 1R-à-Pinene (% ۱۴/۸۲) و همچنین 3-Caren-10-al (% ۱۲) بیشترین ماده تشکیل دهنده اسانس زیره و رزماری در ترکیب باهم می‌باشد. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که اسانس ترکیبی زیره سبز و رزماری بیشترین تأثیر را در جلوگیری از کاهش طول ریشه، وزن خشک ریشه، سطح برگ و کاهش رشد قارچ داشت. البته اسانس زیره سبز اثر معنی‌داری در حفظ وزن تر و خشک شاخساره و همچنین محتوای آب نسبی برگ تحت تنش بیماری داشت. همبستگی مثبت معنی‌داری ( $P < 0.05$ ) بین فاکتورهای رشدی مختلف مشاهده شد.

واژه‌های کلیدی: اسانس، بیماری، ضد قارچ، رزماری، قارچ *Bipolaris sorokiniana* گندم

## Antifungal Activity of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* Essential Oils on wheat infected by *Bipolaris sorokiniana*

Nayer Mohammadkhani<sup>1\*</sup>, Ali Yekta<sup>2</sup>

Received: October 18, 2018 Accepted: February 25, 2019

1-Assis. Prof., Shahid Bakeri High Education Center of Miandoab, Urmia University, and National Elites Foundation, Iran.

2-Graduated BSc Student, Shahid Bakeri High Education Center of Miandoab, Urmia University, Iran.

\*Corresponding Author: n.mohammadkhani@urmia.ac.ir

### Abstract

Common root rot, induced by *Bipolaris sorokiniana* fungi is one of the most important diseases in wheat, which due to terrestrial of this disease, is not easily neutralized by the chemical control. In this study the effects of cumin, rosemary and combined essential oil of both plants on growth of wheat plant under disease stress induced by *Bipolaris sorokiniana* was evaluated. Essential oil extraction was performed by hydro distillation method with Clevenger. After obtaining essential oil, the compounds were separated by mass spectrometry – chromatography (GC-MS), which the major component of the essential oil of cumin was 3-carene-10-al (13.27%), for rosemary was 1R- $\alpha$ -Pinene (14.82%), as well as 3-carene-10-al (12%) was the major essential oil of combine with each other. The results of present study showed that the combined essential oil of cumin and rosemary had the highest effect in prevention of decrease in root length, root dry weight, leaf area and decrease in fungal growth. However, essential oil of cumin had a significant effect in protection of shoot dry weight as well as relative water content (RWC) of leaves under disease stress. There was a significant positive correlation ( $P < 0.05$ ) between studied growth parameters.

**Keywords:** Antifungi, Disease, Essential Oil, *Bipolaris sorokiniana*, Rosmary, Wheat

### مقدمه

با وجود اهمیت اقتصادی و نیاز تغذیه‌ای زیاد جمعیت در حال رشد جهان به غلات، گندم و جو به عنوان یکی از منابع اصلی تامین انرژی، کاهش خسارت ایجاد شده توسط بیمارگرهای گیاهی در تولید این محصولات زراعی به افزایش بازده تولید منجر می‌شود (بوکوس و همکاران ۲۰۱۰). با ازدیاد جمعیت، نیاز غذایی بشر افزایش می‌یابد و با توجه به محدودیت سطح زیر کشت، افزایش عملکرد محصول در واحد سطح ضروری

می‌باشد. یکی از عوامل کاهش عملکرد محصول آفات و بیماری‌ها می‌باشند که در این میان بیماری‌های قارچی از اهمیت خاصی برخوردارند. بیماری پوسیدگی معمولی ریشه ناشی از (*Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoemaker از جمله بیماری‌های مهم گندم و جو می‌باشد (بوکوس و همکاران ۲۰۱۰). کنترل شیمیایی بیماری‌هایی که توسط قارچ‌های خاکزی از جمله بیماری پوسیدگی معمولی ریشه ایجاد می‌شود مشکل و گاهی بی‌تاثیر است، از سوی دیگر کنترل شیمیایی مستلزم هزینه

سوختگی با شدت بالا و بصورت همه گیر در اکثر مناطق گندم مشاهده شده است. بیماری لکه سوختگی با عامل *B. sorokiniana* از جمله بیماری های پوسیدگی ریشه و طوقه گندم است و در سال های اخیر در بیشتر نقاط کشور گزارش شده است (آقه میری و همکاران ۲۰۱۴). لکه سوختگی در بسیاری از مناطق مورد کاشت گندم در جهان نیز وجود داشته و موجب کاهش محصول و عملکرد می شود. در سالهای اخیر وسعت آلودگی مزارع کشت گندم به این بیماری در جهان به حدود ۲۵ میلیون هکتار می رسد (کومار و همکاران ۲۰۰۲). این قارچ روی گندم، جو، یولاف، چاودار، برنج و تعداد زیادی از گراس ها ایجاد پوسیدگی طوقه و ریشه می کند. عامل پوسیدگی معمولی ریشه، لکه قهوه ای برگ، سوختگی خوشه و سیاه شدن دانه های گندم و جو می باشد. رطوبت نسبی و درجه حرارت بالا باعث شیوع این بیماری بخصوص در مناطق جنوب آسیا که در آنجا سیستم مترکم آبی گندم - برنج وجود دارد، می شود (کومار و همکاران ۲۰۰۲).

زیره سبز (*Cuminum cyminum* L.) یک گیاه یک ساله و گلدار از تیره چتریان (Apiaceae) می باشد که در مناطق خشک و نیمه خشک رشد می کند و کشت می شود. همچنین حدود ۶/۴۴ درصد سطح زیر کشت گیاهان دارویی کشور مربوط به دو گونه زعفران (*Crocus sativus* L.) و زیره سبز می باشد. دانه های زیره سبز از قدیم در طب سنتی ایران به عنوان داروی ضد تهوع، ضد اسپاسم و ضد آسم استفاده می شد (اسماعیلی ۲۰۱۵). فعالیت های دارویی متعددی برای زیره سبز مانند اثر پایین آورندگی قند خون، آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی، ضد قارچی، مقوی معده، افزایش ترشح شیر، مهار تجمع پلاکت خون و افزایش فعالیت استروژنی ذکر شده است. مطالعات شیمیایی بر روی زیره سبز مبین وجود اجزایی همانند کومینول، کارون، اپی ژین و لوتئولین می باشد (راموس و همکاران ۱۹۹۵).

زیاد بوده و باعث برهم خوردن تنوع میکروبی خاک و تخریب زیست محیطی می گردد (اگریوس ۲۰۰۵). در اکثر موارد به علت مشکلات زیست محیطی بازمانده های سموم، ایجاد سمیت برای انسان، ایجاد نژادهای مقاوم و در برخی موارد هزینه های بسیار بالا، مصرف این گونه ترکیبات با محدودیت مواجه است (اگریوس ۲۰۰۵). با توجه به نیاز جهانی و تقاضا برای تامین غذای کافی و به منظور کاهش مصرف سموم شیمیایی، تحقیقات گسترده ای آغاز گردیده که نشان می دهد برخی متابولیت های ثانویه گیاهان دارویی در جلوگیری از رشد قارچ ها مؤثر بوده و جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی هستند (هادیان و همکاران ۲۰۰۸).

