

## فعالیت ضد قارچی اسانس گیاهان دارویی در برابر قارچ *Mycogone perniciosa* عامل بیماری حباب تر و اثر آن‌ها بر قارچ دکمه‌ای

۱. مهدی بهنامیان\*؛ ۲. زیور نجفی؛ ۳. مهدی داوری؛ ۴. سارا دژستان  
۱ و ۲. استادیار و دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، گروه علوم باغبانی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل  
۳. دانشیار، گروه گیاه پزشکی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل  
۴. استادیار، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل  
(تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۱۶ - تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۸/۷)

### چکیده

یکی از بیماری‌های رایج قارچ دکمه‌ای در ایران، بیماری حباب تر است که توسط قارچ *Mycogone perniciosa* ایجاد می‌شود. در مطالعه حاضر، به منظور توسعه کنترل بیولوژیک و تولید محصول سالم، اثر ضدقارچی اسانس برخی گیاهان دارویی معطر به عنوان جایگزینی برای قارچ‌کش‌های شیمیایی مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور، قارچ *M. perniciosa* از قارچ دکمه‌ای سفید (*Agaricus bisporus* cv. Sylvan 737) مبتلا به بیماری حباب تر جداسازی شد. سپس به منظور ارزیابی امکان کنترل بیولوژیک قارچ عامل بیماری، اثر شش اسانس گیاه سیر، پونه، پونه کوهی، اسطوخودوس، آویشن کوهی و اکالیپتوس در برابر *M. perniciosa* و اثر آنها روی میسلیم قارچ دکمه‌ای سفید در غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر در لیتر مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج، آویشن کوهی و پونه کوهی بسیار سمی بوده و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و قارچ‌کشی (MFC) آنها روی *M. perniciosa* به ترتیب ۳۰۰ و ۵۰۰ میکرولیتر بر لیتر بود. اسانس سیر، اثر قارچ‌کشی خود را روی *M. perniciosa* (۱۰۰۰ میکرولیتر بر لیتر) در غلظتی پایین‌تر از قارچ دکمه‌ای (۱۴۰۰ میکرولیتر بر لیتر) نشان داد. به‌طور کلی، اسانس‌های سیر و اسطوخودوس به ترتیب به عنوان مؤثرترین و ضعیف‌ترین اسانس‌ها علیه *M. perniciosa* شناخته شدند. آنالیز GC-MS نیز نشان داد که به ترتیب Thymol، Piperitenone oxide، Trisulfide، di-2-propenyl، 1,8-Cineole، Thymol و Spathulenol اجزای اصلی شش اسانس فوق می‌باشند. با توجه به نتایج و با در نظر گرفتن ذائقه مصرف‌کنندگان به نظر می‌رسد اسانس سیر می‌تواند پس از تحقیقات تکمیلی به عنوان یک جایگزین مناسب ترکیبات شیمیایی برای کنترل بیماری حباب تر مد نظر قرار گیرد.

کلیدواژه‌گان: پونه، حباب تر، سیر، قارچ خوراکی، کنترل بیولوژیک.

## Antifungal activity of medicinal plant essential oils against *Mycogone perniciosa*, causal agent of wet bubble and their effects on button mushroom

Mahdi Behnamian<sup>1\*</sup>, Zivar Najafi<sup>2</sup>, Mahdi Davari<sup>3</sup> and Sara Dezhsetan<sup>4</sup>

1, 2. Assistant Professor and Former M.Sc. Student, Department of Horticultural Science, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3. Associate Professor, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

4. Assistant Professor, Department of Agronomy and Plant Breeding, Faculty of Agriculture and Natural Resources, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

(Received: Sep. 6, 2016 - Accepted: Oct. 28, 2016)

### ABSTRACT

One of the most common pathogenic diseases of the button mushroom in Iran is wet bubble (*Mycogone perniciosa*). In this study, in order to develop a biological control system and production of healthy crop, the antifungal effect of aromatic medicinal plants were assayed as a safe replacement for chemical fungicides. *M. perniciosa* was isolated from infected *A. bisporus* cv. Sylvan 737. In order to evaluate the biocontrol possibility, the effect of six medicinal plant essential oils including garlic, horsemint, oregano, lavender, kotschym thyme and eucalyptus were tested against *M. perniciosa* and evaluated their effects on button mushroom mycelium at 100, 500, 1000, 1500 and 2000  $\mu\text{l l}^{-1}$  *in vitro*. Based on the results, kotschym thyme and oregano were more toxic and minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) for *M. perniciosa* were 300 and 500  $\mu\text{l l}^{-1}$ , respectively. Interestingly, among the investigated essential oils, garlic oil showed a fungicidal effect on *M. perniciosa* at a lower concentration (MFC=1000  $\mu\text{l l}^{-1}$ ) than button mushroom (MFC=1400  $\mu\text{l l}^{-1}$ ). In general, garlic and lavender essential oils were found as the most effective and weakest oils against *M. perniciosa*, respectively. GC-MS analysis demonstrated that Trisulfide, di-2-propenyl, Piperitenone oxide, Thymol, 1,8-Cineole, Thymol and Spathulenol were the main components of the above essential oils, respectively. It seems that garlic oil can be considered as a good alternative in biological control of wet bubble disease according to this research and considering consumerist tastes after additional researches.

