مطالعه کارایی برخی اسانس‌های گیاهی و کیتوزان در کنترل *Rhizoctionia solani* عامل بیماری سوختگی غلاف برنج

The study of the efficacy of some herbal essences and chitosan in controlling *Rhizoctionia solani*, rice sheath blight fungus disease

صبا سوهانگر[۱]، وحید زرین نیا[۲*] و سعید محمدزاده نمین[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱/۲۰ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۵/۱۲

چکیده

امروزه استفاده از ترکیبات طبیعی گیاهان برای کنترل بیماری‌ها، به دلیل مزایایی که بر ترکیبات شیمیایی دارند، مورد توجه و تحقیق قرار گرفته است. استفاده از اسانس‌های گیاهی به‌دلیل داشتن خواص دارویی، ضدقارچی، ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی متابولیت‌های ثانویه در کنترل عوامل بیماری‌زا رو به پیشرفت است. در این پژوهش تأثیر کارایی سه اسانس گیاهی شامل اسانس زیره سبز (*Cuminum cyminum*)، دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*) و نعناع (*Mentha* sp.) و محلول کیتوزان در پیشگیری و در مان بیماری سوختگی غلاف برنج ناشی از قارچ *Rhizoctionia solani* در آزمایشات درون شیشه و درون زیوه مورد بررسی قرار گرفت. این آزمایش در قالب طرح آماری کاملا تصادفی با ۵۰۰ تیمار و ۳ تکرار انجام گرفت. تیمارهای مورد بررسی در این پژوهش شامل سه فاکتور اسانس هر کدام در پنج سطح غلظت (۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر) و فاکتور کیتوزان در دو سطح غلظت ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی گرم در لیتر و همچنین دو شاهد شامل شاهد مثبت (محیط کشت PDA همراه با سم تیلت) و شاهد منفی (محیط کشت سیب زمینی-دکستروز- آگار فاقد اسانس)، هر تیمار دارای سه تکرار و هر تکرار نیز خود شامل سه ظرف پتری (برای تمام تیمارها و کنترل‌های مثبت و منفی) بود. به منظور بررسی نحوه تاثیر تیمارهای مختلف روی رشد قارچ *R. solani* پس از اختلاط اسانس‌ها با محیط کشت، قطر پرگنه رشد یافته بصورت روزانه تا زمان پر شدن کامل ظرف پتری شاهد مورد بررسی قرار گرفت. درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها با بهره‌گیری از فرمول ابوت تعیین شد. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی کامل اسانس‌ها (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی اسانس‌ها (MFC) نیز محاسبه شد. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد که در آن هر اسانس به عنوان یک فاکتور و غلظت‌های مختلف اسانس‌ها، سطوح مختلف هر فاکتور در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد اسانس‌های دارچین و زیره بازدارندگی ۱۰۰ درصدی از رشد قارچ *R. solani* را در غلظت‌های ۲۰۰ ppm داشتند. همچنین اسانس نعناع و کیتوزان بازدارندگی ۱۰۰ درصدی در غلظت‌های ۶۰۰ و ۱۰۰۰ را از خودشان نشان دادند. علاوه بر این سه عصاره دارچین، زیره و نعناع با درصد بازدارندگی به ترتیب ۸۱/۶۷، ۸۲/۵۰ و ۸۳/۳۳ نتایج یکسانی را نشان دادند، کیتوزان نیز با ۵۰ درصد بازدارندگی کم‌ترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ بیماری‌زا را بر روی گیاه نشان داد.

واژگان کلیدی: سوختگی غلاف برنج، *Rhizoctionia solani*، اسانس، زیره سبز، دارچین، نعناع، کیتوزان، کنترل بیولوژیک

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه بیماری‌شناسی گیاهی، ورامین، ایران

۲- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، دانشکده کشاورزی، گروه گیاه پزشکی، تهران، ایران

۳- استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین-پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه حشره شناسی کشاورزی، ورامین، ایران