اسانس ها مخلوطی از ترکیبات روغنی فرار بوده که به عنوان متابولیت ثانویه در گیاهان دارویی ساخته می شوند (بکالی و همکاران ۲۰۰۸). آنها با دو یا سه ترکیب اصلی در غلظت های نسبتاً بالا (۷۰-۲۰٪) در مقایسه با اجزای دیگری که در مقادیر ناچیز موجود هستند، توصیف می شوند. به طور کلی این اجزای اصلی، خواص زیستی اسانس ها را تعیین می کنند. اسانس ها یا تعدادی از اجزای سازنده آنها در واقع در مقابل وارپته های گسترده ای از میکروارگانیزم ها شامل باکتری ها، ویروس ها و قارچ ها مؤثر هستند (بکالی و همکاران ۲۰۰۸). خاصیت ضد قارچی برخی گیاهان دارویی از جمله دارچین، پونه کوهی، رزماری، مریم گلی، میخک، فلفل، ریحان، آویشن، مرزه، زیره، لیمو و نعناع در تحقیقات متعددی گزارش شده است. تفاوت در فعالیت ضد قارچی اسانس های گیاهی به اجزاء تشکیل دهنده آنها بستگی دارد. یک ترکیب ممکن است به تنهایی یا با سایر ترکیب ها فعالیت ضد قارچی اسانس را تشدید کنند (هادیان و همکاران ۲۰۰۸). گندم در ایران مهم ترین محصول راهبردی بوده که بیشترین سطح زیر کشت و میزان مصرف را به خود اختصاص داده است (آقه میری و همکاران ۲۰۱۴). طی بازدید های دو ساله از مناطق شمالی کشور بیماری لکه

### اسانس گیری

به منظور ارزیابی فعالیت ضد قارچی اسانس ها، بذر گیاه زیره سبز، برگ گیاه رزماری و ترکیب برابر زیره - رزماری توسط کلونجر (تقطیر با آب) استخراج شد. به منظور استخراج اسانس، دانه‌های زیره و برگ‌های خشک گیاه رزماری آسیاب و با استفاده از دستگاه کلونجر به مدت ۳ ساعت اسانس آن به روش تقطیر توسط آب استخراج گردید و پس از آگیری در ظرف‌های شیشه‌ای تیره در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا محلول پاشی روی گیاهان نگهداری شد.

### آزمایش‌های گلخانه‌ای

بذور سالم گندم بعد از ضدعفونی سطحی در گلدان-های پلاستیکی کاشته شد. در هر گلدان ۱۰ بذر کاشته شده و مراقبت‌های لازم تا رسیدن آن‌ها به مرحله ۲ برگی انجام شد. و عمل مایه‌زنی کنیدیوم‌های قارچ روی برگ-ها به صورت آب پاشی در مرحله‌ی ۲ برگی گیاهان گندم انجام شد. بعد از خشک شدن سطح برگ‌ها، اسانس‌های گیاهی با غلظت‌های صفر، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر به صورت آب پاش روی برگ‌ها محلول پاشی شد. سپس گیاهان مایه‌زنی شده توسط کیسه‌های پلاستیکی پوشانده شده و به مدت ۴۸ ساعت در دمای  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  درون گلخانه نگهداری شدند. کیسه‌های پلاستیکی بعد از ۴۸ ساعت از روی گیاهان برداشته شد و در دمای  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  و رطوبت نسبی بیش از ۷۵ درصد قرار گرفتند. بعد از ۱۰ روز از مایه زنی، تعداد لکه‌های بیماری روی برگ‌ها در واحد سطح ثبت شد.

### آنالیزهای رشدی

پس از برداشت گیاهان، ویژگی‌های رشدی مثل طول و وزن خشک ریشه و اندام‌هوایی در گیاهان شاهد، تحت تیمار بیماری و تحت تیمار هم‌زمان بیماری و اسانس مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین سطح برگ با نرم افزار

رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) از تیره نعناعیان (Lamiaceae) یکی از گیاهان حاوی اسانس است که در بسیاری از مناطق جهان به عنوان گیاه دارویی و زینتی پرورش داده می‌شود. رزماری در برگ‌ها و سرشاخه‌های گل‌دار خود دارای اسانس‌های فرار می‌باشد که شامل استرهایمانند بورنئول، استات، لینالول، کامفور، کامفته و سیئول همچنین شامل فلاونوئیدهایی مانند دیوسمین، اپیزین و غیره و همچنین دارای دی‌ترپن‌هایی مانند کارنوسیلیک اسید و تری‌ترپن‌هایی مثل اورسولیک اسید و اولئانیک اسید می‌باشد. در دو تحقیق متفاوت تأثیر مقادیر مختلف اسانس بر میزان رشد باکتری *Staphylococcus aureus* Rosenbach معنی‌دار بود و با افزایش غلظت اسانس میزان رشد باکتری کاهش یافت (عزیزخانی و همکاران ۲۰۱۴). با توجه به اندک بودن مطالعات انجام شده و نبود درمان قطعی برای خنثی‌سازی قارچ *B. sorokiniana* هدف از مطالعه حاضر بررسی اثر اسانس گیاهی رزماری و زیره و همچنین ترکیب رزماری - زیره در کاهش فعالیت قارچ *B. sorokiniana* می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### قارچ عامل بیماری

برای جداسازی اولیه جدایه‌های قارچ *B. sorokiniana* از محیط کشت PDA (سیب زمینی-دکستروز-آگار) و آب آگار استفاده شد. جهت تهیه سوسپانسیون اسپور، جدایه‌های *B. sorokiniana* به محیط کشت PDA و دمای  $25^{\circ}\text{C}$  و شرایط نوری متناوب (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) به مدت دو هفته منتقل شد. اسپورها با آب مقطر سترون از سطح محیط کشت شسته شده و غلظت آن‌ها در  $1 \times 10^6$  کنیدی در هر میلی‌لیتر از آب مقطر سترون با استفاده از لام هماسیتومتر تنظیم شد.

استفاده (m X 0.250 mm, 0.25 µm film thickness) شد. پروفیل دمایی به صورت زیر بود: ابتدا دما به مدت ۲ دقیقه روی 40°C تنظیم شد و سپس تا 160°C با سرعت 3°C/min افزایش یافت و در نهایت دما با سرعت 5°C/min به 280°C افزایش یافت و ۲ دقیقه در این دما ماند. گاز حامل هلیوم و سرعت جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه بود و انرژی یونیزاسیون 70ev بود. بعد از تزریق اسانس به دست آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی، با توجه به الگوی خروج آلکان های نرمال، شاخص بازداری (Retention Index) برای ترکیبات محاسبه و در نهایت مقایسه آنها با شاخص های مرجع، ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس، شناسایی شدند.

