اثر ضدقارچی چند اسانس گیاهی بر قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی *Phytophthora parasitica* L در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای

The antifungal effect of some herbal essences on the causal agent of tomato and crown root rot, *Phytophthora parasitica* L. *in vitro* and greenhouse conditions

زهرا اردستانی[۱]، داریوش شهریاری[۲*] و مژده ملکی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۴/۱۲ تاریخ پذیرش:۱۳۹۵/۸/۲

چکیده

پوسیدگی فیتوفتورایی ساقه و ریشه گوجه‌فرنگی *Phytophthora parasitica* L. یکی از مهم‌ترین بیماری‌های خاکزاد گوجه‌فرنگی می‌باشد. این بیماری در دهه اخیر در مزارع و گلخانه‌های جنوب شرق استان تهران (ورامین) گسترش یافته است. تاکنون کنترل این بیماری با استفاده از ترکیبات شیمیایی موفق‌آمیز نبوده؛ علیرغم تأثیرکنترل بیولوژیک و یا بکارگیری ارقام مقاوم در کاهش بیماری، ولی به نظر می‌رسد تحقیق و بکارگیری ترکیبات طبیعی به ویژه اسانس‌های گیاهی، علاوه بر کاهش بیماری اثرات مفید زیست محیطی را به‌همراه داشته باشد. دراین مطالعه اثر اسانس هشت گیاه آویشن، زیره، مرزه، پونه، نعناع، ترخون، زینان، رازیانه و قارچکش ریدومیل-مانکوزب به عنوان تیمار شاهد در شرایط آزمایشگاهی در پنج غلظت ۶۰، ۱۲۰، ۲۴۰۱۸۰ و ۳۰۰ پی پی ام بر روی سرعت رشد و بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری در محیط کشت PDA در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. آزمایشات گلخانه‌ای با ده تیمار شامل اسانس‌های موفق آویشن، پونه و زیره به غلظت ۰/۲ و ۰/۳ در هزار به همراه قارچکش روال تی اس۱ و ۱/۵ در هزار و شاهد سالم و آلوده به قارچ *P. parasitica* در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکراراجراء شد. اسانس‌ها و قارچکش به بستر ریشه گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی در مرحله دو برگی افزوده شدند. آماربرداری از درصد شدت بیماری مطابق الگوی کوئسادا-اوکامپو و هاوسبک چهار هفته بعد از مایه‌زنی انجام شد. اسانس‌هایی‌که در شرایط آزمایشگاهی بیش‌ترین درصد بازدارندگی از رشد را داشتند به ترتیب آویشن (۷۹/۲۸ درصد)، پونه (۷۲/۸۵ درصد)، زیره (۶۹/۹۵ درصد)، نعناع (۶۰/۷۰ درصد)، ترخون (۶۰/۷۰ درصد) و زینان (۶۰ درصد) بودند و حداقل غلظت بازدارندگی EC_{50} از رشد میسیلیومی قارچ مربوط به اسانس آویشن، زیره و پونه در غلظت۱۸۰ پی‌پی‌ام بوده است. نتایج تجزیه واریانس تحقیقات گلخانه‌ای نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها در سطح احتمال ۱٪ بود. در مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن، اسانس آویشن به ترتیب با ۱/۶۵ و ۱/۳۱ شدت شاخص بیماری نزدیک‌ترین شاخص بیماری با تیمارهای قارچکش ریدومیل-مانکوزب و شاهد سالم با ۰/۱۸ شاخص شدت بیماری بود و بهترین تأثیر در کاهش بیماری را داشت.

واژگان کلیدی: گوجه‌فرنگی، *Phytophthora parasitica*، اسانس‌های گیاهی، آویشن، بازدارندگی از رشد

---

۱ و ۳- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استادیار گروه بیماری شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین –پیشوا ،ورامین، ایران

۲- استادیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ورامین، ایران.

