بررسی تاثیر ضد قارچی عصاره آبی چهار گیاه دارویی بومی ابرکوه بر *Phytophthora sp* عامل بیماری پوسیدگی طوقه پسته در محیط کشت قارچ

مهرداد امیدسالاری [1]*،حمید صادقی[2]، علی رضا نیازمند[2]

1. فارغ التحصیل کارشناسی ارشد باغبانی-گیاهان دارویی دانشگاه آزاد جهرم

2. اعضاء هیات علمی گروه زیست شناسی دانشگاه آزاد جهرم

*نویسنده مسئول، مهرداد امیدسالاری ،یزد، ابرکوه، خیابان نظامیه، روبروی پارک شهر، داروخانه گیاهی حکیم

m.omidsalary@gmail.com

چکیده:

فیتوفتورا قارچی بیمارگر از اُامیست ها می باشد که باعث آلودگی و خسارت در گیاهان مختلف از جمله پوسیدگی طوقه درخت پسته می شود. قارچ جمع آوری شده از درختان مشکوک به بیماری، واقع در منطقه شهرستان ابرکوه با کمک تیمار های برگ نارنج و بذر شاهدانه جوشانده شده، جداسازی و به روش رئوس هیف خالص سازی صورت گرفت. به قارچ ها در محیط کشت آزمایشگاهی، غلظت های ٪10، ٪20، ٪30، ٪40 و ٪50 در 5 تکرار از 4 عصاره آبی گیاهان دارویی اضافه شد. در ضمن به منظور این که پتانسیل اسمزی در مقایسه نتیجه ها با یکدیگر تاثیری نداشته باشد، برای تیمار شاهد با اضافه نمودن PEG، غلظت های مشابه ای نسبت به سایر سطح های غلظت تیمار ها ساخته شد. آزمایش در قالب طرح کاملا تصادفی و با در نظر گرفتن فاکتور قطر رشد هاله قارچ در پتریدیش حاوی محیط کشت آگار از نوع CMA، به مدت دو هفته انجام پذیرفت. آنالیز آماری با نرم افزار SPSS از طریق واریانس نشان داد که تمام عصاره ها اختلاف معنی داری نسبت به تیمار شاهد در عملکرد ضد قارچی دارند. گروه بندی دانکن عصاره های ریحان و پونه وحشی را، در موثرترین گروه قرار داد. کمترین غلظت موثر بازدارندگی (MIC) مربوط به عصاره سطح ٪10 ریحان می باشد. ضمنا عدم رشد فیتوفتورا در غلظت های ٪40 و ٪50 عصاره های ریحان و پونه وحشی دیده شد.

واژگان کلیدی: عصاره آبی، گیاه دارویی، قارچ فیتوفتورا، پسته.

مقدمه:

در سال های اخیر به دلیل بروز برخی مشکلات و تهدید های ناشی از مصرف بی رویه سموم شیمیایی در عرصه کشاورزی، گرایش زیادی به استفاده از پتانسیل بالقوه مواد بیولوژیکی در کنترل حشرات، بیماری ها و علف های هرز ایجاد شده است (Ghasemi, ۲۰۰۳؛ Tamietti, ۲۰۰۱؛ Edris,۲۰۰۴) . در این بین، گیاهان دارویی همواره به عنوان یکی از مهمترین منابع فعال زیستی مورد توجه بوده اند (Nayeemulla,۲۰۰۶؛ Cowan, ۱۹۹۹) . قارچ ها به طور مستقیم و غیر مستقیم بر بشر و حیوان ها تاثیر می گذارند. بیش از 100000 گونه قارچ وجود دارند که خسارات قابل توجهی به کشاورزی و محصولات غذایی وارد می کنند (Sati,۲۰۱۱) .