مسئول مکاتبات: zarrinnia@gmail.com

مقدمه

برنج یک ماده غذایی بسیار ارزشمند است و در عین حال مهم‌ترین محصول غله در کشورهای در حال توسعه بوده و پس از گندم، پر مصرف‌ترین محصول کشاورزی می‌باشد؛ این محصول پس از گندم بیش‌ترین اراضی کشاورزی را در جهان به خود اختصاص داده است. همچنین برنج از قدیمی‌ترین گیاهان زراعی با پیشینه هفت هزار ساله است (مجنون حسینی، ۱۳۸۳). سطح زیر کشت برنج در جهان معادل ۱۵۵ میلیون هکتار و تولید سالانه آن در حدود ۵۹۶ میلیون تن است، که قاره آسیا با سطح زیر کشت ۱۳۸ میلیون هکتار و میزان تولیدی معادل ۵۴۰ میلیون تن را به خود اختصاص داده است. از آن‌جایی که سالانه در ایران حدود ۶۰۰ هزار هکتار برنج کشت می‌شود و حدود ۴/۷ درصد از کل سطح کشت آبی کشور را تشکیل می‌دهد (بی‌نام، ۱۳۸۹) نیاز به بررسی‌های جدی در رابطه با کنترل عوامل بیماری‌زا بر روی این محصول پر ارزش در کشور احساس می‌شود. همچنین با افزایش آگاهی نسبت به اثرات سمی مواد شیمیایی برای محصولات، مصرف‌کنندگان و محیط زیست که در نتیجه باقیمانده فیتوتوکسیک و ایجاد آلودگی در آن‌ها دیده می‌شود، اهمیت فرآورده‌های طبیعی به دلیل تجزیه سریع و آسان مشخص، و تماس آن‌ها با محیط یا مدت زمانی که آن‌ها در محیط باقی می‌مانند حداقل خواهد بود و مسائلی چون ایجاد مسمومیت برای مصرف‌کنندگان و یا بروز پاتوژن‌ها و آفات مقاوم را به دنبال نخواهد داشت (Siraprakasam, 1993). قارچ عامل سوختگی غلاف *Rhizoctonia solani* می‌باشد، که شکل جنسی آن *Thanatephorus cucumeris* (A. B. Frank) Donk گزارش شده است. این قارچ به گروه آناستوسیس AG_1، درون گونه‌ای A_1 از *R. solani* تعلق دارد (صحراگرد و خداپرست، ۱۳۸۳). این بیماری در اوایل خوشه‌دهی و پر شدن دانه‌ها با بیش‌ترین سرعت توسعه می‌یابد. عامل بیماری‌زایی در فاصله کشت‌های متوالی به شکل اسکلروتیوم‌های خاکزاد و میسلیوم در بقایای گیاهی زنده می‌ماند، میسیلیوم‌ها اینوکولوم اولیه را تشکیل می‌دهند. اسکلروتیوم‌ها و قطعات اسکلروتیومی می‌توانند مبدأ رشد چندین هیف باشند. اسکلروتیوم‌ها در مناطق معتدل تولید برنج تا دو سال زنده می‌مانند و با گذشت زمان در خاک تجمع می‌یابند (صحراگرد و خداپرست،۱۳۸۳). در حال حاضر برای کنترل سوختگی غلاف دو مرتبه قارچ‌کش با زمان‌بندی بسیار حساس توصیه می‌شود (صحراگرد و خداپرست، ۱۳۸۳) از این رو اولین سمپاشی در طول مدت مرحله رشد بین اوایل طویل شدن میانگره‌ها و رشد ۵_۲/۵ سانتی‌متر خوشه در داخل پوشش خوشه و دومین سمپاشی در هنگام خروج ٪۹۰_۸۰ خوشه از ۱۰ تا ۱۴ روز بعد توصیه می‌شود. در حال حاضر چند قارچ کش جدید ویژه کنترل سوختگی غلاف مراحل ثبت را طی می‌کنند (صحراگرد و خداپرست، ۱۳۸۳). رهیافت‌های سنتی برای دستکاری یا انهدام اینوکولوم به منظور کنترل سوختگی غلاف اغلب بی‌تأثیر یا غیرممکن هستند. سوزاندن کاه و کلش برنج برای کاهش اینوکولوم اسکلروتیومی علمی نبوده و در صورت انجام، کاهش تراکم اسکلروتیوم ها به‌حدی نخواهد بود که مانع از گسترش بیماری در کشت بعدی گردد. تناوب طولانی با محصولات غیر میزبان معمولا از لحاظ اقتصادی عملی نیست. استفاده از تناوب برای کنترل بیماری نیز دشوار است، زیرا عامل بیماری به طور گسترده بیماری وسیع ایجاد می‌کند و می‌تواند روی گیاهان هرز و میزبان‌های واسطه‌ای مثل سویا سورگوم که معمولا در تناوب با برنج استفاده می‌شوند جمعیتش را حفظ کند. سوختگی هوایی سویا ناشی از همین عامل بیماری در ایالات متحد از نظر شیوع و شدت در حال افزایش است. همچنین تولید فراوان اسکلروتیوم‌ها روی سویا میزان بالای اینوکلوم را در خاک حفظ می‌کند (صحراگرد و خداپرست،۱۳۸۳). برای مبارزه با این بیماری از تلفیق چند روش مانند کاشت بذر و نشاء سالم، جمع‌آوری و سوزانیدن بقایای آلوده گیاهی، ضدعفونی ادوات کشاورزی، کاشت ارقام مقاوم به همراه مبارزه شیمیایی استفاده می‌شود (الهی‌نیا، ۱۳۸۴). ترکیبات شیمیایی مصنوعی، علاوه بر آلودگی‌های زیست محیطی، سلامت بشر را نیز تهدید می‌کنند (Afzal *et al.*, 1979). در نتیجه جستجو برای جایگزین کردن عوامل ضدمیکروبی طبیعی یا آفت کش‌های زیستی برای کنترل این بیماری‌ها مورد نیاز است. گیاهان معطر غنی از اسانس‌های گیاهی هستند که خواص ضدمیکروبی قابل توجهی دارند و نقش مهمی در حفاظت گیاهان دربرابر میکروارگانیسم‌ها، حشرات و برخی گیاه خواران ایفا می‌کنند. در مورد بکارگیری اسانس‌های گیاهی در کنترل عوامل بیماری‌زای قارچی در

سال‌های اخیر تحقیقاتی برای شناسایی گیاهان با خواص ضدقارچی با هدف استفاده در کنترل عوامل بیماری‌زای قارچی انجام شده است (Muthulakshmiea and Tharaman, 1993). مطالعه در زمینه وظیفه این ترکیبات در گیاهان به یک موضوع جذاب و مهم برای بسیاری از پروژه‌های تحقیقاتی تبدیل شده است و نقش اکولوژیکی تعدادی از این ترکیبات مورد بررسی و تحقیق قرار گرفته است. به نظر می‌رسد که متابولیت‌های ثانویه به عنوان موادی طبیعی نقش اکولوژیکی مهمی در واکنش‌های دفاعی گیاهان دارند و در دفاع از گیاه در مقابل آفات و بیماری‌ها موثر می‌باشند (Cowan,1999). هدف از این پژوهش بررسی اثر بازدارندگی عصاره گیاهی زیره سبز، نعناع و دارچین به همراه محلول کیتوزان بر رشد قارچ عامل سوختگی غلاف گیاه زراعی برنج می‌باشد.