نویسنده مسئول مکاتبات: dshahriari37@gmail.com

مقدمه

تولید محصولات کشاورزی به خصوص سبزی و صیفی نقش بسیار حیاتی در زندگی مردم دارد و بخشی از صادرات غیرنفتی کشور را تشکیل می‌دهد. گوجه‌فرنگی دارای سطح زیر کشت بالغ بر ۱۵۸ هزار هکتار با تولید ۶۲۴ میلیون تن در کشور می‌باشد (بی‌نام ،۱۳۹۳). این محصول دائماً در معرض میکروارگانیسم‌های بیمارگر اطراف خود می‌باشدکه در این بین، قارچ‌های بیمارگر گیاهی سبب خسارات بسیاری در مزارع سبزی و صیفی در سرتاسر دنیا می‌شوند (Bajpai and Kang, 2012; Etebarian, 2012). میزان خسارت محصولات کشاورزی ناشی از بیماری‌های قارچی در حدود ۱۲ درصد از تولید جهانی است که این مقدار در کشورهای در حال توسعه بیش‌تر است (D'Mello *et al.,* 1998; Serra *et al.,* 2006; Sitara *et al.,* 2008). یکی از این بیماری‌های مخرب که هر سال خسارت چشمگیری به محصولات سبزی و صیفی‌جات در مزارع و گلخانه‌ها وارد می‌کند، بیماری مرگ گیاهچه و بوته‌میری ناشی از قارچ فیتوفتوراست (Etebarian, 2012). جنس *Phytophthora* به عنوان عامل بوته‌میری از بیش از ۷۰ میزبان گیاهی از قبیل هندوانه، بادمجان، گوجه‌فرنگی، خیار، لوبیا، جعفری، پاپایا، توتون و برخی گیاهان زینتی گزارش شده است (Yoshimura *et al.*, 1985). بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی ناشی از گونه‌های مختلف *Phytophthora* یک تهدیدات بالقوه در تولید گوجه‌فرنگی در ایران محسوب می‌شود و طی سال‌های اخیر گسترش نسبتاً وسیعی داشته است (Sabetghadam *et al.,* 2012). عارضه خشگیدگی گوجه‌فرنگی یکی از بیماری‌های مهم قارچی گوجه‌فرنگی در استان تهران محسوب می‌گردد که در چند سال اخیر به‌طور جدی تداوم کشت این محصول را محدود کرده است (شهریاری و همکاران، ۱۳۷۵). این بیماری در نواحی معتدل و مرطوب به ویژه گلخانه ها مشاهده می‌شود و اولین علامت روی میوه که در تماس با خاک است به‌صورت لکه‌های تیره روشن به‌شکل حلقه‌های متحدالمرکز با نوارهای باریک و پهن قهوه‌ای تیره و روشن شبیه چشم پرنده ظاهر می‌شود. علایم روی ریشه و طوقه به‌صورت لکه‌های آبسوخته است که بتدریج بافت کورتکس خشک شده و به رنگ تیره در می‌آیند. سبز خشکی و تغییر رنگ ریشه‌ها به قهوه‌ای و سیاه شدگی ناحیه طوقه از دیگر ویژگی‌های بارز این بیماری در گوجه‌فرنگی و فلفل می‌باشد (اعتباریان، ۱۳۷۶). مدیریت این بیماری مبتنی بر اعمال روش‌های زراعی و شیمیایی است. کنترل شیمیایی عوامل بیماری‌زای قارچی و مصرف بیش از حد قارچ‌کش‌ها در مدیریت بیماری‌های گیاهان، به خصوص بیماری‌های خاکزاد سبب عوارضی همچون اختلال در گرده‌افشانی، سرطان ناشی از باقیمانده سموم بر روی مواد غذایی، آلودگی‌های زیست محیطی و پدیده مقاومت در مقابل قارچ‌کش‌ها شده است (Zhang *et al.,* 2009; Khan *et al.,* 2011; Bajpai and Kang, 2012; Bi *et al.,* 2012; Sarpeleh *et al.,* 2009). استفاده از اسانس‌ها و عصاره گیاهی و متابولیت‌های ثانویه یکی از روش‌های نوین کنترل بیماری‌های گیاهی است که بیش‌تر در سطوح آزمایشگاهی مطرح و اجراشده است (Sacchetti *et al.,* 2005; Sokovic and Griensven, 2006). این مواد، ترکیبات پیچیده‌ای دارند که به‌عنوان مواد بیولوژیک سمی علیه آفات و قارچ‌های بیمارگر گیاهی به کار می‌روند (Rasooli *et al.,* 2002). بنابراین با توجه به نقش محافظتی این ترکیبات، شناسایی و بررسی آن‌ها می‌تواند نقش مؤثری در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی داشته باشد (Cowan, 1999). با افزایش آگاهی درباره اهمیت کاربرد اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی در کشاورزی و صنایع دارویی، جداسازی و استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی رو به افزایش است (Amvam zollo *et al.,* 1998). این ترکیبات پتانسیل بالایی برای استفاده در برنامه کنترل تلفیقی آفات دارند (Amini *et al.,* 2012)و با توجه به مشکلات موجود در مورد کاربرد قارچ‌کش‌ها، مطالعه و تحقیق در خصوص روش‌های جدید و مطمئن و کم‌هزینه برای کنترل و مدیریت بیماری‌های گیاهی یک ضرورت است (Marandi *et al.,* 2011). لذا این تحقیق که برای اولین بار برای کنترل قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی ناشی از *Phytophthora parasitica* با استفاده از اسانس‌های طبیعی در کشور اجرا خواهد شد. پس از جداسازی و اثبات بیماری‌زایی قارچ عامل بیماری، تأثیر هشت اسانس گیاهی بر میزان بازدارندگی از رشد و سرعت رشد در غلظت‌های مختلف بررسی و با