### تجزیه و تحلیل آماری

داده های بدست آمده با نرم افزار SPSS 24 مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت و آنالیز واریانس داده-ها با استفاده از ANOVA در سطح احتمال ۵٪ محاسبه شد. آنالیز مقایسات چندگانه با روش توکی ( $P < 0.05$ ) محاسبه شد.

### نتایج و بحث

در این تحقیق اثر ضد قارچی اسانس دو گیاه زیره و رزماری و اسانس ترکیبی آنها روی گیاه گندم بررسی گردید. نتایج نشان داد در گیاهان شاهد آلوده به قارچ *B. sorokiniana* که باعث پوسیدگی ریشه گیاه گندم گردید، به طور قابل توجهی وزن تر، خشک و طول ریشه کاهش یافت (شکل ۷). نعیمی و همکاران (۲۰۱۱) برای اولین بار وجود قارچ *B. sorokiniana* را روی گیاه برنج گزارش کردند و اشاره کردند که این قارچ عامل ایجاد پوسیدگی ریشه، لکه برگ، بلایت گیاهچه و سنبله می باشد. در مطالعه حاضر این قارچ به عنوان یک

Compueye (بکر ۲۰۰۵) و محتوای نسبی آب با رابطه

$$RWC = \frac{(\text{وزن خشک} - \text{وزن تر})}{(\text{وزن خشک} - \text{وزن آماس})} \times 100$$

تعیین شد.

### بررسی خواص ضد قارچی اسانس ها

اثر ضد قارچی اسانس های استخراج شده روی قارچ *B. sorokiniana* به روش اختلاط اسانس با محیط کشت بررسی شد. به این منظور برای کشت قارچ مورد نظر از محیط کشت PDA (سیب زمینی- دکستروز- آگار) استفاده شد. غلظت های شاهد، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ پی پی ام اسانس در لیتر محیط کشت، به پتری دیش های حاوی محیط کشت PDA اضافه و به هم زده شده تا امولسیون یکنواخت به وجود آید و اجازه داده شد تا محیط جامد گردد. سپس دیسک های قارچی به قطر ۵ میلی متر توسط چوب پنبه سوراخ کن که قبلا استریل شده از کشت های جوان قارچ مذکور تهیه شده و هر کدام در وسط پتری-دیش های حاوی مواد غذایی قرار داده شد. سپس پتری-دیش ها در شرایط تاریکی کامل و در دمای ۲۴ درجه ی سانتی گراد قرار داده شد. رویشی هاله هر قارچ به طور روزانه و تا زمانی که سطح محیط کشت پتری های شاهد توسط قارچ بطور کامل اشغال شود اندازه گیری گردید. درصد بازداری غلظت های مختلف اسانس ها با بهره گیری از رابطه زیر تعیین شد (آبوت ۱۹۲۵):

$$IP^1: \text{درصد بازداری}$$

$$C^2: \text{میانگین قطر هاله قارچ در تیمار شاهد}$$

$$T^3: \text{میانگین قطر هاله قارچ در تیمار مورد نظر}$$

### شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

آنالیز GC/MS با دستگاه کروماتوگراف گازی Thermo Finnigan که با سیستم مس اسپکترومتری (model GC TRACE; TRACE MS plus) جفت شده بود، انجام شد. ستون غیر قطبی (30 HP-5MS)

### اثر اسانس زیره سبز

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر اسانس زیره سبز بر خصوصیات اندازه گیری شده در گندم شامل طول ریشه، طول شاخه، وزن خشک ریشه، وزن خشک شاخه، محتوای نسبی آب و سطح برگ معنی دار شد (جدول ۱).

بیماری باعث کاهش خصوصیات مورفولوژیکی ریشه و شاخساره گیاه گندم شد. هتزلر و همکاران (۱۹۹۱) اعلان کردند که به نظر می رسد که تنوع و شدت تهاجم این بیمارگر با گذشت زمان در حال افزایش است. نتایج این تحقیق در خصوص بیماری زایی قارچ *B. sorokiniana* در گیاه گندم نیز در تأیید مطالعه هتزلر و همکاران (۱۹۹۱) با گذشت زمان حالتی صعودی داشت.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس فاکتورهای رشدی تحت تیمار بیماری و غلظت اسانس زیره

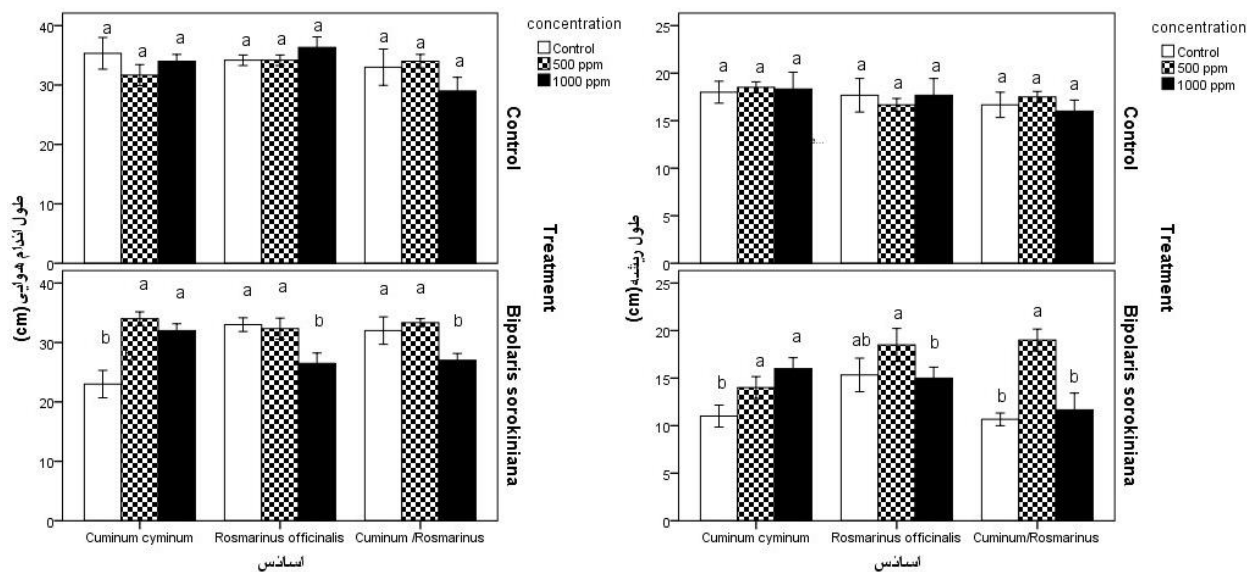
منابع تغییر	درجه آزادی	طول ریشه	طول شاخه	وزن خشک ریشه	وزن خشک شاخه	محتوی آب نسبی	سطح برگ
تیمار بیماری	۱	۹۵/۶۸**	۷۲/۰۰**	۱۰۳/۶۶**	۰/۳۰**	۱۷۱/۳۲	۴/۱۶**
غلظت اسانس زیره	۲	۲۲/۰۲*	۵۶/۳۳*	۷۹/۱۴**	۰/۳۰**	۸۹۳/۱۱**	۰/۷۹*
اثر متقابل تیمار بیماری و غلظت اسانس زیره	۲	۱۶/۳۶	۱۷۰/۳۳**	۲/۴۴	۰/۸۲*	۳۱۳/۰۱*	۳/۳۴*
خطا	۱۲	۱۳/۱۶	۲۹/۳۳	۱۲/۲۳	۰/۴۹	۱۸۶/۲۷	۰/۹۰

\*\* و \* به ترتیب در سطح ۱ درصد و ۵ درصد معنی دار می باشد.