**Keywords:** Biological control, mushroom, garlic, horsemint, wet bubble.

\* Corresponding author E-mail: mbehnamian@uma.ac.ir

و در شرایط رطوبت نسبی بالا، نقاط سوخته قهوه‌ای‌رنگ در سطح کلاهک شبیه به تومور ایجاد می‌شود (Mohammadi and Pourjam 2005).

امروزه در بیشتر مراکز پرورشی از سموم شیمیایی مانند پروکلراز منگنز و کاربندازیم و مواد دیگر مانند فورمالین، نمک و لیزول به منظور کسب نتایج سریع و رضایت‌بخش برای کنترل بیماری حباب تر استفاده می‌شود. استفاده از این مواد اگرچه در واحدهای تولیدی قارچ مستلزم صرف هزینه بالا نیست ولی خطرات زیادی را در صورت باقی ماندن پسماندهای آن روی قارچ خوراکی به همراه دارد و یک تهدید جدی برای سلامتی انسان به شمار می‌آید. یک جایگزین مناسب برای این مواد شیمیایی در بیماری‌های گیاهی و انسانی می‌تواند اسانس‌های گیاهان دارویی با خواص ضدقارچی و ضدباکتریایی باشد (Kordali et al. 2008, Kunicka- Styczynska et al. 2009, Elaissi et al. 2012, Pinto et al. 2013, Zuzarte et al. 2013, Mancini et al. 2014, Elshafie et al. 2015, Yazgi et al. 2015, Li et al. 2016).

اسانس‌ها متشکل از مولکول‌های فرّاری مانند ترپن‌ها و ترپن‌ویدها و ترکیبات معطر فنلی 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 گیاهان ارائه شده است که نتایج، نشان‌دهنده اثر مهارکنندگی متفاوت اسانس‌های گیاهی است (Cantore et al. 2004, Sokovic and Van Griensven 2006, Mnayer et al. 2014, Davari and Ezazi 2016).

کشاورزی ارگانیک یکی از شاخه‌های اصلی کشاورزی پایدار است که طی دو دهه اخیر در نقاط مختلف جهان توجه زیادی به آن شده است. دلیل اصلی این گرایش را می‌توان ناشی از نگرانی‌های عمومی در خصوص سلامت و ایمنی غذایی و نیز سلامت محیط زیست دانست. بنابراین، پژوهش حاضر به منظور بررسی اثر ضدقارچی اسانس‌های گیاهی معطر علیه قارچ بیماری‌زای *M. perniciosa* و اثر بازدارندگی احتمالی آن‌ها روی قارچ خوراکی دکمه‌ای سفید صورت گرفت.

## تازه‌های تحقیق

در تحقیق حاضر برای اولین بار از اسانس آویشن کوهی و پونه علیه قارچ بیماری‌زای *M. perniciosa* استفاده شد که از قدرت قارچ‌کشی بالایی برخوردار بودند، ولی اسانس سیر اثر بازدارندگی و قارچ‌کشی کمتری روی قارچ دکمه‌ای نسبت به قارچ عامل بیماری حباب تر در یک غلظت ثابت داشت. بنابراین اسانس سیر می‌تواند به عنوان یک جایگزین بالقوه برای کنترل بیولوژیک بیماری حباب تر مد نظر قرار گیرد.

## مقدمه

*Agaricus bisporus* به عنوان شناخته شده‌ترین قارچ در فهرست قارچ‌های خوراکی است که تولید آن به سرعت در کشورهای مختلف گسترش یافته است. این قارچ به دلیل داشتن پروتئین بالا، ویتامین‌ها و املاح معدنی از قبیل کلسیم، فسفر و آهن دارای ارزش بالایی بوده و به عنوان مکمل غذایی برای افزایش ایمنی بدن در قالب قرص مصرف می‌شود و به دلیل دارا بودن کلسترول پایین، مصرف آن برای بیماران دیابتی و قلبی مناسب است. علاوه بر این، ترکیبات زیست‌فعال موجود در این قارچ دارای فعالیت ضدقارچی، ضدباکتریایی و ضدسرطانی می‌باشد (Mohammadi and Pourjam, 2005, Chen et al. 2006, Sharma et al. 2015).

قارچ‌های دکمه‌ای سفید در چرخه تولید در معرض بیماری‌های مختلفی قرار دارند که باعث کاهش قابل توجه محصول می‌گردند. تعدادی از بیمارگرها مانند قارچ‌ها، باکتری‌ها و ویروس‌ها به این قارچ‌ها حمله می‌کنند. از مهمترین قارچ‌های بیماری‌زا می‌توان به عامل بیماری حباب تر (*Mycogone perniciosa*) اشاره کرد که در سالن‌های پرورش قارچ خوراکی به وفور مشاهده می‌شود. در استان اردبیل نیز این بیماری بعد از بیماری حباب خشک رتبه دوم را دارد (Shahriar 2013). چنانچه این بیماری در اوایل دوره رشد قارچ خوراکی آلودگی ایجاد کند و کنترل نشود، می‌تواند سبب بروز خسارت سنگین شود. از مهم‌ترین علایم این بیماری روی قارچ خوراکی، توسعه بافت مضمحل شده روی اندام بارده می‌باشد که در ابتدا سفید رنگ و پنبه‌ای بوده و با گذشت زمان به رنگ قهوه‌ای در می‌آید