در کشاورزی مدرن کاربرد آفت کش های شیمیایی هنوز یک روش موثر و کارآمد برای کنترل بیمارگرهای گیاهی است. بهر حال کاربرد آن ها در کشاورزی به دلیل آلودگی زیست محیطی و اثر های مخرب روی انواع ارگانیسم های غیر هدف در حال کم رنگ شدن است (Shahidi Bonjar, ۲۰۰۴) . فیتوفتورا جنسی مهم از بیمارگرهای گیاهی اُامیست[1] است (Brasier, ۱۹۹۲) . این جنس دارای 67 گونه ی شناخته شده می باشد که همگی آن ها از بیمارگرهای مهم گیاهی و از عوامل پوسیدگی ریشه، ساقه، برگ و میوه روی طیف وسیعی از گیاهان میزبان (بیش از هزاران گونه گیاهی) از جمله تعداد زیادی از درختان، گیاهان زینتی و گیاهان زراعی در جهان هستند و سالانه موجب میلیاردها دلار خسارت در سراسر دنیا می شوند (Ervin, ۱۹۹۶؛ Ma, ۲۰۰۵ ؛ ۲۰۰۴ Hausbeck,). درختان جوانی که آلودگی شدید به این بیماری دارند، اغلب سبز خشک می گردند، در حالی که در درختان مسن تر علائمی نظیر ضعف و زوال تدریجی، خشکیدگی سرشاخه ها و نهایتا مرگ درخت مشاهده می گردد (Ogawa, ۱۹۹۱) .

مواد و روش ها:

جمع آوری قارچ فیتوفتورا

در اواخر بهار از 5 باغ بزرگ پسته شرق ابرکوه، 5 نمونه مشکوک به آلودگی از طوقه درختان جمع آوری گشت. به این صورت که خاک اطراف طوقه کنار زده شد، مقداری از بافت درخت را جدا نموده، و سپس تکه های چوب در نایلون بسته بندی، به محل آزمایشگاه منتقل شدند. از نمونه ها، قطعه های 0/5 سانتی متری (5 میلی متری) تهیه شده و پس از شستشو با آب مقطر آن ها را در محیط کشت CMA[2] قرار داده تا قارچ های موجود بر رویشان، رشد نمایند.

[1] Oomycete

[2] Corn Meal Agar

در ادامه پس از گذشت 8 روز از کشت نمونه ها، نمونه های خالص شناسایی شدند. آن ها به روش رئوس هیف[3] خالص سازی و از نمونه های خالص برای آلوده نمودن محیط کشت نهایی استفاده شدند.

طرز تهیه مواد گیاهی و نحوه جمع آوری آن ها

از نیمه های فروردین ماه سال جاری، جمع آوری برگ های گیاهان مورد نظر پژوهش در منطقه شهرستان ابرکوه انجام شد. از گیاهان مورد استفاده در آزمایش هر کدام 20 کیلوگرم به صورت تازه تهیه شد.

نمونه های جمع آوری شده پس از شستشو، در فضای اتاقی بدون تابش مستقیم نور خورشید، در دمای خنک، و با وزش کنترل شده باد چندین پنکه بر روی آن ها، تا نیمه خرداد ماه نگهداری صورت پذیرفت. گیاهان همگی بومی شهرستان و در شرایط طبیعی رشد یافته بودند.

عصاره گیری گیاهان

قسمت های مختلف گیاهان خشک ابتدا خرد شده، سپس به نسبت 1 کیلوگرم در 5 لیتر آب مقطر استریل قرار گرفتند. ضمنا ظروف لعاب دار حلبی برای این کار در نظر گرفته تا تغییری توسط ظرف در مواد محتوی حاصل نگردد. پس از گذشت مدت 48 ساعت، گیاهان را جداگانه در الک ریخته و آب باقی مانده از صافی واتمن شماره یک عبور داده شد. از هر نمونه 1 لیتر آب را برداشته، آن ها را در دمای 30 درجه سانتی گراد و با وزش باد کنترل شده پنکه قرار داده و به مدت 10 روز نگهداری شدند.

غلظت سازی عصاره ها

از هر گیاه 2/5 گرم عصاره پودر خشک بر داشته، در 5 میلی لیتر آب مقطر استریل، در دمای 30 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه بر روی دستگاه لرزشگر[4] حل کرده تا غلظت قراردادی ٪50 به دست آمد. سپس با استفاده از سرنگ و صافی میلی پور (مخصوص عبور عصاره گیاهی و عدم عبور باکتری وقارچ)، عصاره جداسازی گشت. در ضمن برای غلظت سازی در تیمار شاهد از PEG[5] استفاده و در زیر هود، به طریق جدول-1 عمل شد.