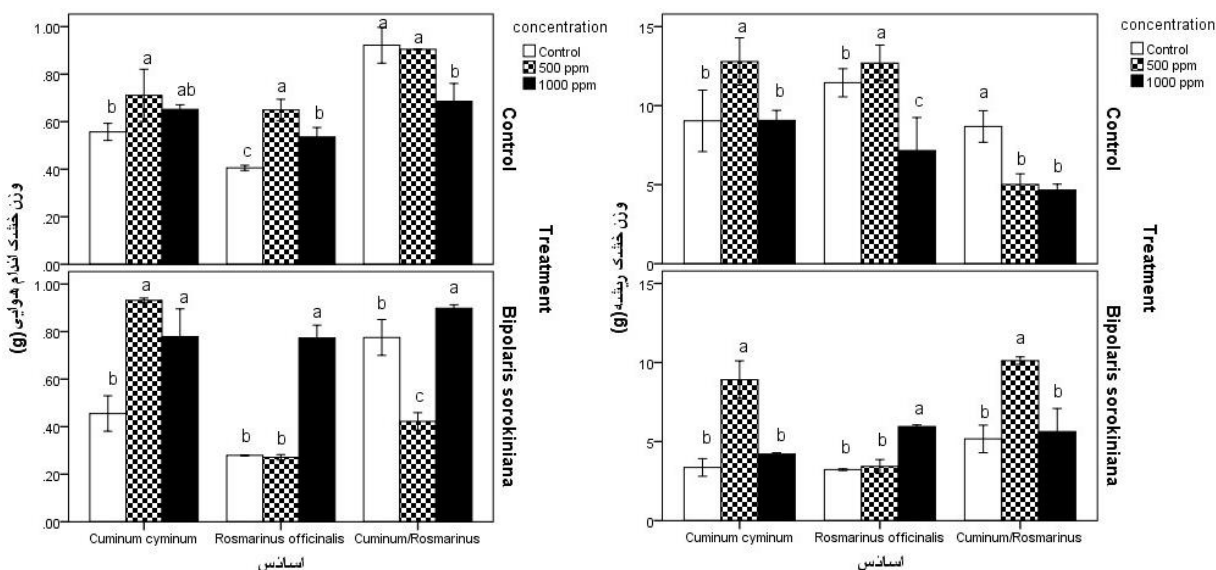
است. چنان که ملاحظه می شود، اسانس های گیاهی استخراج شده با روش تقطیر با آب روی قارچ *B. sorokiniana* اثر داشته و اسانس زیره با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر بیشترین اثر بازدارندگی قارچ بیماری زای مورد آزمایش داشته است. شکل ۴ نشان داد که غلظت های ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر تمام اسانس های مورد آزمایش اثر بازدارندگی از خود نشان داده است اما بین غلظت ۱۰۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم در لیتر زیره تفاوت معنی داری مشاهده نشد ولی نسبت به اسانس رزماری اثر بهتری را نشان داد. شکل ۵ اثر غلظت های مختلف اسانس رزماری، زیره و ترکیب این دو را بر میزان بازدارندگی قارچ *B. sorokiniana* نشان می دهد. در پتری دیش های شاهد قارچ بیشترین هاله رشدی را نشان داد، در حالی که غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر زیره باعث کاهش معنی دار هاله رشدی شد.

نمودارهای شکل ۱ اثر همزمان تنش بیماری و اسانس های مختلف در میزان طول ریشه و شاخه گندم نشان داده شده است. با توجه به گروه شاهد (بدون قارچ) و بیماری (آلوده به قارچ)، به طور کامل می توان به این نتیجه رسید که قارچ *B. sorokiniana* در مقدار طول ریشه و طول شاخه اثر منفی داشته است. بعد از محلول پاشی اسانس زیره، رزماری و ترکیبی با یکدیگر، اسانس زیره روی طول شاخه اثر معنی داری روی طول شاخه تیمار بیماری داشت، ولی در غلظت ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس زیره تفاوت معنی داری مشاهده نشد.

با توجه به شکل ۲، غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس زیره به طور قابل توجهی روی وزن خشک شاخه اثر گذاشته است. نتایج بررسی اثر بازدارندگی اسانس از طریق آب پاشی روی برگ های گیاه گندم، روی محتوی آب نسبی و سطح برگ گیاه گندم در شکل ۳ ارائه شده



شکل ۱- اثر همزمان تنش بیماری و اسانس در میزان طول ریشه (راست) و طول شاخه (چپ) گندم (در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی داری بر اساس آزمون توکی هستند).



شکل ۲- اثر همزمان تنش بیماری و اسانس در میزان وزن خشک ریشه (راست) و شاخه (چپ) گیاه گندم (در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی داری بر اساس آزمون توکی هستند).

طول ریشه، طول شاخه، وزن خشک ریشه، وزن خشک شاخه، محتوای نسبی آب و سطح برگ معنی دار شد (جدول ۲).

اثر اسانس رزماری  
نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر اسانس رزماری بر خصوصیات اندازه گیری شده در گندم شامل