شناسایی موثرترین اسانس‌ها، میزان اثر بخشی آن‌ها در کنترل بیماری در شرایط گلخانه‌ای در مقایسه با قارچکش آزمایش می‌شود.

مواد وروش‌ها

تهیه و استخراج اسانس با کلونجر

مواد گیاهی شامل نعناع، آویشن، مرزه، ترخون، زنیان، رازیانه، پونه و زیره طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ از مناطق مختلف استان تهران و مازندران جمع‌آوری و گونه‌های متعلق به مناطق گرمسیر از بازار تهیه گردیدند. استخراج اسانس گیاهان با روش تقطیر آب با دستگاه کلونجر (Clevenger) مطابق روش فیضی و همکاران (۱۳۹۱) صورت گرفت. اسانس‌های به‌دست آمده با کمی هگزان شستشو داده شد و نهایتاً درون ظرف تیره در دمای ۴-۳ درجه سلسیوس جهت آزمایشات بعدی نگهداری گردید.

جداسازی وخالص‌سازی عامل بیماری

در سال زراعی ۹۴-۹۵ طی بازدید از مزارع و گلخانه‌های گوجه‌فرنگی استان تهران (کرج، شهریار، ورامین و پاکدشت)، از طوقه و ریشه گیاهچه‌های آلوده دارای علایم زردی، پژمردگی به همراه پوسیدگی ریشه و طوقه و سبز خشکی بوته نمونه‌برداری شد. در آزمایشگاه پس از شستشو بافت آلوده به قطعات ۵-۲ میلی‌متری تقسیم شد و بدون ضدعفونی سطحی روی محیط کشت نیمه انتخابی CMA-PARP کشت داده شدند .محیط کشت شامل عصاره ۴۰ گرم دانه ذرت خرد شده، ۲۰ میلی‌گرم دلواسید (دارای ۵۰٪ پیمارسین)، ۲۵۰ میلی‌گرم آمپی‌سیلین، ۱۰ میلی‌گرم ریفامپیسین، ۱۰۰ میلی‌گرم پنتاکلرونیتروبنزن، ۱۵ گرم آگار و یک لیتر آب مقطر بود (Corn Meal Agar- pimaricin + ampicillin + rifampicin + pentachloro nitrobenzene agar). تشتک‌های پتری در انکوباتور تحت دمای ۲۵ نگهداری گردیدند (Kannwischer and Mitchell, 1981). برای خالص‌سازی پرگنه‌ها از روش نوک ریسه روی محیط کشت آب آگار (WA)۲٪ بعد از ۴۸-۲۴ ساعت استفاده شد (Ribeiro, 1978).