	قطره (های) اضافه شونده	
غلظت(٪)	عصاره گیاه مورد نظر	آب مقطر استریل
10	1	4

[3] Hyphal Types

[4] Shaker

[5] پلی اتیلن گلایکول

20	2	3
30	3	2
40	4	1
50	5	0

جدول 1 : غلظت سازی عصاره ها

تهیه محیط کشت و انتقال قارچ و عصاره ها

برای تهیه محیط کشت مناسب 30 گرم آگار را به نسبت 10 گرم در لیتر درون ارلن های مخصوص اتوکلاو به 3 لیتر آب مقطر اضافه و در پوش آن گذاشته شد. در دمای 121 درجه سانتی گراد به مدت 15 دقیقه در فشار 1/5 بار قرار داده شد. پس از این که فشار اتوکلاو پایین آمد و دمای محیط کشت به حدود 50 درجه سانتی گراد رسید، ارلن ها را با احتیاط به زیر هود منتقل نموده و به هر پتریدیش مقدار 10 سی سی مایع حاصل اضافه می گردد. سپس با سر پنس از محیط های کشت خالص، قارچ فیتوفتورا به وسط پتریدیش ها انتقال داده، بلافاصله عصاره های مورد نظر را بر روی قارچ ها ریخته و دور درب پتریدیش ها با پارافیلم پوشانیده شد.

روش گرد آوری داده ها، تجزیه و تحلیل آن ها

به طریق مشاهده ای؛ هر 2 روز یک بار به مدت 14 روز پس از گذشت 48 ساعت از کشت قارچ و اضافه نمودن عصاره های گیاهی، قطر متوسط هاله رشد یافته (در صورت رشد) فیتوفتورا اندازه گیری می شود.

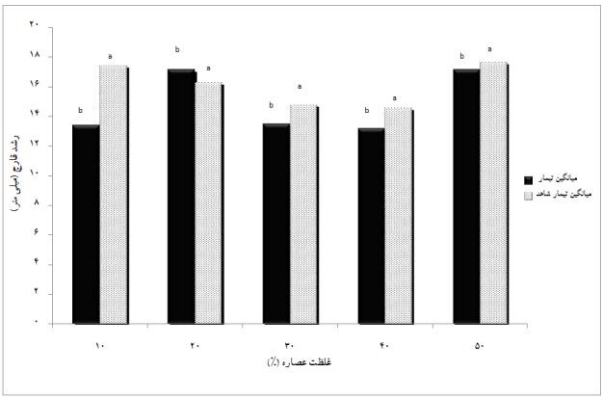
این پژوهش در قالب طرح آماری بلوک های کامل تصادفی با 5 تکرار انجام شد. تیمارهای آزمایشی، غلظت های مختلف عصاره گیاهان و تیمار شاهد بود و تکرار در روزهای مختلف بلوک ها را تشکیل می دادند و از روش مدل خطی عمومی (GLM[6]) و آنالیز واریانس یک طرفه جهت بررسی اثر کلی تیمارهای شدت چرایی روی فاکتورهای مورد بررسی (اندازه گیری شده) استفاده و مقایسه میانگین تیمارها در صورت معنی دار بودن تیمارها بوسیله آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام می شود. برای آنالیز واریانس، نرمال بودن داده ها از آزمون کولموگروف اسمیرنوف[7] و همگن بودن واریانس‌ها توسط آزمون لون[8] بررسی و بر حسب نرمال بودن یا نبودن داده‌ها از آنالیز واریانس پارامتریک یا غیر پارامتریک استفاده شد.

نتایج

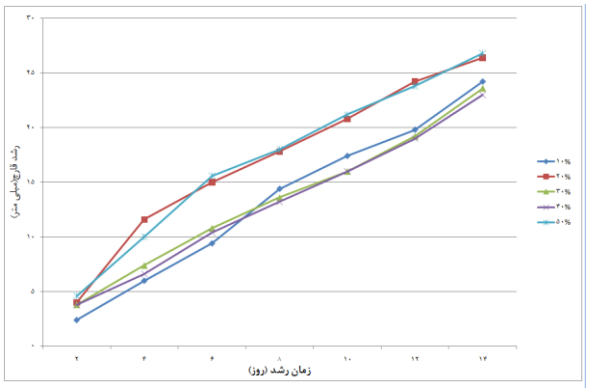
در تیمار آویشن دنائی توسط آنالیز واریانس مشخص شد که اختلاف معنی داری در سطوح غلظت موثر بر هاله رشد قارچ در خود تیمار وجود ندارد. در همه غلظت های تیمار آویشن رشد به صورت معنی داری نسبت به تیمار شاهد کاهش یافته است. گروه

[6] General Linear Model
[7] Kolmogorov-Smirnov
[8] Levene

بندی دانکن شامل یک گروه برای غلظت های تیمار است (نمودار1). کمترین قطر هاله رشد قارچ در تکرار 5 غلظت 10٪ مشاهده گشت. شیب خط پیشرفت هاله در طول زمان ثابت باقی مانده است (نمودار 2).