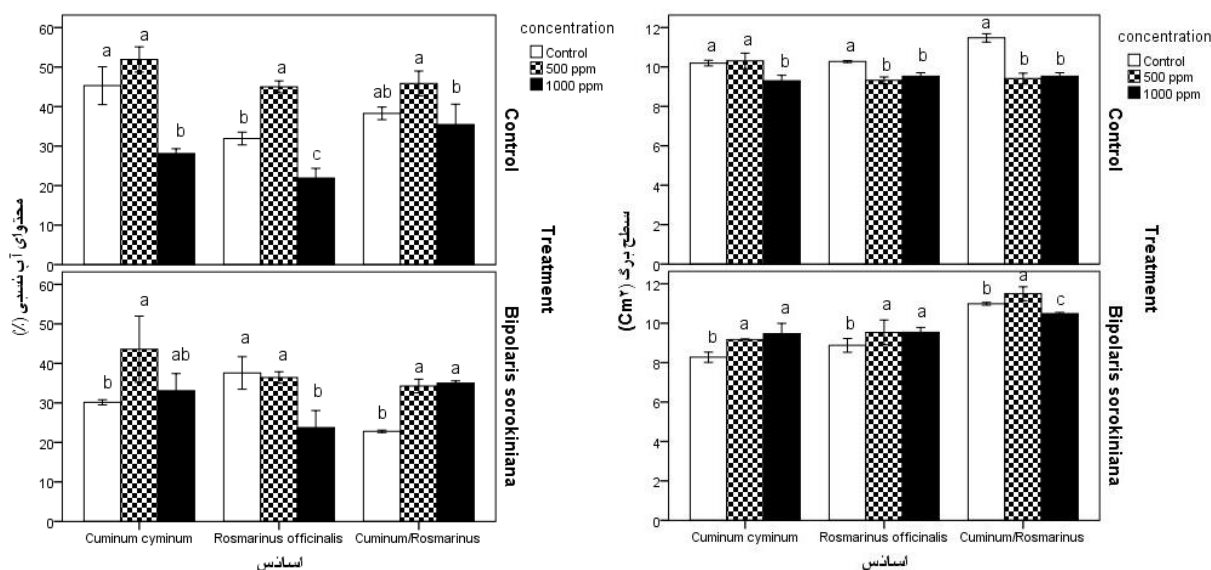
جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس فاکتورهای رشدی تحت اثر تیمار بیماری و غلظت اسانس رزماری

منابع تغییر	درجه آزادی	طول ریشه	طول شاخه	وزن خشک ریشه	وزن خشک شاخه	محتوی آب نسبی	سطح برگ
تیمار بیماری	۱	۵/۰۱	۸۲/۳۴**	۱۷۴/۹۱**	۰/۱۹**	۰/۵۰	۰/۶۸
غلظت اسانس رزماری	۲	۵/۵۲	۱۶/۳۳*	۶/۷۹*	۰/۶۳*	۹۹۲/۱۶**	۰/۰۷
اثر متقابل تیمار بیماری و غلظت اسانس رزماری	۲	۱۸/۸۶*	۶۹/۷۷**	۵۷/۶۴**	۰/۶۵**	۱۶۳/۴۱**	۲/۳۱**
خطا	۱۲	۲۱/۱۶	۱۸/۱۶	۹/۹۹	۰/۲۶	۷۲/۶۶	۰/۹۶

\*\* و \* به ترتیب در سطح ۱ درصد و ۵ درصد معنی دار می باشد.

بود. با توجه به شکل ۲، اسانس رزماری کمترین تاثیر را در میزان وزن خشک ریشه و شاخه داشت.

با توجه به نمودارهای شکل ۱، اثر اسانس رزماری تفاوت معنی داری را در طول شاخه نداشت، حال آنکه در طول ریشه در غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر معنی دار



شکل ۳- اثر همزمان تنش بیماری و اسانس در میزان سطح برگ (راست) و محتوی نسبی آب برگ (چپ) گیاه گندم در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی داری بر اساس آزمون توکی هستند.

شده در گندم شامل طول ریشه، طول شاخه، وزن خشک ریشه، وزن خشک شاخه، محتوای نسبی آب و سطح برگ معنی دار شد (جدول ۳).

### اثر اسانس ترکیبی زیره و رزماری

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که اثر اسانس ترکیبی زیره سبز و رزماری بر خصوصیات اندازه گیری



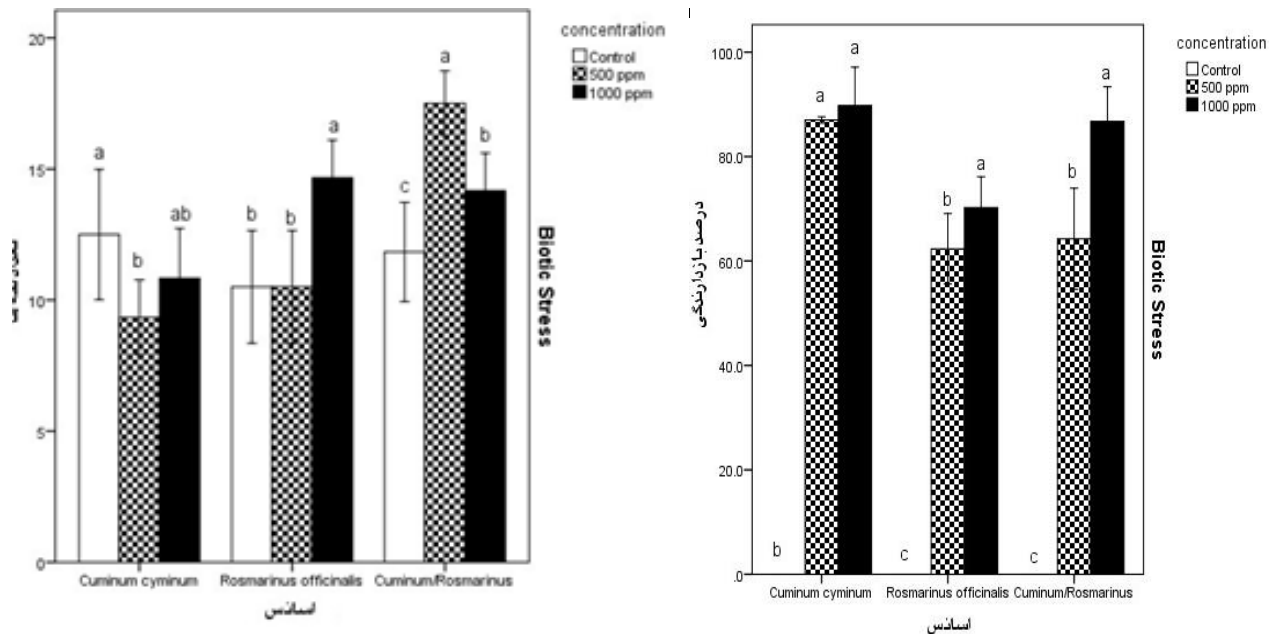
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس فاکتورهای رشدی تحت اثر تیمار بیماری و غلظت اسانس ترکیبی زیره-رزماری

منابع تغییر	درجه آزادی	طول ریشه	طول شاخه	وزن خشک ریشه	وزن خشک شاخه	محتوی آب نسبی	سطح برگ
تیمار بیماری	۱	۳۹/۰۱**	۶/۷۲	۳/۲۸*	۰/۰۸**	۳۷۹/۰۱**	۳/۲۵**
غلظت اسانس ترکیبی زیره-رزماری	۲	۸۱/۵۸**	۱۰۷/۴۴**	۱۸/۸۶**	۰/۱۰**	۲۷۲/۵۰**	۴/۵۶**
اثر متقابل تیمار بیماری و غلظت اسانس ترکیبی زیره-رزماری	۲	۴۶/۵۲**	۱/۴۴	۵۵/۶۵**	۰/۳۸**	۱۸۱/۵۵**	۴/۹۷**
خطا	۱۲	۱۲/۵۰	۳۴/۶۶	۶/۸۱	۰/۰۲	۶۳/۳۳	۰/۴۲

\*\* و \* به ترتیب در سطح ۱ درصد و ۵ درصد معنی دار می باشد.