آزمون بیماری‌زائی در گلخانه

آماده‌سازی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی

بذرهای گوجه‌فرنگی رقم پتوارلی پس از ضدعفونی سطحی به مدت ۵ دقیقه با هیپوکلریت سدیم ۰/۵٪ در سینی کشت حاوی پیت ماس تجاری استریل در شرایط گلخانه کاشته شدند و آبیاری به صورت روزانه انجام شد (قادری و همکاران، ۱۳۹۰؛Nazavari *et al.,* 2016).

تهیه زادمایه بیمارگر

در این مرحله ابتدا مخلوطی از دانه گندم و شاه دانه به نسبت حجمی ۲:۱ در فلاسک یک لیتری تهیه و به مدت یک ساعت در اتوکلاو سترون گردید. دو تا سه روز بعد پرگنه جدایه قارچ رشد یافته بر روی محیط کشت CMA، هشت بلوک میسلیومی به قطر ۶ میلی‌متر به ارلن‌های یک لیتری اضافه شد و به مدت ۴ هفته در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و در تاریکی قرار داده شد. هر هفته فیول‌های حاوی مایه بیمارگر برای چند دقیقه تکان داده شدند تا رشد بیمارگر در داخل فیول‌ها به صورت یکنواخت انجام گیرد (نعمتی و بنی‌هاشمی،۱۳۹۴؛Gilardi *et al.,* 2014).

مایه‌زنی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی

ابتدا گیاهچه‌های دو هفته‌ای رقم حساس پتوارلی در گلدان‌های دو کیلویی نشاء شدند. سپس خاک اطراف هر گیاهچه تا عمق سه سانتی‌متری کنار زده شد و ۱۰ میلی‌لیتر از مایه تلقیح تهیه شده از مرحله قبل (زادمایه قارچ، دانه گندم و شاه دانه) در اطراف طوقه و ریشه هر گیاهچه قرار داده شد. گیاهچه‌های شاهد سالم نیز به همین روش با دانه گندم و شاه دانه سترون مایه‌زنی شدند. گلدان‌ها به مدت ۴۸ ساعت به حالت غرقابی آبیاری و در دمای ۳۰-۲۵ درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. پس از ظهور علایم، جداسازی مجدد از ریشه و طوقه گیاهان صورت گرفت و خصوصیات مرفولوژیکی و تاکسونومیکی آن‌ها با صفات جدایه‌های مایه‌زنی شده مطابقت داده شدند (Banihashemi and Fatehi, 1989 ؛ نعمتی و بنی‌هاشمی،۱۳۹۴؛ Nazavari *et al.*, 2016).

بررسی تاثیر اسانس‌های گیاهی روی قارچ عامل بیماری در آزمایشگاه (*In vitro*)

این آزمایشات در بخش تحقیقات گیاهپزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران انجام شد. به منظور تعیین سرعت رشد و درصد بازدارندگی از رشد MGI به منظور اختلاط اسانس‌ها با محیط کشت PDA ابتدا هر یک از اسانس‌ها در توئین ۲۰ درصد (Tween 20) حل شد و سپس با غلظت‌های ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام مخلوط گردید. در تیمار قارچ‌کش از ریدومیل- مانکوزب پودر وتابل۷۲٪ به غلظت یک در هزار در محیط PDA در دمای ۴۵-۴۰ درجه سلسیوس و برای شاهد محیط کشت از آب مقطر و توئین ۲۰ درصد استفاده شد. پس از انتقال تیمارها به تشتک‌های پتری استریل و بسته شدن محیط، دیسک‌های ۵ میلی‌متری از حاشیه کلنی قارچ ۷ روزه با چوب پنبه سوراخ‌کن تهیه و به مرکز تشتک‌های فوق منتقل شد و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس در انکوباتور نگهداری شدند. اندازه‌گیری از قطر کلنی قارچ با خط‌کش در روز دهم و چهاردهم انجام و تفاضل آن‌ها به‌عنوان سرعت رشد کلنی ثبت گردید.