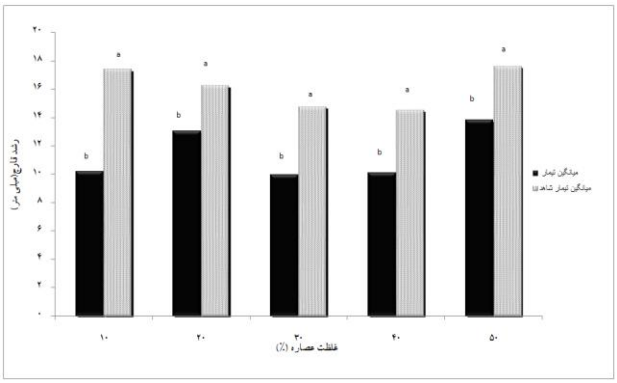


نمودار 1: تاثیر غلظت های مختلف تیمار آویشن در رابطه با رشد قارچ *phytophthora* با مقایسه تیمار شاهد

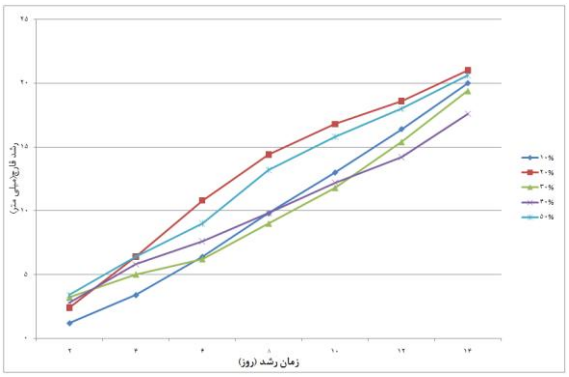


نمودار 2: نمایش شیب سرعت میزان رشد قارچ فیتوفتورا تحت تاثیر تیمار آویشن دنایی در طول زمان

آنالیز واریانس نشان داد کاهش رشد قارچ فیتوفتورا در غلظت های عصاره برگ کاسنی غیر معنی دار و برای مقایسه با شاهد را معنی دار می باشد. همه سطوح غلظت در گروه بندی دانکن متعلق به یک گروه می باشند (نمودار3). بیشترین حالت ممانعت از رشد قارچ فیتوفتورا در تکرار 3 سطح غلظت 10٪ اتفاق افتاد. سرعت رشد قارچ نیز در طول زمان پژوهش ثابت است (نمودار4).



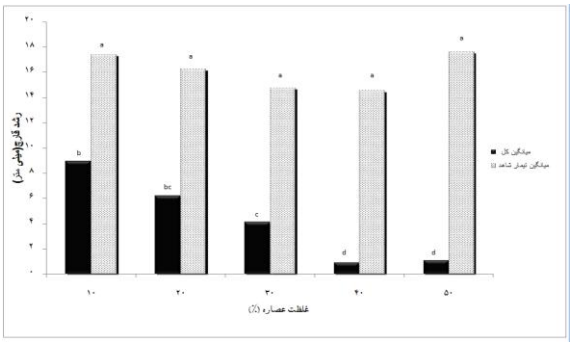
نمودار 3: تاثیر غلظت های مختلف تیمار کاسنی در رابطه با رشد قارچ *phytophthora* با مقایسه تیمار شاهد



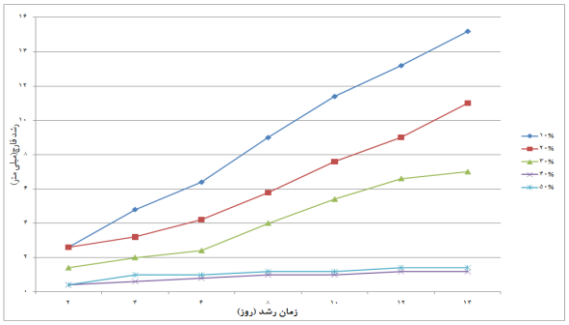
نمودار 4 : نمایش شیب سرعت میزان رشد قارچ فیتوفتورا تحت تاثیر تیمار کاسنی در طول زمان