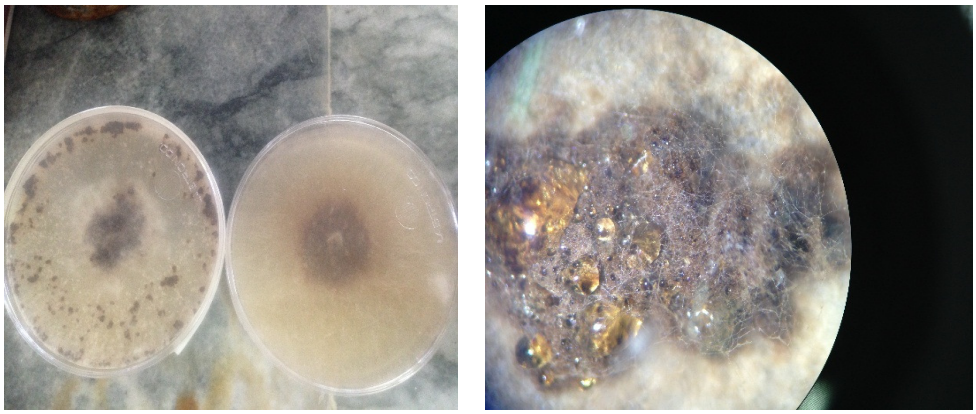
مواد و روش‌ها

تهیه محیط کشت PDA

در این پژوهش از محیط کشت PDA توسط دکستروز آگار تجاری و سیب‌زمینی تهیه گردید. برای تهیه این محیط ۳۹ گرم از این محیط به یک لیتر آب اضافه شد و در فشار PSI ۱/۵ و دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس اتوکلاو شد و پس از کمی خنک شدن در شرایط استریل و زیر هود داخل تشتک‌های پتری قسمت شد (جلالی، ۱۳۹۲).

تهیه قارچ *R solani* عامل بیماری سوختگی غلاف برنج

سویه قارچ ازکلکسیون قارچ شناسی مرکزتحقیقات برنج آمل تهیه شد (شکل ۱).



شکل ۱- پرگنه *R solani* روی محیط کشت PDA

Fig. 1. The colony of *R. solani* on the culture medium of PDA

تهیه اسانس‌های گیاهان دارچین، زیره سبز و نعناع

جهت تهیه اسانس‌های مورد نیاز از گیاهان دارچین، زیره سبز و نعناع از روش تقطیر با بخار آب از دستگاه کلونجر استفاده شد. بدین منظور حدود ۱۰۰ گرم از اندام‌های پودر شده هر گیاه درون بالن دستگاه ریخته و ۵۰۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد. عمل گرمادهی برای هر گیاه به مدت چهار ساعت انجام شد. بعد از اتمام این مدت، اسانس‌ها به دلیل پایین بودن چگالی در سطح آب قرار گرفته و با خارج نمودن آب از شیر تحتانی دستگاه به آسانی جداسازی می‌شوند. برای تهیه مقادیر بیش‌تر اسانس، برای هر گیاه این عمل چند بار تکرار شد. اسانس‌ها به منظور جلوگیری از اکسید شدن در ظروف با رنگ تیره و در یخچال با دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری گردید.

تهیه بذر

بذر برنج رقم حساس (ندا) توسط دکتر خسروی از مرکز تحقیقات برنج آمل تهیه گردید.

تهیه کیتوزان

جهت تهیه محلول کیتوزان، پودر کیتوزان (خریداری شده از شرکت سیگما) در محلول ۰/۵ درصد اسید استیک گلایسیال به طور کامل حل و pH محلول ۰/۱ نرمال به ۵/۶ رسانده شد.

بررسی اثر اسانس‌ها و محلول کیتوزان در محیط درون شیشه

تیمارهای مورد بررسی شامل سه فاکتور اسانس و یک فاکتور کیتوزان یک درصد بود. اسانس‌ها هرکدام در پنج سطح غلظتی ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰ میلی‌گرم اسانس در لیتر و محلول کیتوزان در دو سطح غلظتی ۸۰۰ و ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر و دو شاهد شامل شاهد مثبت (محیط کشت PDA همراه با سم تیلت) و شاهد منفی (محیط کشت PDA فاقد اسانس) بود. هر تیمار دارای سه تکرار و هر تکرار نیز خود شامل سه ظرف پتری (برای تمام تیمارها و کنترل‌های مثبت و منفی) است. به منظور بررسی نحوه تاثیر تیمارهای مختلف روی رشد قارچ *R. solani* پس از اختلاط اسانس‌ها با محیط کشت، قطر کلونی رشد یافته بصورت روزانه تا زمان پر شدن کامل ظرف پتری شاهد محاسبه شد. درصد بازدارندگی غلظت‌های مختلف اسانس‌ها با بهره‌گیری از فرمول ابوت تعیین شد. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی کامل اسانس‌ها (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کشی اسانس‌ها (MFC) نیز محاسبه شد. این آزمایش بصورت فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. که در آن هر اسانس به عنوان یک فاکتور و غلظت‌های مختلف اسانس‌ها، سطوح مختلف هر فاکتور در نظر گرفته شد. داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه آماری شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

$$\text{درصدبازدارندگی اسانس} = \frac{\text{قطر کلنی تیمار} - \text{قطر کلنی شاهد}}{\text{قطر کلنی شاهد}} \times ۱۰۰$$