به منظور تعیین درصد بازدارندگی از رشد مسیلیومی، میزان رشد قارچ ۱۴ روز بعد از کشت اندازه‌گیری شد و درصد بازدارندگی از رشد با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید (Riccioni *et al.*, 2011). نتایج حاصل از تجزیه واریانس و میانگین‌ها با آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفت.

$$I = \frac{C_2 - C_1}{C_2} \times 100$$

I: درصد بازدارندگی

C_1: قطر کلنی در تیمار

C_2: قطر کلنی در شاهد

تعیین غلظت مؤثر متوسط (EC50)Median Effective Concentration

برای ارزیابی EC50 اسانس‌ها برروی قارچ *Phytophthora parasitica* از رداده‌های بازدارندگی استفاده شد و روش رگرسیون پروبیت خطی بر روی نمودار با نرم افزار SPSSگرفته شد (Feen and Coffey, 1984).

اجرای آزمایش گلخانه‌ای

در این روش بذور گیاه گوجه‌فرنگی رقم پتوارلیپس از ضدعفونی و کاشت در خاک گلدان‌ها، در مرحله ۴-۳ برگی همانند روش اثبات بیماری‌زایی با مایه قارچ بیمارگر *P. parasitica* تلقیح شدند. همزمان۲۰۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام از اسانس گیاهان مؤثر بر رشد قارچ انتخاب و به همراه قارچ‌کش ریدومیل مانکوزب با غلظت ۱و ۱/۵ در هزار به خاک اطراف ریشه گیاهچه‌های آلوده به قارچ بیمارگر اضافه شد. در تیمار شاهد به جای اسانس از آب مقطر سترون استفاده شد. برای هر تیمار چهار تکرار در نظر گرفته شد. این آزمایش در قالب طرح کامل تصادفی در شرایط گلخانه تحت دمای ۵±۲۷ درجه

سلسیوس اجرا شد.

یادداشت‌برداری و تجزیه آماری

پس از کاشت گوجه‌فرنگی، طی بازدیدهای هفتگی از بوته‌ها، یادداشت‌برداری از پوسیدگی فیتوفتورایی طوقه پس از ظهور اولین علائم آلودگی انجام گرفت. در پایان هر آزمایش، شدت شاخص بیماری (DI) بر اساس مقیاس درجه آلودگی صفر تا پنج کوئسادا-اوکامپو و هاوس بک (Quesada-Ocampo and Hausbeck, 2010) محاسبه گردید.

۰= بدون علائم آلودگی، بوته‌ها سالم می‌باشند.

۱= ۱ تا ۳۰٪ پژمردگی (مقدار میانی ۱۵٪)

۲= ۳۱ تا ۵۰٪ پژمردگی (مقدار میانی ۴۰٪)

۳= ۵۱ تا ۷۰٪ پژمردگی (مقدار میانی ۶۰٪)

۴= ۷۱ تا ۹۰ ٪ پژمردگی (مقدار میانی ۸۰٪)

۵= بیش از ۹۰ ٪ پژمردگی یا مرگ کامل گیاه (مقدار میانی ۹۵٪)

در مرحله نهایی، به منظور بررسی تاثیر اسانس‌ها درکاهش بیماری پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی وزن تر و خشک بوته گوجه‌فرنگی نیز اندازه‌گیری شد (Gilardi *et al.*, 2014). نتایج حاصل از تجزیه واریانس و میانگین‌ها با آزمون دانکن مورد مقایسه قرار گرفت.