۲، غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس ترکیبی زیره و رزماری بیشترین تأثیر (۵۴/۵۴ درصد) را بر افزایش وزن خشک ریشه داشت.

اثر ترکیبی زیره و رزماری تفاوت معنی داری را در طول شاخه نداشت، این در حالی است که ترکیب زیره و رزماری با یکدیگر بیشترین تأثیر را در میزان طول ریشه در مقایسه با طول شاخه داشت (شکل ۱). با توجه به شکل



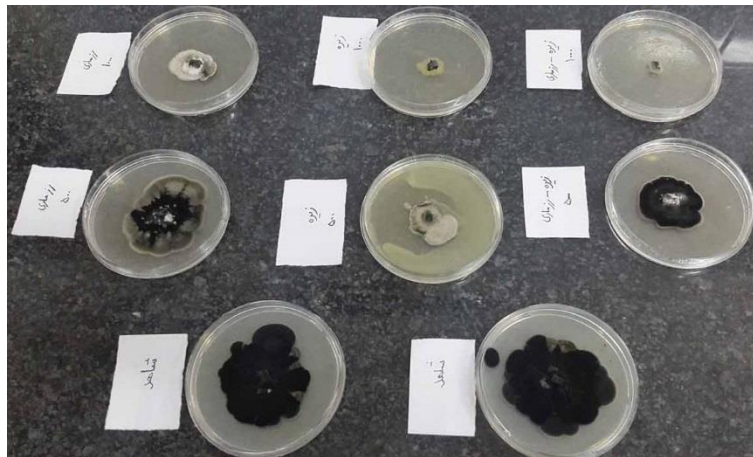
شکل ۴- اثر همزمان تنش بیماری و اسانس در تعداد لکه های قارچی (راست) و میزان درصد بازدارندگی قارچ (چپ) توسط اسانس (در هر ستون میانگین های دارای حروف متفاوت دارای تفاوت معنی داری بر اساس آزمون توکی هستند)

(شکل ۳). با توجه به جدول آنالیز واریانس در مورد غلظت های مختلف اسانس و تیمار بیماری و شاهد نیز تفاوت معنی داری وجود داشت (جدول ۳). با توجه به شکل ۴، غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر ترکیب اسانس زیره و رزماری تأثیر بازدارندگی قابل توجهی را نشان

ترکیب اسانس زیره و رزماری اثر کمی روی محتوی آب نسبی داشته و بین غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر تفاوت معنی داری مشاهده نشده است، درحالی که غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر ترکیب اسانس زیره و رزماری روی سطح برگ بیشترین اثر را داشته است

داد ولی غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس زیره سبز بیشترین اثر را در میزان بازدارندگی قارچ *B. sorokiniana* داشت، همچنین غلظت ۵۰۰ میلی گرم در لیتر اسانس ترکیبی زیره و رزماری نیز بیشترین تأثیر روی از بین بردن لکه ها گذاشته است. مطابق شکل

۵ در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر ترکیب اسانس رزماری و زیره بیشترین میزان بازدارندگی (۸۸/۱۲ درصد) در رشد قارچ را داشت، در حالی که اسانس رزماری در غلظت ۱۰۰۰ میلی گرم کمترین اثر (۶۸/۳۵ درصد) را داشت.



شکل ۵- اثر غلظت‌های مختلف اسانس بر میزان بازدارندگی قارچ *B. sorokiniana*

شکل ۶ اثر تیمارهای مختلف اسانس رزماری، زیره و ترکیب این دو را در برگ گیاهان شاهد که فقط با اسانس گیاهان دارویی محلول‌پاشی شده‌اند، نشان می‌دهد. همانطور که در شکل نیز مشخص است برگ این گیاهان کاملاً سالم می‌باشد. در حالی که در شکل ۷ که گیاهان تحت تیمار قارچ *B. sorokiniana* و محلول‌پاشی اسانس را نشان می‌دهد، لکه‌های برگ‌گی مشهود است. نشانه‌های بیماری روی برگها و غلاف برگها در تمام مراحل رشدی دیده می‌شوند و به صورت لکه‌های گرد تا

مستطیلی شکل و با حاشیه لکه‌ها کاملاً مشخص بوده و به صورت یکنواخت قهوه‌ای تیره هستند. لکه‌ها ممکن است به هم رسیده و موجب قهوه‌ای شدن بخش گسترده‌ای از برگ شده و در نهایت برگ خشک می‌شود (بوکوس و همکاران ۲۰۱۰). در مطالعه حاضر اسانس زیره به طور معنی‌داری باعث کاهش لکه‌های برگ‌گی شده است.



شاهد (محلول پاشی با آب مقطر)



رزماری ۵۰۰ ppm



رزماری ۱۰۰۰ ppm



شاهد (محلول پاشی با آب مقطر)



زیره ۵۰۰ ppm



زیره ۱۰۰۰ ppm



شاهد (محلول پاشی با آب مقطر)



زیره- رزماری ۵۰۰ ppm



زیره- رزماری ۱۰۰۰ ppm

شکل ۶. اثر تیمارهای مختلف اسانس در برگ‌های گیاهان شاهد (گیاهان بدون تیمار قارچی)



شاهد (گیاه مایه زنی شده با قارچ)



رزماری ۵۰۰ ppm



رزماری ۱۰۰۰ ppm



شاهد (گیاه مایه زنی شده با قارچ)



زیره ۵۰۰ ppm



زیره ۱۰۰۰ ppm



شاهد (گیاه مایه زنی شده با قارچ)



زیره- رزماری ۵۰۰ ppm



زیره- رزماری ۱۰۰۰ ppm

شکل ۷- اثر تیمارهای مختلف اسانس در لکه های قارچی برگها تحت تنش بیماری (مایه زنی شده با *B. sorokiniana*)

میلی متر بیشترین اثر بازدارندگی را بر علیه قارچ مذکور داشت، که در تحقیق حاضر نیز اسانس زیره بیشترین تأثیر بازدارندگی را روی قارچ *B. sorokiniana* داشت و شکل ۵ نیز همین مساله را تایید می کند.

مطالعات بهرامی نژاد و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان می دهد که خارخسک (*Tribulus terrestris* L.) در ریشه و اندام هوایی خود حاوی مواد بازدارنده علیه گونه *B. sorokiniana* می باشد. عصاره متانولی ریشه خارخسک با میانگین هاله بازدارندگی به میزان ۱۷/۶۳

الگوی خروج آلکان های نرمال، شاخص بازداری (Retention Index) برای ترکیبات محاسبه و در نهایت مقایسه آنها با شاخص های مرجع، ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس، شناسایی شدند. نتایج حاصل از GC-MS نشان داد که 3-Carene-10-al (۲۷/۱۳ درصد) بیشترین درصد میزان اسانس زیره می باشد. همچنین بیشترین درصد اسانس رزماری IR- $\alpha$ -Pinene (۱۴/۸۲ درصد) می باشد. در اسانس ترکیبی زیره و رزماری، بیشترین میزان اسانس را 3-Carene-10-al (۱۲ درصد) نشان می-دهد.