آماده‌سازی نشاءهای برنج و کاشت برنج

به منظور کشت برنج رقم ندا ابتدا بذرها به‌مدت ۲۴ ساعت خیسانده شد و سپس به‌وسیله هیپوکلریت سدیم رقیق شده (با ۱٪ کلر فعال) برای مدت یک ساعت ضدعفونی و پس از آن با آب مقطر چهار بار شستشو شد. در مرحله بعدی بذور برای مدت ۲۴ ساعت مجدداً خیسانده شده و سپس داخل ظروف پتری نه سانتی‌متری که برای حفظ رطوبت بالا حاوی کاغذ صافی مرطوب بودند، منتقل شد. بذور برای مدت ۴۸ ساعت در اتاقک رشد (ژرمیناتور) با دمای ۲۸ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از گذشت این مدت، بذور جوانه‌زده شده برای کاشت آماده گردیدند. به منظور کشت برنج از بطری‌های دو تا سه لیتری نوشابه استفاده شد. بدین صورت که یک چهارم انتهایی این بطری‌ها از انتها بریده شد و همانند یک گلدان از خاک پر شد. درون هر گلدان با خاک دربردارنده خاک مزرعه، کود دامی و ماسه به ترتیب ۲:۱:۵، پر گردید. همچنین به ازاء هر یک کیلوگرم خاک یک گرم کود فسفات آمونیوم ($(NH_4)_2 PO_4$) و یا اوره به خاک اضافه شده و بخوبی مخلوط گردید. به منظور کاشت رقم مذکور ابتدا خاک گلدان‌ها ۲۴ ساعت قبل از کاشت بذور برنج خیسانده شد. سپس درون هر گلدان پلاستیکی شیارهایی با فاصله دو سانتی‌متر و با عمق یک برابر و نیم بذر ایجاد گردید و بذور درون شیارها کاشته شد. بعد از کاشت بذور درون شیارها روی آن‌ها با خاک نرم پوشانده و به آرامی آبیاری شدند و سپس سه چهارم بالایی بطری به جای خود برگردانده شد و بطری‌ها به منظور رشد نشاءها به درون گلخانه انتقال یافت. همچنین به گیاهچه‌های برنج در مرحله دو برگی به منظور رشد بهتر کود اوره به نسبت یک در هزار و به مقدار ۵۰ سی‌سی به ازای هر گلدان اضافه شد. بعد از رشد بذور و رسیدن گیاهچه‌ها به مرحله دو تا سه برگی آزمون بیماری‌زایی آغاز شد.

تاثیر تیمارهای اسانس‌های گیاهی و کیتوزان روی بیماری سوختگی غلاف برنج در شرایط درون زیوه

این بررسی در قالب طرح آماری کاملا تصادفی با ۵۰۰ تیمار و ۳ تکرار انجام گرفت. در این آزمایش به ازای هر تیمار ۱۲ گیاهچه برنج در سه تکرار که شامل چهار گیاهچه برای هر تکرار است در نظر گرفته شد. در این آزمایش

شاهد منفی (در این کنترل به جای اسانس آب مقطر استریل روی سطح گیاه پاشیده شد)، شاهد مثبت (در این شاهد به جای اسانس سم بنومیل روی سطح گیاه پاشیده شد) و شاهد تویین نیز مورد بررسی قرار گرفت. هر سه شاهد ذکر شده نیز در سه تکرار و هر تکرار شامل چهار گیاهچه بود. بعد از گذشت هفت تا ده روز که علائم بیماری به‌طور کامل ظاهر شد، ارزیابی علائم و تعیین شاخص شدت بیماری (Disease severity index) آغاز گردید. به منظور ارزیابی شدت بیماری، گیاهچه‌های علائم‌دار، از روی سطح خاک بریده شد و طول ناحیه آلوده که دارای علائم بیماری است با استفاده از یک خط‌کش بر حسب میلی‌متر محاسبه شد، همچنین طول کل غلاف نیز محاسبه گردید. در مرحله بعد طول ناحیه آلوده (علائم آلودگی روی غلاف) به طول کل غلاف تقسیم شد. این محاسبه برای تمام گیاهچه‌های هر تکرار و برای تمام تکرارهای هر تیمار انجام شد. میانگین شاخص بیماری برای گیاهچه‌های هر تکرار محاسبه و سپس اعداد به‌دست آمده به عنوان شاخص شدت بیماری برای هر تکرار از هر تیمار مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله بعد محاسبه درصد بازدارندگی از گسترش بیماری برای هر اسانس محاسبه شد.

$$\text{درصد بازدارندگی از بیماری یا آلودگی} = \frac{\text{میانگین شاخص بیماری در هر تیمار عصاره} - \text{میانگین شاخص بیماری در تیمار شاهد}}{\text{میانگین شاخص بیماری در تیمار شاهد}} \times 100$$

این آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تکرار انجام شد. که در آن هر اسانس به عنوان یک فاکتور و غلظت‌های مختلف اسانس‌ها، سطوح مختلف هر فاکتور در نظر گرفته می‌شود. داده‌های حاصله با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS تجزیه آماری شدند و مقایسه میانگین‌ها با آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت.