تفاوت معنی داری بین غلظت های موثر بر رشد قارچ فیتوفتورا در تیمار پونه وحشی وجود دارد که به وسیله آنالیز

واریانس مشخص گردید. اختلاف معنی دار بین تمامی غلظت های تیمار پونه و شاهد وجود دارد. طبق میانگین دانکن در غلظت های به کار رفته در این تیمار نیز میان سطوح ٪10 و ٪20 ، ٪20 و ٪30 و همچنین ٪40 و ٪50 اختلاف معنی داری در اثر تیمار وجود ندارد. بین غلظت های ٪10 به ٪30، ٪40 و ٪50، همچنین بین ٪20 به ٪40 و ٪50، و میان ٪30 به ٪40 و ٪50 در قطر رشد هاله قارچ فیتوقتورا اختلاف معنی دار وجود دارد (نمودار5). در تکرار های 1، 2، 3 و 4 غلظت های ٪40 و ٪50 رشد قارچ اصلا صورت نگرفته است. بنابراین با افزایش غلظت، رشد نیز کاهش می یابد. نمودار رشد در طول زمان با شیب یکنواخت و کم به جلو رفته است (نمودار6).

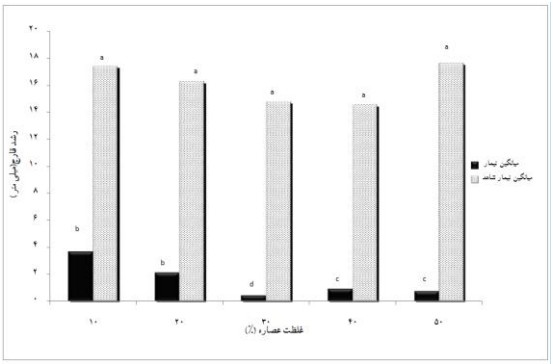


نمودار 5: تاثیر غلظت های مختلف تیمار پونه وحشی در رابطه با رشد قارچ *phytophthora* با مقایسه تیمار شاهد

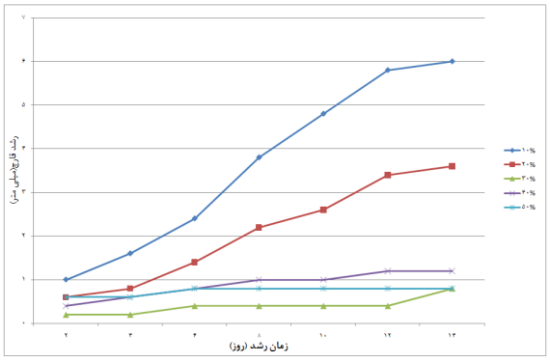


نمودار 6 : نمایش شیب سرعت میزان رشد قارچ فیتوفتورا تحت تاثیر تیمار پونه وحشی در طول زمان

طبق آنالیز واریانس تفاوت معنی داری بین سطوح غلظت تیمار ریحان وجود دارد. اختلاف معنی داری بین میزان رشد قارچ فیتوفتورا در تیمار ریحان و شاهد مشاهده می شود. میانگین دانک نشان داد که میان غلظت های ٪10 و ٪20 با سطوح ٪30،٪40 و ٪50، همچنین ٪30 با ٪40 و ٪50 اختلاف معنی داری در تاثیر آن ها وجود دارد (نمودار7). 4 تکرار از 5 تکرار غلظت های ٪30 و ٪50 هیچ گونه فعالیت قارچی مشاهده نشد. نسبت رشد قطر هاله به زمان ناچیز می باشد (نمودار8).

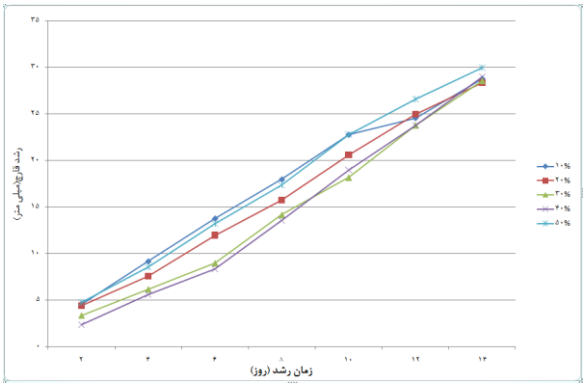


نمودار (7): تاثیر غلظت های مختلف تیمار ریحان در رابطه با رشد قارچ *phytophthora* با مقایسه تیمار شاهد



نمودار (8) : نمایش شیب سرعت میزان رشد قارچ فیتوفتورا تحت تاثیر تیمار ریحان در طول زمان

تیمار شاهد معیاری برای مقایسه بقیه تیمارها می باشد. سرعت رشد در تیمار شاهد به صورت خطی با شیب ثابت است (نمودار9).