مختاری و همکاران (۱۳۹۱) گزارش کردند که اصلی ترین ترکیب ماده موثره زیره سبز آلدئید کومینیک می باشد که نوعی ماده محلول در آب می باشد که در نهایت گزارش کردند که اسانس زیره سبز اثر مهار کنندگی بر رشد قارچ فوزاریوم ورتیسیلیوئیدس می باشد. اما نتایج این تحقیق در خصوص بیشترین اثر اسانس روی قارچ، اسانس زیره دارای حداکثر بازدارندگی قارچ *B. sorokiniana* شد.

از مهم ترین ترکیبهای اسانس رزماری ۸،۱-سینئول است. آسانوا و همکاران (۲۰۰۳) نشان دادند که این ترکیب فعالیت سیتوتوکسیسیستی بسیار بالایی دارد و ممکن است این ترکیب نقش اصلی را در سیتوتوکسیسیستی این اسانس بر عهده داشته باشد. در این مطالعه تاثیر اسانس رزماری، زیره و زیره-رزماری روی قارچ *B. sorokiniana* نشان داده شد؛ از این رو اسانس زیره و نیز ترکیب اسانس زیره و رزماری (بیشترین تأثیر) می تواند یک منبع اولیه برای تهیه ترکیب های ضد میکروبی طبیعی برای بازداری از رشد *B. sorokiniana* در گندم به کار رود.

امین افشار و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که بیشترین میزان درصد اسانس رزماری آلفا پینن با ۱۲/۳ درصد می باشد که مطالعه حاضر نیز در تأیید این تحقیق بیشترین میزان ماده موثره رزماری را آلفا پینن با ۱۴/۸۲ درصد می باشد. نتایج حاصل از پژوهشی دیگر توسط

عمارلو و همکاران (۲۰۰۹) اعلان کردند که اولین قارچی که به ریشه حمله کرده و علائم ایجاد می کند جنس *B. sorokiniana* می باشد. سرعت کلونیزه کردن بافت ریشه و طوقه بسیار بالاست و به علت تخریب سریع بافت ریشه و طوقه باعث کوتاهی قد بوته ها به میزان ۵۰ - ۷۵ درصد بوته های سالم می شود. که دلیل این امر را می توان گفت چون از ابتدا ریشه آلوده شده و سرعت کلونیزه شدن ریشه نیز بالا بوده میزان جذب آب ریشه کم بوده میزان آب از دست رفته بعد از خشک کردن در آون نیز کم خواهد بود. در این تحقیق نیز اثر قارچ *B. sorokiniana* در میزان ارتفاع شاخساره باعث کوتاهی قد گیاهان مورد آزمایش شد و همچنین میزان جذب آب توسط ریشه و به طبع آن وزن خشک ریشه نیز مطابق نتایج عمارلو و همکاران (۲۰۰۹) با اثر قارچ کم شد.

در مطالعه حاضر بین طول شاخه و طول ریشه، وزن تر ریشه با طول ریشه و طول شاخه، وزن خشک ریشه با طول ریشه و شاخه و وزن تر ریشه و شاخه همبستگی مثبت معنی داری ( $P < 0.05$ ) وجود داشت. بین سطح برگ با طول ریشه و شاخه، وزن ر ریشه و شاخه و وزن خشک ریشه و محتوای آب نسبی برگ همبستگی معنی-داری وجود داشت. از طرفی یک همبستگی منفی بین تعداد لکه های قارچی با فاکتورهای رشدی وجود داشت. در تحقیق حاضر تمامی اسانس ها فعالیت ضد قارچی از خود نشان دادند، مقایسه میانگین-های اسانس ها در تیمار ها و اثرات متقابل آنها، نشان داد که در کل، اثر ترکیبی اسانس زیره و رزماری بیشترین تأثیر را روی بازدارندگی فعالیت قارچ داشت. نتایج این تحقیق نشان می دهد که افزایش غلظت اسانس و نوع اسانس می تواند تاثیر متفاوتی بر روی قارچ داشته باشد.

#### شناسایی ترکیبات موجود در اسانس

بعد از تزریق اسانس به دست آمده به دستگاه کروماتوگرافی گازی - طیف سنجی جرمی، با توجه به

### نتیجه گیری کلی

نتایج این تحقیق در مجموع نشان داد که اسانس گیاهان مورد آزمایش دارای مواد ارزشمند دارویی می-باشند که مهم‌ترین آنها آلفا - پینن، کارن، وربنون و اوکالیپتول می باشد که در صنایع غذایی و دارویی استفاده می‌شود. از سوی دیگر در ترکیب دو گیاه با یکدیگر خاصیت ضد قارچی بیشترین اثرات معنی داری را روی پارامترهای مختلف در خنثی سازی و بازدارندگی قارچ *B. sorokiniana* داشت. بنابراین می توان اسانس زیره و نیز ترکیب این دو گیاه یعنی زیره و رزماری با همدیگر در تهیه سموم برای از بین بردن بیماری لکه سوختگی با عامل *B. sorokiniana* استفاده کرد. همچنین با توجه به همبستگی بین عوامل مختلف این تحقیق، تحقیقات جامع تری در این زمینه از جمله اثر اسانس‌های مورد مطالعه در این تحقیق بر سایر گیاهان زراعی آلوده به قارچ *B. sorokiniana* مثل گیاه جو پیشنهاد می‌شود.

### تشکر و قدردانی

نتایج این مقاله از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه و بنیاد ملی نخبگان ریاست جمهوری (قرارداد به شماره ۱۵/۸۳۷۲۴ مورخ ۱۳۹۵/۱۰/۰۱) مستخرج شده است. بدین وسیله از بنیاد ملی نخبگان ریاست جمهوری به خاطر فراهم نمودن امکانات لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

مقتدر و افضلی (۲۰۰۹) بیان داشت که در شهر کرمان ۴۱ ترکیب را از دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی دریافت کردند که بیشترین درصد ترکیبات آنها آلفا- پینن (۱۵/۵۲ درصد)، کامفور (۱۱/۶۶ درصد) و وربنون (۱۱/۱۰ درصد) می باشد که در تحقیق حاضر ۴۶ ترکیب با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی دریافت شد که از میان آنها آلفا پینن (۱۴/۸۲ درصد) و اوکالیپتول (۱۴/۷۴ درصد) بیشترین درصد میزان اسانس را تشکیل داده است.