آزمون بیماری‌زایی

ابتدا مقداری دانه گندم پوست کنده نشده در ارلن با مقدار کمی آب مخلوط وسپس در شرایط استریل ۳ بار اتوکلاو شد. پس از نرم شدن دانه‌های گندم درون اتوکلاو، قطعات از محیط کشت حاوی قارچ *R. solani* به گندم‌ها اضافه شده و سپس بر روی دستگاه شیکر به مدت ۴۸ ساعت قرار داده شد تا گندم‌ها کاملا به قارچ آغشته شوند. پس از آلودگی مام دانه‌های گندم به قارچ، گندم‌ها به تعداد مساوی بر روی سطح خاک در قسمت طوقه‌ی برنج قرار داده شدند. و در تمام طول دوره آزمایش رطوبت به میزان ۱۰۰-۹۰ درصد و درجه دمایی ۲۹-۳۱ درجه سلسیوس رعایت گردید. علائم بیماری بعد از یک هفته به صورت نقاط آبسوخته مانند، در غلاف برگ ظاهر شد. نقاط آلوده به شکل بیضی کشیده یا گاهی نامنظم به طول ۱ تا ۳ سانتی‌متر به رنگ سبز خاکستری نمایان می‌گردند. مرکز لکه‌ها به تدریج خاکستری متمایل به سفید و حاشیه آن‌ها قهوه-ای می‌شوند.

نتایج

اثر بازدارندگی اسانس‌ها و کیتوزان بر روی قارچ *R. solani* در شرایط درون شیشه

اثر بازدارندگی اسانس‌ها و کیتوزان بر روی قارچ *R. solani* در شرایط درون شیشه در نمودار ۱ نشان داده شده است. ظروف حاوی محیط کشت (PDA) و قارچ همراه با غلظت‌های مختلف اسانس دارچین (۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰ ppm) در روزهای مختلف بر اساس مقدار رشد قارچ مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با گذشت سه روز از رشد قارچ و پر شدن نمونه شاهد، تیمار اسانس دارچین با غلظت‌های (۱۰۰۰، ۸۰۰، ۶۰۰، ۴۰۰، ۲۰۰ و ۱۰۰ ppm) موجب توقف رشد میسلیوم و پرگنه قارچ بیماری‌زا شده و ۱۰۰ درصد بازدارندگی داشت. تیمار اسانس دارچین با غلظت ۱۰۰ppm، ۹۳ درصد بازدارندگی داشت (کم‌ترین بازدارندگی). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اسانس دارچین بر میزان بازدارندگی از رشد قارچ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار است. شایان ذکر می‌باشد که اثر بازدارندگی اسانس دارچین به‌همراه کیتوزان روی گیاه برنج بازدارندگی کم‌تری را نسبت به محیط کشت حاوی قارچ عامل بیماری سوختگی غلاف نشان داد. ظروف حاوی

محیط کشت و قارچ همراه با غلظت‌های مختلف اسانس زیره و مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با گذشت سه روز از رشد قارچ و پر شدن نمونه شاهد، تیمار اسانس زیره با غلظت‌های (ppm ۲۰۰، ۴۰۰، ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰) موجب توقف رشد میسلیوم و پرگنه قارچ بیماری‌زا شد و ۱۰۰ درصد بازدارندگی نشان داد (بیش‌ترین بازدارندگی). تیمار اسانس زیره با غلظت ۱۰۰ppm، ۹۳ درصد بازدارندگی داشت (کم‌ترین بازدارندگی). نتایج تجزیه واریانس نشان داد (جدول ۱) که اثر اسانس زیره بر میزان بازدارندگی از رشد قارچ در سطح یک درصد معنی‌دار است. همچنین ظروف حاوی محیط کشت سیب زمینی، دکستروز، آگار و قارچ همراه با غلظت‌های مختلف اسانس نعنا در روزهای مختلف بر اساس مقدار رشد قارچ مورد بررسی قرار گرفته شد. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با گذشت سه روز از رشد قارچ و پر شدن نمونه شاهد، تیمار اسانس نعناع با غلظت‌های (ppm ۶۰۰، ۸۰۰، ۱۰۰۰) موجب توقف رشد میسلیوم و پرگنه قارچ بیماری‌زا شد و ۱۰۰ درصد بازدارندگی داشت (بیش‌ترین بازدارندگی). تیمار اسانس نعناع با غلظت ppm ۴۰۰، ۹۲ درصد بازدارندگی داشت (کم‌ترین بازدارندگی).نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اسانس نعناع بر میزان بازدارندگی از رشد قارچ در سطح یک درصد معنی‌دار است.

جدول ۱- نتایج تجزیه واریانس میانگین درصد بازدارندگی اسانس‌های گیاه دارچین، زیره، نعناع و کیتوزان تحت شرایط درون شیشه

Table 1. Analysis of variance percentage of inhibition plant essence of cinnamon, cumin, mint and chitosan in vitro

S.O.V	منابع تغییر	درجه آزادی df.	میانگین مربعات Ms.	معنی‌داری Significance
Treatment	تیمار	19	28160.400	0000.0
Error	خطا	40	4.000	
Total	کل	59	28164.400	