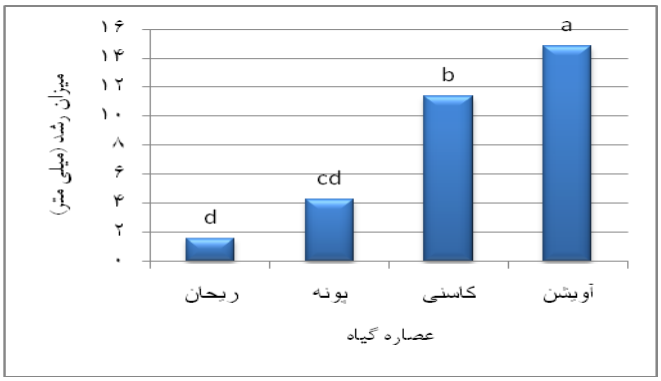


نمودار 9 : نمایش شیب سرعت میزان رشد قارچ فیتوفتورا تحت تاثیر تیمار شاهد در طول زمان

سرعت رشد قارچ فیتوفتورا در تیمارهای پونه و ریحان در طول مدت آزمایش دارای شیب خطی کم می باشد و در بقیه تیمارها از الگوی ثابتی با سرعت رشد معلوم و شیب بیشتر وجود دارد.

حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) عصاره ها در غلظت 10٪ تیمار عصاره ریحان دیده می شود.

آنالیز واریانس: نشان داد که در کل، غلظت های درون تیمار ها اختلاف معنی داری ندارند. عصاره گیاهان مختلف نسبت به شاهد دارای اختلاف معنی دار می باشند (نمودار10).



نمودار 10: تاثیر تیمار های مختلف در رابطه با رشد قارچ *phytophthora* با مقایسه تیمار شاهد

آزمون دانکن: بیشترین اختلاف معنی دار نسبت به شاهد جهت قطر هاله فیتوفتورا متعلق به تیمار های ریحان، پونه و رازیانه می باشد. تیمار های آویشن و بارهنگ کمترین اختلاف معنی دار را با تیمار شاهد برای تاثیر بر رشد هاله قارچ دارا هستند. بقیه تیمار ها حد واسط می باشند (نمودار10).

بحث:

جواب این پرسش که کدام عصاره(ها) بیشترین تاثیر را بر روی عدم رشد قارچ فیتوفتورای جدا شده از طوقه پسته می

گذارد، باید ذکر شود که عصاره های گیاهان ریحان و پونه وحشی در غلظت های ٪40 و ٪50 به عنوان بهترین عامل بازدارنده هستند. غلظت در نتایج عصاره های ریحان، پونه وحشی و گلرنگ تاثیر گذار می باشد. علاوه بر اسانس های موجود در عصاره گیاهان ریحان و پونه وحشی، وجود ترکیبات فنلی از عوامل موفقیت عصاره هایشان می باشد. خانواده نعناعیان گیاهانی مقاوم و در شرایط سختتری نسبت به بعضی دیگر از خانواده ها می توانند رشد و نمو داشته باشند. هر چه شرایط زمان رشد و نموشان طبیعی تر باشد، میزان ماده های موثرشان بیشتر خواهد بود.

نتیجه گیری کلی:

غلظت ها، کمتر در تیمار ها موثر بودند، فقط در چند تیمارهای پونه وحشی و ریحان غلظت ها به صورت معنی داری عمل کرده اند (نمودار10). البته در این پژوهش بیشتر غلظت های بالا، در روزهای آخری آزمایش ها، نتایج خود را نشان دادند و هنوز هم باعث سرعت کند رشد قارچ فیتوفتورا می شدند، ولی در غلظت های پایین تر سرعت روزهای پایانی نسبت به روزهای اول بیشتر شده بود، چرا که میزان اثر بخشی آن ها هر روز کم تر می شد. غلظت های ٪40 و ٪50 برگ گیاهان ریحان و پونه وحشی بیشترین اثر را بر روی توقف رشد و کم نمودن آن بر روی قارچ فیتوفتورا داشته اند.