با توجه به این که تولید متابولیت های ثانویه به شدت تحت تأثیر شرایط محیطی می باشد میزان ترکیبات اسانس گیاهی در محیط‌های گوناگون متفاوت می باشد. اسماعیلی (۲۰۱۵) بیشترین درصد میزان اسانس زیره را آلفا پینن (۳۰ درصد) گزارش کرد. این در حالی است که در مطالعه حاضر بیشترین میزان درصد تشکیل دهنده اسانس را 3-Caren-10-al (۲۷/۱۳ درصد) تشکیل داده است. در گزارش بررسی شیمیایی زیره سبز، احمدی (۱۹۹۹) با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی اسانس زیره سبز را مورد بررسی قرار داد، که در مطالعه وی ۱۳ ترکیب شناسایی شد (۹۸ درصد) که در میان ترکیبات شناسایی شده کومین آلدئید (۲۵/۲ درصد) بیشترین میزان درصد اسانس را تشکیل داد که در مطالعه حاضر 3-Caren-10-al بیشترین درصد ترکیب اسانس را تشکیل می‌دهد.

### منابع مورد استفاده

- Abbott WS. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- AgehMiri A, Mehrabi R and Talebi R. 2015. Isolation, identification and study of genetic diversity of *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) Shoen. Using molecular markers. *Crops*, 11: 15-27. (In Persian).
- Agrios GN. 2005. *Plant Pathology* 5th ed. Elsevier Academia Press, Oxford, p. 922.
- Ahmadi L. 1999. Study on chemical composition of the essential oil from seeds of *Cuminum cyminum* L. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants Research*, 6: 97-113.

- Aktaş A, Bolat N, Keser M and Ince T. 2000. Determination of the cereal root and crown rot disease agents in the Eskişehir cereal growing areas and researches on the genitor varieties and lines against *Drechslera sorokiniana* (Sacc) Subram. and Jain. In wheat and barley. Plant Protection Bulletin, 40: 71-83.
- Amarlou OA, Rouhani H and Mahdokhani Moghaddam E. 2009. Identification and study of pathogenicity of fungi causing carcass roots of wheat in North Khorasan province. Plant Protection, 24: 269-284. (In Persian).
- Amin Afshar MH, Mehesti P and Imam Jomaeh Z. 2015. Identification of compound formation, minimum inhibitory concentration on growth and mineralization of Rosemary essences cultivated in Shiraz. Journal of Medicinal Plants, 4: 122-112. (In Persian).
- Arabi MIE and Jawhar M. 2007. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Cochliobolus sativus*. Australian Plant Pathology, 36: 17-21.
- Asanova ZhK, Suleimenov EM, Atazhanova GA, Dembitskii AD, Pak RN, Dar A and Adekenov SM. 2003. Biological activity of 1, 8-cineole from levant wormwood. Pharmaceutical Chemistry Journal, 37(1): 28-30.
- Aziz Khani M, Oznar R and Patricia E. 2014. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil on growth and gene expression of enterotoxins A, C and E *Staphylococcus aureus* 29213 ATCC. Medicinal and Aromatic Plants, 32: 801-811. (In Persian).
- Bahadar K, Munir A and Asad S. 2016. In-vitro inhibition of spot blotch disease causal agent (*Bipolaris sorokiniana*) by plant extracts. Pakistan Journal of Phytopathology, 28: 173-183.
- Bahraminejad S, Abbasi S and Papzan H. 2009. Evaluation antifungal activity of some extracts of medicinal plants. 6th Congress of Iranian Horticultural Sciences, 1065-1068. (In Persian).
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D and Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology, 46: 446-475.
- Bakr EM. 2005. A new software for measuring leaf area, and area damaged by *Tetranychus urticae* Koch. Journal of Applied Entomology, 129 (3):173-175.
- Bockus WW, Bowden RL, Hunger RM, Morrill WL, Murray TD and Smiley RW. 2010. Compendium of Wheat Diseases and Pests, 3rd edn. St Paul, MN, USA: APS Press.
- Bozin B, Mimica-Dukic N, Simin N and Anackov G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 1822-1828.
- Couladis M, Tzakou O, Kujundzi S, Sokovi M and Mimica-Dukic N. 2004. Chemical analysis and antifungal activity of *Thymus striatus*. Phytotherapy Research, 18: 40-42.
- Esmaeili F. 2015. Composition of Essential Oil of *Cuminum cyminum*. Essential Oil Bearing Plants, 18(2): 507-509.
- Hadian J, Farzaneh M, Fakhr Tabatabaei SM, Mirjalili MH, Ranjbar H and Haji Eqarari B. 2007. Identification composition of *Artemisia scopari* and *A. aucheri* essential oils from southern Khorasan province and evaluation their antifungal effect on some pathogenic plants. Iranian Journal of Agricultural Science, 38: 421-429. (In Persian).
- Hetzler J, Eyal Z, Metha YR, Campos LA, Fehrmann H, Kushnir U, Zekaria JO and Cohen L. 1990. Interaction between spot blotch (*Cochliobolus sativus*) and wheat cultivars. In: Proceedings of the International Conference Mexico, CIMMYT, 146-164.
- Kumar J, Schafer P, Huckelhoven R, Langen G, Baltruschat H, Stein E, Nagarajan S and Kogel KH. 2002. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. Molecular Plant Pathology, 3(4): 185-195.

- Matusinsky P, Frei P, Mikolasova R, Svacinova I, Tvaruzek L and Spitzer T. 2010. Species-specific detection of *Bipolaris sorokiniana* from wheat and barley tissues. *Crop Protection*, 29: 1325-1330.
- Moghtader M and Afzali D. 2009. Study of the antimicrobial properties of the essential oil of Rosemary. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environmental Science*, 5(3): 393-397.
- Mokhtari AR, Khosravi AR and Zohraei Salehi T. 2012. Antifungal effect and morphological changes of cumin essential oil on the isolates of *Fusarium verticillioids* isolated in Iran. *Comparative Pathobiology*, 2: 705-714. (In Persian).
- Naeemi Sh, Khosravi V and Tsukiboshi N. 2011. Occurrence of rice plant infection to *Bipolaris sorokiniana* in Iran. *Plant Diseases*, 47: 353-360. (In Persian).
- Nascimento EJD and van der Sand ST. 2008. Restriction analysis of the amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana* isolates. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(5): 647-652.
- Roman-Ramos R, Flores-Saenz JL and Alarcon-Aguilar FJ. 1995. Anti-hyperglycemic effect of some edible plants. *Ethno Pharmacology*, 48: 25-32.
- Rustaiyan A, Masoudi S, Yari M, Rabbani M, Motiefar HR and Larijani K. 2000. Essential oil of *Salvia lerifolia* Benth. *Journal of Essential Oil Research*, 12: 601-602.
- Sharma RC and Dubin HJ. 1996. Effect of wheat cultivar mixtures on spot blotch (*Bipolaris sorokiniana*) and grain yield. *Field Crops Research*, 45: 95-101.
- Zhong SB and Steffenson BJ. 2001. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. *Phytopathology*, 91: 469-476.