*M. perniciosa* و *A. bisporus* از روش اختلاط اسانس با محیط کشت PDA استفاده شد. به این منظور از اسانس‌های مورد نظر در محلول توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد)، امولسیون تهیه شد. همچنین محلول توئین ۸۰ (۰/۰۵ درصد) به عنوان تیمار شاهد در نظر گرفته شد. مقادیر مناسبی از اسانس‌های مذکور جهت تهیه غلظت‌های ۱۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ میکرولیتر اسانس در لیتر محیط کشت به فلاسک‌های حاوی محیط کشت PDA سترون با دمای ۴۲ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد اضافه و به هم زده شد تا امولسیون یکنواخت به وجود آید. پس از توزیع محیط کشت در تشتک‌های پتری و انعقاد آن، دیسک قارچی به قطر ۵ میلیمتر در وسط تشتک‌های پتری حاوی محیط کشت قرار داده شد. تشتک‌های پتری مایه‌زنی شده در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، رشد رویشی هاله هر قارچ به طور روزانه و تا زمانی که سطح محیط کشت تشتک‌های پتری شاهد توسط قارچ به‌طور کامل اشغال شود، اندازه‌گیری شد.

حداقل غلظت بازدارندگی (Minimal Inhibitory Concentration=MIC) پایین‌ترین غلظتی از اسانس بود که موجب ۱۰۰ درصد بازدارندگی در رشد شد. عدم وقوع رشد چهار روز پس از انتقال دیسک قارچی از محیط کشت حاوی اسانس به محیط کشت فاقد اسانس نیز به عنوان حداقل غلظت قارچ‌کشی (Minimal Fungicidal Concentration=MFC) در نظر گرفته شد (Pinto et al. 2013).

### تجزیه و تحلیل آماری

این تحقیق به صورت آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد. تجزیه آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS صورت گرفت.

### نتایج

نتایج حاصل از تجزیه شیمیایی اسانس‌های مورد مطالعه در جدول ۱ ارائه شده است، به طوری که ۸۵، ۶۹، ۵۹، ۱۱۷، ۴۵ و ۷۹ ترکیب شیمیایی به‌ترتیب در اسانس‌های سیر، پونه، پونه کوهی، اسطوخودوس،

### مواد و روش‌ها

#### تهیه مواد گیاهی و استخراج اسانس

در مطالعه حاضر پس از تهیه گیاهان سیر (*Allium sativum*)، پونه (*Mentha longifolia*)، پونه کوهی (*Origanum vulgare*)، اسطوخودوس (*Lavandula officinalis*)، آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus*) و اکالیپتوس (*Eucalyptus camaldulensis*)، ابتدا اقدام به خشک کردن آنها در سایه گردید. سپس حبه‌های سیر، برگ و گل گیاه پونه و پونه کوهی، اندام رویشی آویشن کوهی، برگ، گل و ساقه گیاه اسطوخودوس و برگ اکالیپتوس با استفاده از آسیاب به شکل پودر درآمد. برای اسانس‌گیری با دستگاه کلونجر به روش تقطیر با آب، در هر نوبت ۵۰ گرم از پودر حاصل مورد استفاده قرار گرفت. اسانس به‌دست آمده به وسیله 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 شیمیایی اسانس

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

#### ارزیابی اثر ضدقارچی اسانس‌های گیاهی

در این مطالعه از کشت‌های خالص قارچ بیماری‌زای *Mycogon perniciosa* (جداسازی شده از یک واحد تولیدی قارچ دکمه‌ای اردبیل و شناسایی شده براساس خصوصیات ریخت‌شناختی و مولکولی) و *Agaricus bisporus* cv. Sylvan737 که به ترتیب روی محیط‌های کشت PDA (Potato Dextrose agar) و MMP (Malt Mycological Peptone) در یخچال نگهداری می‌شد، استفاده گردید.

برای ارزیابی اثر اسانس‌ها بر رشد جدایه قارچی

آویشن کوهی و اکالیپتوس شناسایی شد. ترکیبات اصلی سیر شامل Trisulfide, di-2-propenyl (۳۱/۲۹٪)، Decane Disulfide, di-2-propenyl (۱۳/۰۶٪)، Trisulfide, methyl 2-propenyl (C.. (۱۲/۳۸٪)، Dodecane و (۷/۷۶٪) ترکیبات اصلی پونه شامل Piperitenone oxide (۵۰/۳۹٪) و Cis Piperitenone oxide (۱۵/۳۳٪) ترکیبات اصلی پونه کوهی شامل Decane (۸/۸۹٪)، Thymol (۵۶/۴۳٪) و  $\gamma$ -Terpinene (۷/۵۶٪) و Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl) (۵/۶۶٪) ترکیبات اصلی اسطوخودوس شامل Decane (۱۰/۳۱٪)، 1,8-Cineole (۱۹/۶۴٪) و Camphor (۶/۰۹٪) ترکیب اصلی در آویشن کوهی شامل Thymol (۷۴/۶۶٪) و ترکیبات اصلی اکالیپتوس شامل Spathulenol (+) (۳۴/۲۲٪) و 2-Cyclohexen-1-one, 4-(1-methyl-3-Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl) Cyclohexen-1- (۵/۲۳٪) بود.