نتایج

تهیه اسانس‌ها

در این بررسی پنج گیاه نعناع، آویشن، مرزه، ترخون و پونه از مزارع سبزی‌کاری آلوئک پاکدشت، شریف آباد، کنار رودخانه‌ها در شهرستان‌ساری جمع‌آوری و در آزمایشگاه خشک گردید و سه گیاه زینان، رازیانه و زیره از عطاری‌های بازار تهران خریداری گردید. در مرحله اسانس‌گیری از گیاهان فوق با دستگاه کلونجر میزان‌های مختلفی از اسانس (میلی‌لیتر) به ازای واحد کیلوگرم مواد گیاهی تر بدست آمد (جدول ۱).

جدول ۱- میزان اسانس بدست آمده به ازای هر کیلوگرم ماده گیاهی

Table 1. The amount of essences extracted of each kilogram of plant material

مواد گیاهی (کیلوگرم) Plant material(Kg)	اسانس (میلی‌لیتر) Essence(mL)
نعناع Mint	5
زنیان Ajwain	2
آویشن Thyme	1.8
ترخون Tarragon	3
پونه Pennyroyal	2.5
زیره Cumin	5
رازیانه Fennel	7
مرزه Savory	2.4

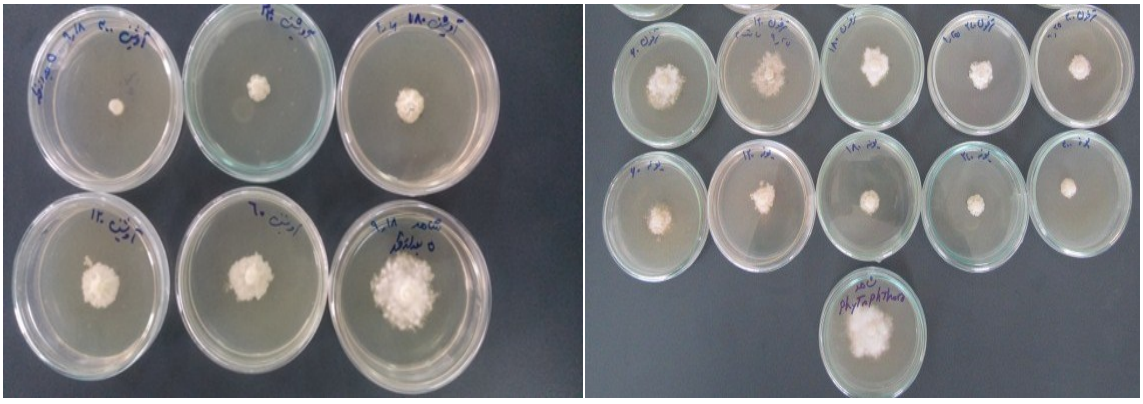
اثبات بیماریزایی و شناسایی قارچ

جدایه قارچ عامل بیماری روی گیاهچه‌های گوجه‌فرنگی رقم پتوارلی که در مرحله دو برگ حقیقی مایه‌زنی شده بود بعد از یک هفته علایم اولیه زردی، پژمردگی را نشان داد. بتدریج منطقه نکروزه و قهوه‌ای رنگ در ناحیه طوقه به سمت بالای ساقه ظاهر شد و در هفته دوم علایم سبز خشگی و مرگ کامل بوته مشاهده گردید. بعد از جداسازی مجدد قارچ از بافت بیمار و تطبیق با قارچ اولیه، مشخصات آن بر اساس کلید واترهاوس تشخیص داده شد (Waterhouse *et al.*, 1983).

آزمایشات بررسی تأثیر اسانس‌ها در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*)