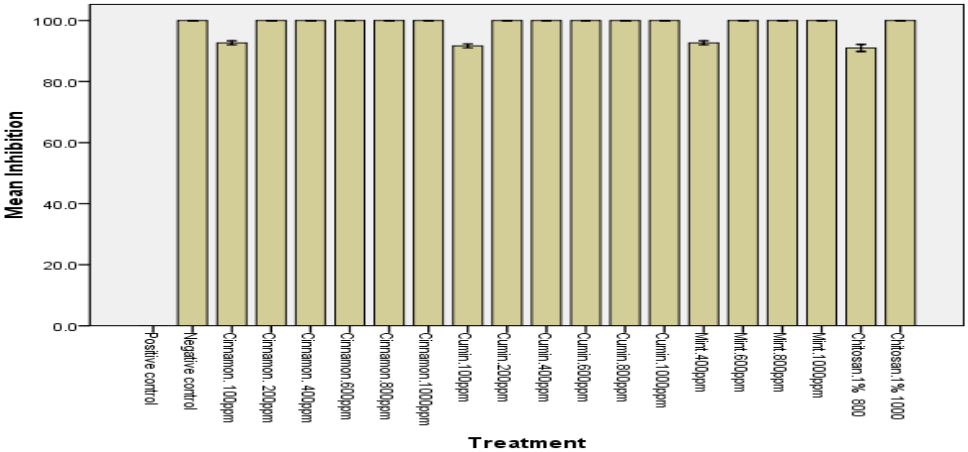
ظروف حاوی محیط کشت سیب زمینی، دکستروز، آگار و قارچ همراه با غلظت‌های مختلف محلول کیتوزان ۱٪ (۸۰۰ppm، ۱۰۰۰) در روزهای مختلف بر اساس مقدار رشد قارچ مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها نشان داد که با گذشت سه روز از رشد قارچ و پر شدن نمونه شاهد، تیمار محلول کیتوزان ۱٪ با غلظت (۱۰۰۰ ppm) موجب توقف رشد میسلیوم و پرگنه قارچ بیماری‌زا شد و ۱۰۰ درصد بازدارندگی داشت (بیش‌ترین بازدارندگی). نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر محلول کیتوزان ۱٪ بر میزان بازدارندگی از رشد قارچ در سطح احتمال یک درصد معنی‌دار شد.

به طور کل حداقل غلظت کشندگی (MFC) و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس‌های دارچین زیره و نعناع و محلول کیتوزان ۱٪ بر روی قارچ *R. solani* در شرایط درون شیشه در جدول یک نشان داده می‌شود (جدول ۲).

درصد بازدارندگی غلظت اسانس‌های نعناع، دارچین، زیره و محلول کیتوزان ۱ درصد بر روی قارچ *R. solani* در شرایط درون زیوه (*In vivo*)

مقایسه میانگین درصد بازدارندگی محلول کیتوزان و اسانس‌های دارچین، زیره، نعناع و محلول کیتوزان بر روی قارچ *R. solani*، در گیاه برنج در شرایط *In vivo* در نمودار ۲ نشان داده شده است. مقایسه میانگین داده‌های مربوط به اثر اسانس دارچین نسبت به شاهد روی قارچ بیماری‌زای *R. solani* نشان داد که غلظت ppm ۲۰۰۰ اسانس دارچین موجب جلوگیری از رشد قارچ در گیاه برنج شد و رشد قارچ را متوقف کرد و به میزان ۸۱/۶۷ درصد، بازدارندگی داشت. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اسانس دارچین بر میزان بازدارندگی از رشد قارچ بر روی گیاه در سطح یک درصد معنی‌دار است.

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به اثر اسانس زیره نسبت به شاهد نشان داد، غلظت ppm ۲۰۰۰ اسانس زیره موجب جلوگیری از رشد قارچ در گیاه برنج شد و رشد قارچ را متوقف کرد و به میزان ۸۲/۵۰ درصد، بازدارندگی داشته است نتایج تجزیه واریانس نشان داد (جدول ۳) که اثر اسانس زیره بر میزان بازدارندگی از رشد قارچ بر روی گیاه در سطح یک درصد نسبت به شاهد معنی‌دار است.



نمودار ۱- مقایسه میانگین غلظت‌های مختلف اسانس‌ها و محلول کیتوزان یک درصد بر روی قارچ *R. solani* در شرایط درون شیشه (*In vitro*).

Fig 1. Mean comparison of different concentration of essence oils and soluble chitosan 1% on *R. solani* fungus *in vitro* conditions

جدول ۱- حداقل غلظت کشندگی (MFC) و حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) اسانس‌های دارچین زیره و نعناع و محلول کیتوزان ۱٪ بر روی قارچ *R. solani* در شرایط درون شیشه

Table 1. The minimum fungi concentration (MFC) and the minimum inhibitory concentration (MIC) of essence oils of cinnamon, cumin and mint and 1% soluble chitosan on *R. solani* fungus *in vitro.*

Essences	اسانس‌ها	MFC (ppm)	MIC (ppm)
Cinnamon	دارچین	200	200
Cuminum	زیره	0	200
Mentha	نعناع	0	600
Chitosan 1%	کیتوزان ۱٪	1000	1000

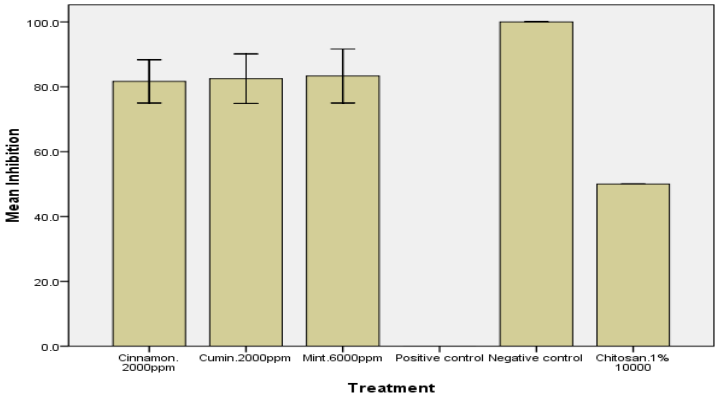
جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس میانگین درصد بازدارندگی اسانس‌های مذکور و کیتوزان بر روی قارچ