نتایج حاصل از بررسی اثر اسانس‌های مورد مطالعه بر رشد قارچ دکمه‌ای نیز نشان داد که اسانس پونه و آویشن کوهی در پایین‌ترین غلظت (۳۵۰  $\mu\text{l/l}$ ) اثر بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ دکمه‌ای را نشان دادند. MFC برای این اسانس‌ها ۴۰۰  $\mu\text{l/l}$  بود. برای اسانس سیر نیز MIC و MFC به ترتیب برابر با ۱۳۰۰  $\mu\text{l/l}$  و ۱۴۰۰  $\mu\text{l/l}$  به دست آمد. این مقادیر برای اسطوخودوس به ترتیب ۱۲۰۰  $\mu\text{l/l}$  و ۱۵۰۰  $\mu\text{l/l}$  بود.

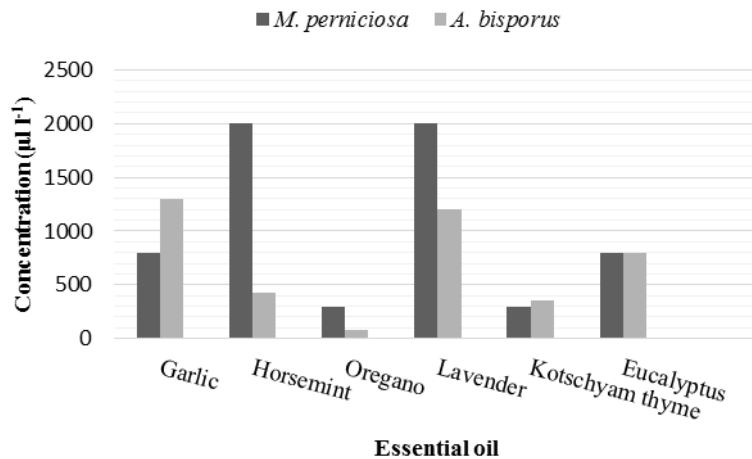
نتایج حاصل از بررسی اثر اسانس‌های مورد مطالعه بر رشد قارچ دکمه‌ای نیز نشان داد که اسانس پونه و آویشن کوهی در پایین‌ترین غلظت (۳۵۰  $\mu\text{l/l}$ ) اثر بازدارندگی از رشد میسلیم قارچ دکمه‌ای را نشان دادند. MFC برای این اسانس‌ها ۴۰۰  $\mu\text{l/l}$  بود. برای اسانس سیر نیز MIC و MFC به ترتیب برابر با ۱۳۰۰  $\mu\text{l/l}$  و ۱۴۰۰  $\mu\text{l/l}$  به دست آمد. این مقادیر برای اسطوخودوس به ترتیب ۱۲۰۰  $\mu\text{l/l}$  و ۱۵۰۰  $\mu\text{l/l}$  بود.

نتایج حاصل از فعالیت ضد قارچی اسانس‌های مورد مطالعه در شکل‌های ۱ و ۲ ارایه شده است. در تحقیق حاضر، بهترین فعالیت ضد قارچی علیه قارچ *M.*

جدول ۱. درصد ترکیبات شیمیایی اصلی شناسایی شده در اسانس‌های گیاهی مورد بررسی

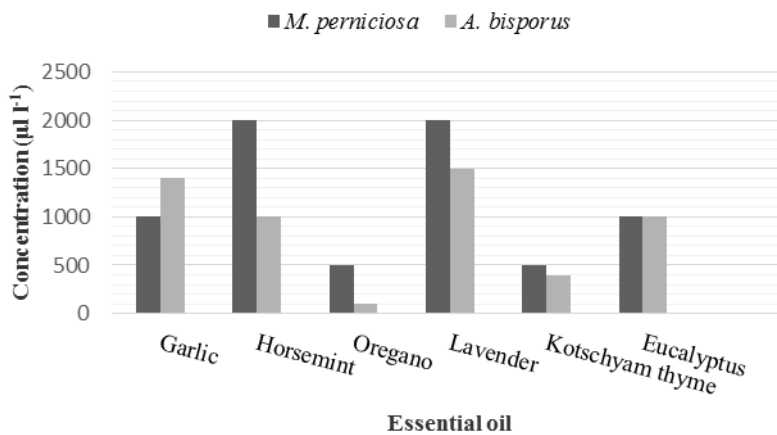
Table 1. Percentage of the main chemical components identified in the investigated essential oils