تعیین سرعت رشد و بازدارندگی قارچ

نتایج تجزیه واریانس داده‌های بدست آمده نشان داد تمام تیمارها (هشت نوع اسانس و پنج نوع غلظت) در سطح ۱٪ با یکدیگراختلاف معنی‌دار دارند. در این بررسی چهار اسانس برتر که کم‌ترین سرعت رشد در غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام داشتند، به ترتیب آویشن (۰/۱۹ میلی‌متر/روز)، زیره (۰/۲۲میلی‌متر/روز) و پونه (۰/۴۱ میلی‌متر/روز)، ترخون (۰/۴۴ میلی‌متر/روز) تعیین شد و همچنین با افزایش غلظت از ۶۰ به ۳۰۰ پی‌پی‌ام سرعت رشد قارچ در تمام اسانس‌های مورد آزمایش کاهش یافت. در مقایسه میانگین در صد بازدارندگی تیمارها در غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام اسانس‌ها به ترتیب آویشن (۷۹/۲۸ درصد)، پونه (۷۲/۸۵ درصد)، زیره (۶۹/۹۵ درصد)، نعناع (۶۰/۷۰ درصد) ترخون (۶۰/۷۰ درصد) و زنیان (۶۰ درصد) بیش از ۵۰ درصد بازدارندگی از رشد قارچ داشتند؛ ولی اسانس‌های مرزه با (۳/ ۴۱ درصد) و رازیانه با (۱۵/۸۵ درصد) کم‌ترین بازدارندگی از رشد قارچ را نشان دادند. قارچکش ریدومیل- مانکوزب بهترین تیمار در بازدارندگی از رشد کلنی قارچ با ۹۸/۳۲ درصد بود (جدول ۲).



a **b**

شکل ۱- تاثیر اسانس‌های گیاهی با غلظت‌های مختلف بر سرعت و بازدارندگی از رشد قارچ *P. Parasitica* (a) اسانس آویشن (b) اسانس‌ها ،ترخون و پونه، در پنج غلظت ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰ و ۳۰۰ پی‌پی‌ام و شاهد.

Fig. 1. The effect of plant essences with different concentrations on growth rate and inhibitory growth of *P. parasitica* (a) thyme essence, (b) tarragon and pennyroyal, in in five concentrations 60,120,180,240 , 300 ppm and control .

جدول ۲- مقایسه میانگین درصد سرعت رشد و بازدارندگی از رشد کلنی قارچ *P. parasitica* در اسانس‌ها و غلظت‌های مختلف

Table 2. Mean Comparison of the percentage of growth rate and inhibitory colony growth of fungus *P. parasitica* in essences by different concentrations

اسانس‌ها Essences	غلظت (پی‌پی‌ام) Concentration(ppm)	بازدارندگی از رشد (درصد) Inhibitory growth (%)		سرعت رشد (میلی متر) Growth rate (mm)	
آویشن Thyme	60	32.85	q	1.81	ef
	120	44.28	mno	1.31	gh
	180	59.28	h	0.56	lmn
	240	66.42	ef	0.31	lopq
	300	79.28	b	0.19	pq
نعناع Mint	60	9.53	uv	1.87	ef
	120	24.98	r	1.68	f
	180	40.70	op	1.37	g
	240	49.25	ijk	1	hij
	300	60.70	gh	0.5	lmno
زیره Cumin	60	32.85	q	1. 68	f
	120	48.53	jkl	1.31	gh
	180	58.6	h	0.57	ijk
	240	65.7	f	0.625	klmn
	300	69.95	cde	0.22	opq
رازیانه Fennel	60	4.15	w	2.87	a
	120	10.50	tuv	2.37	bc
	180	11.57	tu	2.33	c
	240	14.3	st	2.18	cd
	300	15.85	s	2	de
ترخون Tarragon	60	17.18	s	2.43	bc
	120	38.6	p	2.18	cd
	180	46.38	klm	1.37	g
	240	52.85	i	1.06	ghij
	300	60.7	gh	0.44	mnop
زنیان Ajwain	60	31.4	q	1.87	ef
	120	41.4	nop	1.68	f
	180	44.95	lmn	1.18	gh
	240	60	gh	0.81	jkl
	300	70.65	cd	0.56	lmn
پونه Pennyroyal	60	51.42	ij	1.37	g
	120	60	gh	1.12	ghi
	180	63.6	fg	0.69	klm
	240	67.15	def	0.56	lmn
	300	72.85	c	0.31	nopq
مرزه Savory	60	7.65	vw	2.87	a
	120	10.95	tuv	2.62	ab
	180	22.85	r	1.87	ef
	240	32.85	q	1.31	gh
	300	41.3	nop	1.18	gh
قارچکش Fungicide	1000	98.32	a	0.03	q

*: میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۱٪ هستند.