Table 3. Analysis of variance of the essence containment and chitosan on fungi

Source	منابع تغییرات	درجه آزادی df.	مجموع مربعات Ms.	معنی‌داری Significance
Treatment	تیمار	5	19757.292	000.0
Error	خطا	12	258.333	
Total	کل	17	20015.625	

مقایسه میانگین داده‌های مربوط به اثر اسانس نعناع نسبت به شاهد نشان داد، غلظت ppm ۶۰۰۰ اسانس نعناع موجب جلوگیری از رشد قارچ در گیاه برنج شد و رشد قارچ را متوقف کرد و به میزان ۸۳/۳۳ درصد، بازدارندگی داشته است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر اسانس نعناع بر میزان بازدارندگی از رشد قارچ بر روی گیاه در سطح ۱ ٪ معنی‌دار است. اثر محلول کیتوزان ۰/۱ درصد در جلوگیری از بروز بیماری سوختگی

غلاف (شیت بلایت) در گیاه برنج مقایسه میانگین داده‌های مربوط به اثر محلول کیتوزان ۰/۱ نسب به شاهد روی قارچ بیماری‌زای *R. solani*. نشان داد که غلظت ۱۰۰۰۰ ppm محلول کیتوزان ۰/۱ موجب جلوگیری از رشد قارچ در گیاه برنج شد و رشد قارچ را متوقف کرد و به میزان ۵۰ درصد، بازدارندگی داشته است. نتایج تجزیه واریانس نشان داد که اثر محلول کیتوزان ۱٪ بر میزان بازدارندگی از رشد قارچ بر روی گیاه در سطح ۱٪ معنی‌دار است.



نمودار ۲- مقایسه میانگین درصد بازدارندگی اسانس‌های دارچین، زیره، نعناع و محلول کیتوزان بر روی قارچ *R. solani* در گیاه برنج در شرایط (*In vivo*)

Fig 2. The mean percentage inhibition of essence oils of cinnamon, cumin, mint and chitosan solution on *R. solani* fungus growth in greenhouse conditions (*In vivo*)

بحث

در مورد نتایج تاثیر اسانس‌های مختلف بر روی قارچ عامل سوختگی غلاف به روش اختلاط اسانس‌ها با محلول کیتوزان ۱٪ میانگین قطر پرگنه‌ها با شاهد اختلاف معنی‌داری در تمام تیمارها وجود داشته است. نتایج به‌دست آمده در شرایط درون شیشه نشان داد، در محیط کشت قطر پرگنه قارچ بیماری‌زا به روش اختلاط با محیط کشت مورد بررسی قرار گرفت. در این پژوهش نتایج به دست آمده نشان داد که هر سه اسانس مورد مطالعه و محلول کیتوزان موجب بازدارندگی ۱۰۰ درصدی از رشد قارچ شد. بیش‌ترین بازدارندگی مربوط به اسانس دارچین و زیره می‌باشد که در غلظت ۲۰۰ ppm اثر ۱۰۰ درصد بازدارندگی دارد. اسانس‌های نعناع و محلول کیتوزان بیش‌ترین بازدارندگی را به ترتیب در غلظت‌های ۶۰۰ppm و ۱۰۰۰ppm دارند. در بررسی میزان کشندگی قارچ (MFC) مشخص شد که اسانس دارچین به طور قابل توجهی باعث کشندگی قارچ *R. solani* شد و غلظت (MFC) برابر با غلظت (MIC)، (۲۰۰ppm) شده است. همچنین نتایج به دست آمده در شرایط درون زیوه بر روی گیاه نشان داد که سه اسانس دارچین، زیره و نعناع با درصد بازدارندگی به ترتیب ۸۱/۶۷، ۸۲/۵۰ و ۸۳/۳۳ نتایج یکسانی را نشان دادند، در صورتی که کیتوزان با درصد بازدارندگی ۵۰ کم‌ترین میزان بازدارندگی از رشد قارچ بیماری‌زا را بر روی گیاه نشان داد. مینوئیان حقیقی و خسروی (۱۳۸۸) در تحقیق مشابهی تاثیر اسانس گیاهان مختلف از جمله زیره سبز بر روی رشد قارچ‌های *Aspergillus fumigatus* و *Aspergillus flavus* آزمایش کردند. یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که اسانس‌های مذکور دارای عملکرد مناسب ضد قارچی علیه *A. fumigatus* و *A. flavus* می‌باشند. در تحقیقات آقاباباگلی و بهداد (۱۳۹۱) بررسی اثر اسانس گل‌های اسطوخودوس، بذور رازیانه، زیره سبز و میسیلیوم نعناع فلفلی روی قارچ‌های عامل پوسیدگی و کپک‌زدگی پس از برداشت توت فرنگی شامل *Aspergillus niger*، *Botrytis cinerea*، *Rhizopus stolonifera* در غلظت‌های ۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵میکرولیتر در لیتر روی محیط کشت PDA نشان داد که اسانس‌های رازیانه و زیره سبز دارای فعالیت ضدقارچی بوده و در غلظت ۱۵۰۰ میکرولیتر در لیتر برای آزمایش در شرایط *in vitro* انتخاب گردیدند.