Compound	Garlic (%)	Horse mint (%)	Oregano (%)	Lavender (%)	(%) Kotschyam thyme	Eucalyptus (%)
Piperitenone oxide	-	50.39	-	-	2.03	-
Cis Piperitenone oxide	-	15.33	-	-	-	-
Phenol, 5-methyl-2-(1-Methylethyl) (Thymol)	-	7.37	56.43	6.89	74.66	-
Phenol, 2-methyl-5-(1-methylethyl) (Carvacrol)	-	-	5.66	-	3.94	-
Trans-Caryophyllene	-	5.26	1.07	-	1.46	-
Caryophyllene oxide	-	4.32	-	-	-	-
Borneol	-	-	-	8.65	2.96	-
Linalool	-	-	-	4.36	-	-
$\gamma$ -Terpinene	-	-	7.56	-	1.78	-
$\alpha$ -Terpineol	-	-	-	4.02	-	-
Decane	13.06	-	8.89	10.31	1.18	1.18
Dodecane	4.98	-	3.42	4.41	-	-
Tetradecane	-	-	1.22	1.44	-	-
Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)-(o-Cymene)	-	-	3.06	-	-	9.09
1,8-Cineole (Eucalyptol)	-	-	-	19.64	-	-
Camphor	-	-	-	6.09	-	-
3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-Trisulfide, di-2-propenyl) (Diallyl trisulfide)	-	-	-	3.10	-	5.23
Disulfide, di-2-propenyl (Diallyl Disulfide)	31.29	-	-	-	-	-
Trisulfide, methyl 2-propenyl	12.38	-	-	-	-	-
2-Oxazolidinethione	7.76	-	-	-	-	-
Diallyl tetrasulphide	3.51	-	-	-	-	-
Isospathulenol	2.45	-	-	-	-	-
1H-cycloprop[e]azulene, decahydr	-	-	-	-	-	1.04
Phenol, 2,3,5,6-tetramethyl-(+)Spathulenol	-	-	-	-	-	3.31
2-Cyclohexen-1-one, 4-(1-methylethyl) (Crypton)	-	-	-	-	-	1.69
Propanal, 2-methyl-3-phenyl-3	-	-	-	-	-	34.22
1-Cyclohexene-1-arboxaldehyde	-	-	-	-	-	14.05
2-Cyclohexen-1-ol, 1-methyl-4-(1-Sabinene	-	-	-	-	-	3.86
	-	-	-	-	-	2.86
	-	-	-	-	-	1.37
	-	-	-	-	-	3.62



شکل ۱. حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس‌های گیاهی برای قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus* cv. sylvan737) و قارچ *M. perniciosa*

Figure 1. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of plant essential oils for button mushroom (*A. bisporus* cv. sylvan737) and *M. perniciosa*



شکل ۲. حداقل غلظت قارچ‌کشی (MFC) اسانس‌های گیاهی برای قارچ خوراکی دکمه‌ای (*A. bisporus* cv. sylvan737) و قارچ بیماری‌زای *M. perniciosa*

Figure 2. Minimal Fungicidal Concentration (MFC) of plant essential oils for button mushroom (*A. bisporus* cv. sylvan737) and *M. perniciosa*

اصلی تشکیل دهنده اسانس پونه کوهی ( Mancini et al. 2014, Fournomiti et al. 2015, Hazem et al. 2015) است. گزارش شده است که ویژگی ضد قارچی تیمول با مسیرهای بیوسنتزی دیواره سلولی ارتباط ندارد و به نظر می‌رسد که تیمول به ارگوسترول در غشاء متصل شده و نفوذپذیری یونی را افزایش می‌دهد و به دلیل بروز کمبود عناصر ضروری برای بقای سلول قارچی، در نهایت منجر به مرگ سلول می‌شود (Pina-vaz et al. 2004, Ahmad et al. 2011, Marchese et

### بحث

نتایج حاصل از آزمایش نشان داد که اسانس آویشن کوهی و پونه کوهی بیشترین اثر بازدارندگی و همچنین قارچ‌کشی را در شرایط آزمایشگاهی روی قارچ *M. perniciosa* داشتند. با وجود این، اثر کشندگی پونه کوهی بر میسلیم قارچ دکمه‌ای در غلظتی پایین‌تر از غلظت آویشن کوهی اتفاق افتاد. تیمول که از گروه مونوترین‌ها می‌باشد جزء اصلی اسانس نعنا (Mota et al. 2012) و آویشن کوهی (Amiri 2012, Mazooji et al. 2012) و یکی از اجزای

and Farhadi 2015). بنابراین می‌توان خاصیت ضدقارچی ضعیف این اسانس‌ها را به نسبت پایین چنین ترکیباتی نسبت داد. چون فعالیت پایدار یک اسانس می‌تواند به ساختار شیمیایی اجزای تشکیل‌دهنده آن، نسبت‌ها و همچنین برهمکنش آنها نسبت داده شود (Marino et al. 2001, Delaquis et al. 2002, ) (Kunicka-Styczynska et al. 2009).

پیپریتون اکسید جزء اصلی اسانس پونه به شمار می‌آید (Bozovic et al. 2015). این ماده یک کتون مونوترپنویید است که ۱۴/۷ تا ۸۳/۷ درصد اسانس پونه (*M. longifolia*) را به خود اختصاص داده (Maffei et al. 1988, Gulluce et al. 2007, Hussain et al. 2010, Iqbal et al. 2013) و اثر ضدقارچی آن بر *Candida albicans* گزارش شده است. به نظر می‌رسد این ماده مسئول فعالیت‌های زیستی متعددی است و فعالیت آن ممکن است توسط مولکول‌های دیگر اندکی تغییر داده شود (Bozovic et al. 2015). در پژوهش حاضر نیز ۶۵/۷۲ درصد اسانس پونه متعلق به پیپریتون اکسید بود. با وجود این، اسانس پونه در غلظت‌های مورد مطالعه از اثر کمتری بر قارچ عامل بیماری حباب تر در مقایسه با سایر اسانس‌ها برخوردار بود.