فهرست منابع مورد استفاده

- Brasier, C. (۱۹۹۲). ***Evolutionary biology of phytophthora, part I: genetic system,sexuality and the generation of variation***. Annual Review of Phytopathology , Vol. ۳۰, pp. ۷۱-۱۵۳.

- Cowan, M. (۱۹۹۹). ***Plant products as antimicrobial agents***. Clinical Microbial Reviews , Vol. ۱۲, pp. ۵۶۴-۵۸۲.

- Edris, A. E. (۲۰۰۳). ***Antifungal activity of pepermint and sweat basil essential oils and their major aroma constitunts on some plant pathogenic fungi from the vapor phase***. *Food.* , Vol. ۴۷, pp. ۱۱۷-۱۲۱.

- Ervin, M. (۱۹۹۶). ***Phytophthora disease worldwide***. New York: American Phytopathological Society. , pp. ۵۶۲.

- Ghasemi, A. A. (۲۰۰۳). ***Study of different asexual propagation methods in local dwarf apple rootstocks***. *The ۳rd Iranian Congress of Horticultural Science.* Karaj, Iran.

- Hausbeck, M. K. and Lamour, K. H. (۲۰۰۴***). Phytophthora capsici on vegetable crops: Research progress and management challenges***. *Plant Dis* , Vol. ۸۸, pp. ۱۲۹۲-۱۳۰۳.

- Ma, Z. and Michailides, T. J. (۲۰۰۵). ***Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi***. *Crop Protection* , Vol. ۲۴, pp. ۸۵۳-۸۶۳.

- Nayeemulla, S. M. (۲۰۰۶). ***Antimicrobial activity of Rauvolfia tetraphylla and Physalis minima leaf and callus extracts***. *African j. Biotechnol* , Vol. ۵, pp. ۱۰-۱۶.

- Ogawa, J. M. (۱۹۹۱). ***Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops***. Oakland: University of California, Division of Agriculture and Natural Resources. ,pp. ۳۳۴۵.

- Sati, S. C. and Joshi, S. (۲۰۱۱). ***Aspects of Antifungal potential of Ethnobotanically Known Medicinal Plants***. research Journal of Medicinal Plant , Vol. ۵, n. ۴, pp. ۳۷۷-۳۹۱.

- Shahidi Bonjar, G. H., Fooladi, M. H.,Mahdavi, M. J. and Shahghasi, A. (۲۰۰۴). ***Broadspectrim, a novel antibacterial from Streptomyces sp***. *biotechnology* , Vol. ۳, pp. ۱۲۶-۱۳۰.

- Tamietti, G. and Valentino, D. (۲۰۰۱). ***Physiological characterization of a population of phytophthora capsici Leon***. Plant Pathol , Vol. ۸۳, pp. ۱۹۹-۲۰۵.

Effects of antifungal activity of aqueous extracts of four native medicinal plants on *Phytophtora sp.* in fungus culture.

Omidsalari. M*[۱] , Sadeghi. H[۲] , Niazmand. A. R[۲].

۱. Graduate student MA Medicinal Plant, Islamic Azad University,Jahrom Branch

۲. Faculty Members of Biology, Islamic Azad University,Jahrom Branch

* Corresponding email address: m.omidsalary@gmail.com

Abstract

Phytophthora is a kind of Oomyset pathogen fungal which causes contamination and decay in different plants, like pistachio crown. In this study, the collected fungal from the trees which were supposed to be infected in the Abarkooh region were boiled with cannabis seeds and bitter orange and then they were separated. Purification has been done through hyphal types . ۴ kinds of medicinal plant's aqueous extracts in density of ۱۰%,۲۰%,۳۰%,٤۰% and ۵۰% were added ۵ times to the fungals in the medium. In order to prevent osmotic potential affection in the comparison of results, with adding PEG, equal densities in comparison with other treatment density levels were created for the witness treatment. This test has been done randomly and with consideration of fungal halo growth diameter in the petridish , capable of Agar medium, CMA kind, during ۲ weeks. Statistics analysis with SPSS software through variance shown that all the extracts has considerable difference in comparison with the witness treatment in antifungal operation. Basil and pennyroyal extracts has been placed in the most effective group through Duncan classification. The minimum inhibitory concentration is of Basil ۱۰% level extract. *Phythophetora* growth stop in the ٤۰% and ۵۰% of Basil and Pennyroyal has also been seen.

Key Words: *Phytophthora*, antifungal, aqueous extracts, medicinal plants.