رودریگز (۲۰۰۷) تاثیر اسانس‌های گونه‌های مختلفی از جنس *Flourensia* بر روی *Fusarium oxysporum* بررسی کرد که در آن‌ها سه گونه *F. cernua*، *F. flourensia F. retinophylla* در غلظت 1 / ۱۵۰۰ µl بازدارندگی داشته است. گاناپاتی و نارایاناسامی (۱۹۹۳) بیش از ۵۳ فرآورده‌های گیاهی را برای *Puccinia archidis* آزمایش کرد که در میان این عصاره برگ گیاه چریش با نام علمی *Azadirachta india* بیماری را کنترل کرد و اسانس برگ خرزهره و اکالیپتوس از جوانه‌زنی یوریدیوسپور قارچ جلوگیری کردند. تاثیر اسانس‌های آبی پیاز سیر، ریزوم زنجبیل، برگ ریحان و بذر چریش درکنترل آلودگی‌های قارچی *Alternaria padwickii* بذور برنج (Shetty *et al*., 1989). اسانس گیاهان نعناع و سیر در کاهش آلودگی‌های قارچی *Colletotrichum corchori* داشته است (Alice and Rao, 1986) و نیز ممانعت عصاره گیاه سیر از جوان‌زنی اسپور و رشد میسیلیومی قارچ‌های پاتوژن کنف *Botryodiplodia theobromae* و *Macrrophomina phaseolina* از مصادیق بارز مدیریت بیماری‌های نوین می‌باشد (Ahmed and Sultana, 1984). اسانس گیاه سیر در کنترل بیماری سفیدک خیار، رز و غیره نیز مؤثر می‌باشد. نوع حلال در استخراج متابولیت‌های فعال گیاه موثر است و عصاره گیاه در حلال‌های مختلف می‌تواند اثرات متفاوتی در کنترل بیمارگرهای گیاهی داشته باشد. وجود ترکیب‌های مفید بازدارنده در گیاهان ذخیره ارزشمندی را در اختیار پژوهشگران قرار داده است انجام مطالعات گسترده در این زمینه راهی جهت دستیابی به روش‌های جدید نوین و ایمن‌تر به منظور کنترل عوامل بیماری‌زا گیاهی خواهد بود (عبدالملکی و همکاران، ۱۳۹۰).

منابع References

آقاباباگلی، م. و بهداد، ا. ۱۳۹۱ .تأثیر سه نوع اسانس گیاهی روی رشد قارچ *Alternaria solani*. پژوهش در علوم کشاورزی، ش ۱ :۵۷-۴۵

الهی‌نیا، ع. ۱۳۸۴. بیماری‌شناسی گیاهی و شناخت قارچها و سایر عوامل بیماری‌زا در گیاهان. انتشارات دانشگاه گیلان، رشت.

بی‌نام. ۱۳۸۹. آمارنامه کشاورزی ایران. انتشارات وزارت جهاد کشاورزی ، تهران.

جلالی، س. ۱۳۹۲. مبارزه بیولوژیکی با *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* با استفاده از آنتاگونیست‌های ریزوسفر گوجه فرنگی. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه زابل.

مینوئیان حقیقی، م. ح. و خسروی، ع. ۱۳۸۸. اثرات اسانس‌های گیاهی بر دو گونه مهم آسپرژیلوس، افق دانش، مجله دانشکده علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی گناباد ۱۵(۴): ۱۵-۵.

مجنون حسینی، ن. ۱۳۸۳. زراعت غلات (گندم، جو و برنج و ذرت). انتشارات نقش مهر، تهران. ۱۱۵ صفحه.

عبدالملکی، م.، بهرامی‌نژاد، ص. و عباسی، س. ۱۳۹۰. بررسی اثرات ضدقارچی عصاره‌های برخی گیاهان علیه چهار قارچ بیماری‌زای گیاهی. فصلنامه گیاهان دارویی ۲(۳۸): ۱۵۵-۱۴۸.

Afzal, M. R., Cheema, A. and Chaudhary, R. A. 1979. Incidence of aflatoxin producing fungi in animal feed stuff. Mycopathologia 69(3): 149-51.

Ahmed, N. and Shultana, K. 1984. Fungitoxic effect of garlic on treatment of jute seed. Bangladesh Journal Botology 13: 130-136.

Alice, D. and Rao, A. V. 1986. Management of seed-borne *Drechslera oryzae* of rice with plant extracts. International Rice Research Newsletter11: 19-24.

Cowan, M. M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clinical Microbiology Reviews 12: 564-582.

Ganapathy, T. and Narayanasamy, P. 1993. Effect of plant products on lesion development of cowpea by tomato Spotted wilt virus. Crop disease innovative techniques and management, pp. 315-318.

Muthulakshmi, P. and See Tharaman, K. 1993. Use of Plant extracts in the management of fruit rot disease of chilli caused by *Alternaria tenuis*. Crop disease innovative techniques and management. 295-302.

Shetty, S. A., Prakash, H. S. and Shetty, H. S. 1989. Efficacy of certain plant extracts against seed-borne infection of *Trichoconiella padwickii* in paddy (*Oryza sativa*). Canadian Journal of Botology 57: 1956-1958.

Sivaprakasam, K. 1993. Management of fungal diseases by plant products. Crop disease innovative techniques and management, pp. 107-111.