در این تحقیق، با مقایسه MIC و MFC اسانس‌های مورد مطالعه برای قارچ بیماری‌زای مایکوگون و قارچ دکمه‌ای مشخص گردید که اسانس سیر اثر بازدارندگی و قارچ‌کشی کمتری روی قارچ دکمه‌ای نسبت به قارچ *M. perniciosa* در یک غلظت ثابت داشت. بخش عمده اسانس سیر متشکل از ترکیبات گوگردی است و Trisulphide, di-2-propenyl ترکیب غالب آن به شمار می‌آید (Calvo-Gomez et al. 2004, Li et al. 2016). استخراج اسانس سیر از طریق حرارت‌دهی تا نقطه جوش منجر به تبدیل آلیسین به ترکیبات حاوی گوگرد مانند Trisulphide, di-2-propenyl می‌شود (Tsao and Yin 2001). این ترکیبات گوگردی از طریق واکنش با گروه‌های سولفیدریل پروتئین سلولی اثر ضد میکروبی خود را نشان می‌دهند (Kim et al. 2004). علاوه بر این، اسانس سیر می‌تواند در غشاهای اندامک‌هایی مانند میتوکندری نفوذ کرده و به آنها آسیب برساند و منجر به مرگ سلول شود (Li et al. 2016).

al. 2016). علاوه بر این، تیمول از طریق ممانعت از نسخه‌برداری ژن EST2 و در نتیجه جلوگیری از فعالیت تلومراز می‌تواند اثر ضدقارچی خود را اعمال نماید (Darvishi et al. 2013). کارواکرول همراه با تیمول که ایزومری از آن است در حدود ۷۲ تا ۸۳ درصد اسانس پونه کوهی را تشکیل می‌دهد (Russo et al. 1998). در مطالعه حاضر، تیمول و کارواکرول در مجموع ۶۲/۰۹ درصد کل ترکیبات اسانس پونه کوهی و ۷۸/۶۰ درصد کل ترکیبات اسانس آویشن کوهی را به خود اختصاص داد. گاما-ترپینن نیز که پیش‌ساز کارواکرول محسوب می‌شود، به ترتیب ۷/۵۶ و ۱/۷۸ درصد اسانس‌های پونه کوهی و آویشن کوهی را تشکیل می‌دهد. این ماده در غلظتی مشابه با کارواکرول خاصیت قارچ‌کشی از خود نشان نداده است. به نظر می‌رسد کارواکرول از طریق افزایش pH واکوئل و خروج پروتون‌ها از لومن واکوئل منجر به اسیدی شدن سیتوزول شده و هم‌ایستایی  $H^+$  و  $Ca^{2+}$  را مختل می‌کند و نوسان سریع و شدید کلسیم سیتوزولی مکانیسمی است که توسط دو ایزمر فنولی کارواکرول و تیمول منجر به مرگ سلول‌های قارچی می‌شوند (Rao et al. 2010).

در این پژوهش، اسانس‌های پونه و اسطوخودوس از خود خاصیت کشندگی ضعیفی در برابر عامل بیماری‌زای مایکوگون در غلظت‌های مورد آزمون از خود نشان دادند. بخش اعظم اسانس اسطوخودوس را لینالول و لینالیل استات تشکیل می‌دهد که خاصیت ضدقارچی آنها قبلاً به اثبات رسیده است (D'auria et al. 2005, ) (Kunicka-Styczynska et al. 2009). با وجود این، تجزیه شیمیایی اسانس اسطوخودوس در مطالعه حاضر نشان‌دهنده غالب بودن محتوای 1,8-Cineole است. این ماده همراه با مونوترپن‌های اکسیژن‌دار دیگر در مجموع ۴۲/۷۶ درصد از کل ترکیبات اسانس را تشکیل داد. به نظر می‌رسد فصل، موقعیت جغرافیایی و مکان رویش گیاهان می‌تواند کیفیت و کمیت کلی اسانس را تحت تاثیر قرار دهد. شرایط آب و هوایی و شرایط خاک نیز می‌تواند ترکیب اسانس را تحت تاثیر قرار داده و تفاوت در اجزای اصلی ترکیبات مختلف هر اسانس می‌تواند به شرایط محلی و ژنتیکی نسبت داده شود (Figueiredo et al. 2008, Kucukbay et al. 2014, Moghaddam

برای اولین بار در این تحقیق مورد ارزیابی قرار گرفته است. در مجموع، با مقایسه MIC و MFC اسانس‌های مورد مطالعه برای قارچ دکمه‌ای و قارچ *M. perniciosus* مشخص گردید که همه اسانس‌های مورد استفاده دارای اثر بازدارندگی روی قارچ‌های مورد مطالعه هستند ولی اسانس سیر اثر بازدارندگی و قارچ‌کشی کمتری روی قارچ دکمه‌ای نسبت به *M. perniciosus* در یک غلظت ثابت داشت. بنابراین اسانس سیر می‌تواند به‌عنوان یک جایگزین بالقوه برای سموم شیمیایی در سالن‌های پرورش قارچ دکمه‌ای آلوده به حباب تر در نظر گرفته شود. با وجود این، مطالعات بیشتر برای توسعه راهبردهایی برای کاربرد عملی مورد نیاز است.

### سپاسگزاری

از دانشگاه محقق اردبیلی به خاطر تأمین بودجه لازم برای انجام این پژوهش، تشکر و قدردانی می‌گردد.

سمیت بالا و اثرات مخرب زیست‌محیطی برخی از قارچ‌کش‌ها و بروز تحمل در عوامل بیماری‌زای قارچی به برخی از قارچ‌کش‌ها تلاش برای جستجوی مواد طبیعی قارچ‌کش جدید را ضروری ساخته است. نتایج تحقیقات متعدد نشان می‌دهد که گیاهان منبع عظیمی از ترکیبات فعال بیوشیمیایی هستند که خاصیت ضدقارچی آنها به اثبات رسیده است (Bakkali et al. 2008). استفاده از اسانس‌های گیاهی در کنترل قارچ‌های بیماری‌زا به عنوان روشی بیولوژیک در چند سال اخیر مطرح گردیده و به عنوان روشی مؤثر و در عین حال ایمن، توجه بسیاری از محققین را به خود جلب کرده است. گزارش‌های اندکی در ارتباط با استفاده از اسانس‌های گیاهی جهت کنترل *M. perniciosus* وجود دارد (Tanovic et al. 2006). ولی اثر آنها روی قارچ دکمه‌ای (Glamoclija et al. 2009) بررسی نشده است. همچنین استفاده از اسانس آویشن کوهی و پونه علیه قارچ بیماری‌زای قارچ دکمه‌ای سفید

### REFERENCES

- Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N (2011) Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 30: 41-50.
- Amiri H (2012) Essential oils composition and antioxidant properties of three *Thymus* species. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, Article ID 728065, 8 pages doi:10.1155/2012/728065.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008) Biological effects of essential oils – a review. Food and Chemical Toxicology 46: 446-475.
- Bozovic M, Pirolli A, Ragno R (2015) *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae) essential oil and its main constituent piperitenone oxide: biological activities and chemistry. Molecules 20: 8605-8633.
- Calvo-Gomez O, Morales-Lopez J, Lopez MG (2004) Solid-phase microextraction-gas chromatographic-mass spectrometric analysis of garlic oil obtained by hydrodistillation. Journal of Chromatography A 1036: 91-93.
- Cantore PL, Iacobellis NS, De Marco A, Capasso F, Senatore F (2004) Antibacterial activity of *Coriandrum sativum* L. and *Foeniculum vulgare* Miller var. *vulgare* (Miller) essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 7862-7866.
- Chen S, Oh SR, Phung S, Hur G, Ye JJ, Kwok SL, Shrode GE, Belury M, Adams LS, Williams D (2006) Anti-aromatase activity of phytochemicals in white button mushrooms (*Agaricus bisporus*). Cancer Research 66: 12026-12034.
- Darvishi E, Omid M, Bushehri AA, Golshani A, Smith ML (2013) Thymol antifungal mode of action involves telomerase inhibition. Medical Mycology 51: 826-834.
- D'auria FD, Tecca M, Strippoli V, Salvatore G, Battinelli L, Mazzanti G (2005) Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelial form. Medical Mycology 43: 391-396.
- 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.
- Delaquis PJ, Stanich K, Girard B, Mazza G (2002) Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. International Journal of Food Microbiology 74: 101-109.
- Elaissi A, Rouis Z, Ben Salem NA, Mabrouk S, Ben Salem Y, Bel Haj Salah K, Aouni M, Farhat F, Chemli R, Harzallah-Skhirri F, Larbi Khouja M (2012) Chemical composition of 8 *Eucalyptus* species' essential oils and the evaluation of their antibacterial, antifungal and antiviral activities. BMC Complementary and Alternative Medicine 12: 81.

- Elshafie HS, Mancini E, Sakr S, De Martino L, Mattia CA, De Feo V, Camele I (2015)** Antifungal activity of some constituents of *Origanum vulgare* L. essential oil against postharvest disease of peach fruit. *Journal of Medicinal Food* 18: 929-934.
- 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.
- Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC (2008)** Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour and Fragrance Journal* 23: 213-226.
- Fournomiti M, Kimbaris A, Mantzourani I, Plessas S, Theodoridou I, Papaemmanouil V, Kapsiotis I, Panopoulou M, Stavropoulou E, Bezirtzoglou EE, Alexopoulos A (2015)** Antimicrobial activity of essential oils of cultivated oregano (*Origanum vulgare*), sage (*Salvia officinalis*), and thyme (*Thymus vulgaris*) against clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial Ecology in Health & Disease* 26: 23289. <http://dx.doi.org/10.3402/mehd.v26.23289>.
- 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.
- Glamoclija J, Sokovic M, Grubisic D, Vukojevic J, Milinekovic I, Ristic M (2009)** Antifungal activity of *Critmum maritimum* essential oil and its components against mushroom pathogen *Mycogone perniciosa*. *Chemistry of Natural Compounds* 45: 96-97.
- Gulluce M, Sahin F, Sokmen M, Ozer H, Daferera D, Sokmen A (2007)** Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from *Mentha longifolia* L. ssp. *longifolia*. *Food Chemistry* 103: 1449-1456.
- Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani AH (2010)** Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90: 1827-1836.
- Iqbal T, Hussain AI, Chatha SAS, Naqvi SAR, Bokhari TH (2013)** Antioxidant activity and volatile and phenolic profiles of essential oil and different extracts of wild mint (*Mentha longifolia*) from the Pakistani flora. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Article ID 536490, 6 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/536490>.
- Kim JW, Kim YS, Kytung KH (2004)** Inhibitory activity of essential oils of garlic and onion against bacteria and yeasts. *Journal of Food Protection* 67: 499-504.
- Kordali S, Cakir A, Ozer H, Cakmakci R, Kesdek M, Mete E (2008)** Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and p-cymene. *Bioresource Technology* 99: 8788-8795.
- Küçükbay FZ, Kuyumcu E, Çelen S, Azaz AD, Arabaci T (2014)** Chemical composition of the essential oils of three *Thymus* taxa from Turkey with antimicrobial and antioxidant activities. *Records of Natural Products* 8: 110-120.
- Kunicka-Styczyn´ska A, Sikora M, Kalembe D (2009)** Antimicrobial activity of lavender, tea tree and lemon oils in cosmetic preservative systems. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1903-1911.
- Li WR, Shi QS, Dai HQ, Liang Q, Xie XB, Huang XM, Zhao GZ, Zhang LX (2016)** Antifungal activity, kinetics and molecular mechanism of action of garlic oil against *Candida albicans*. *Scientific Reports* 6: 22805-22813.
- Maffei M (1988)** A chemotype of *Mentha longifolia* (L.) Hudson particularly rich in piperitenone oxide. *Flavour and Fragrance Journal* 3: 23-26.
- Mancini E, Cameleb I, Elshafie HS, De Martino L, Pellegrino C, Grulova D, De Feo V (2014)** Chemical composition and biological activity of the essential oil of *Origanum vulgare* ssp. *hirtum* from different areas in the southern Apennines (Italy). *Chemistry & Biodiversity* 11: 639-651.
- Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Lorenzo AD, Nabavi SF, Gortzi O, Izadi M, Nabavi SM (2016)** Antibacterial and antifungal activities of thymol: a brief review of the literature. *Food Chemistry*, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- Marino M, Bersani C, Comi G (2001)** Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology* 67: 187-195.
- Mazooji A, Salimpour F, Danaei M, Akhoondi Darzikolaei S, Shirmohammadi K (2012)** Comparative study of the essential oil chemical composition of *Thymus kotschyanus* Boiss. & Hohen var. *kotschyanus* from Iran. *Annals of Biological Research* 3: 1443-1451.
- 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 essential oils from the *Alliaceae* family. *Molecules* 19: 20034-20053.



- Moghaddam M, Farhadi N (2015)** Influence of environmental and genetic factors on resin yield, essential oil content and chemical composition of *Ferula assa-foetida* L. populations. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants* 2: 69-76.
- Mohammadi Goltapeh E, Pourjam E (2005)** Principles of mushroom cultivation. Tarbiat Modares University Press, 626p. In Persian.
- Mota KSL, Pereira FO, Oliveira WA, Lima IO, Lima EO (2012)** Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol. *Molecules* 17: 14418-33.
- Pina-Vaz C, Gonçalves Rodriguez A, Pinto E, Costa-de-Oliveira S, Tavares C, Salgueiro L, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Martinez-de-Oliveira J (2004)** Antifungal activity of *Thymus* (oils and their major compounds). *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 18: 73-78.
- Pinto E, Goncalves MJ, Hrimpeng K, Pinto J, Vaz S, Vale-Silva LA, Cavaleiro C, Salgueiro L (2013)** Antifungal activity of the essential oil of *Thymus villosus* subsp. *lusitanicus* against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *Industrial Crops and Products* 51: 93-99.
- Rao A, Zhang Y, Muend S, Rao R (2010)** Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 5062-5069. 10.1128/AAC.01050-10.
- Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A (1998)** Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): a preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46: 3741-3746.
- Sánchez MA, Turina AV, García DA, Nolan MV, Perillo MA (2004)** Surface activity of thymol: implications for an eventual pharmacological activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 34: 77-86.
- Shahriar A (2013)** Identification of pathogenic fungi in mushroom production units in Ardabil province. M.Sc Thesis, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.
- Sharma MV, Sagar A, Joshi M (2015)** Study on antibacterial activity of *Agaricus bisporus* (Lang.) Imbach. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science* 4: 553-558.
- Sokovic M, Van Griensven LJLD (2006)** Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of the cultivated button mushroom, *Agaricus bisporus*. *European Journal of Plant Pathology* 116: 211-224.
- Tanovic B, Potocnik I, Stanisavljevic B, Dordevic M, Rekanovic E (2006)** Response of *Verticillium fungicola* var. *fungicola*, *Mycogone perniciosa* and *Cladobotyrum* sp. mushroom pathogens to some essential oils. *Pesticides and Phytomedicine* 21: 231-237.
- Tsao S, Yin M (2001)** *In vitro* antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. *Journal of Medical Microbiology* 50: 646-649.
- Yang D, Michel L, Chaumont JP, Millet-Clerc J (2000)** Use of caryophyllene oxide as an antifungal agent in an *in vitro* experimental model of onychomycosis. *Mycopathologia* 148: 79-82.
- Yazgi M, Awad D, Jreikous B (2015)** Screening of the antifungal activity of plant *Mentha longifolia* crude extracts against two fungi *Alternaria citri* and *Fusarium moniliforme*. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 3: 359-364.
- Zuzarte M, Goncalves MJ, Cavaleiro C, Cruz MT, Benzarti A, Marongiu B, Maxia A, Piras A, Salgueiro L (2013)** Antifungal and anti-inflammatory potential of *Lavandula stoechas* and *Thymus herba-barona* essential oils. *Industrial Crops and Products* 44: 97-103.