*: Mean with similar letters in each column are not significantly different at 1% probability level

تعیین غلظت موثر متوسط (EC_{50}) Median Effective Concentration

نتایج حاصل از مقایسه درصد بازدارندگی اسانس‌ها روی رشد میسلیومی قارچ *P. parasitica* (حداقل غلظتی از اسانس می‌باشد که از ۵۰ درصد رشد مسیلیوم قارچ نسبت به تیمار شاهد جلوگیری به‌عمل می‌آورد) نشان داد که حداقل

غلظت بازدارندگی (غلظت Ec_{50}) اسانس آویشن، زیره و پونه در غلظت ۱۸۰ پی‌پی‌ام (به ترتیب با ۵۷/۲، ۶۰ و ۶۰ درصد کاهش رشد نسبت به شاهد) بوده است؛ در حالی‌که Ec_{50} اسانس‌های زینان و ترخون در غلظت ۲۴۰ پی‌پی‌ام و اسانس نعناع در غلظت ۳۰۰ پی‌پی‌ام تعیین گردید. در دو اسانس دیگر (رازیانه، مرزه) میزان بازدارندگی بسیار ناچیز و در هیچیک از غلظت‌ها رشد مسیلیوم قارچ نسبت به شاهد به مرز ۵۰ درصد رسید. بر اساس نتایج این آزمایش اسانس‌های آویشن، زیره و پونه برای آزمایشات گلخانه‌ای انتخاب شدند.

نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای

در این آزمایش همانند مرحله اثبات بیماری‌زایی، علایم یک هفته بعد ظاهر شد و در طی چهار هفته که بوته‌های گوجه‌فرنگی در تیمار شاهد آلوده کاملا پژمرده شدند، آماربرداری نهایی طبق الگوی کوئسادا-اوکامپو و هاوس بک (Quesada-Ocampo and Hausbeck, 2010) محاسبه گردید. تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین‌ها مشخص کرد که اسانس آویشن به ترتیب با ۱/۶۵ و ۱/۳۱ شدت شاخص بیماری در گروه آماری ed نزدیک‌ترین شاخص بیماری با تیمارهای قارچکش ریدومیل-مانکوزب (۰/۹۱ و ۰/۷۵شاخص شدت بیماری) با گروه آماری f و شاهد سالم (۰/۱۸ شاخص شدت بیماری) و گروه آماری g قرار گرفتند. در این آزمایش اسانس زیره با ۱/۸۷ و ۲/۲۴ شاخص شدت بیماری و سپس پونه با ۳/۰۶ و ۲/۵ شاخص شدت بیماری بیش‌ترین میزان بیماری را داشتند. در این بررسی شاخص شدت بیماری در شاهد آلوده ۴/۸۷ بوده است (جدول ۳، شکل ۲). و همچنین در مقایسه میانگین تیمارها، وزن تر وخشک قسمت هوایی در تیمار آویشن و پونه و زیره در غلظت ۰/۳ در هزار به ترتیب با ۲/۴۵، ۰/۴۳، ۱/۶ و ۰/۳۳، ۱/۶ و ۰/۳۵ تقریبا نزدیک به تیمار قارچکش و شاهد سالم بوده است. در تیمار آویشن با کاهش درصد بیماری افزایش نسبی در زیست توده گیاه ایجاد شد (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد وقوع و شاخص شدت بیماری، وزن تر و خشک بوته گوجه‌فرنگی تیمار شده با اسانس‌های مختلف گیاهی

Table 3. Mean comparison of disease incidence percentage and disease severity index of fresh and dry weight of tomato plant treated with different essences

	تیمارها	شاخص شدت بیماری		وزن تر(گرم)		وزن خشک(گرم)	
	Treatments	Disease severity index		Fresh weight(gram)		Dry weight(gram)	
Thyme(0.2 mL^{-1})	آویشن (۰/۲ در هزار)	1.65	d	2.74	ab	0.45	c
Thyme((0.3 mL^{-1})	آویشن (۰/۳در هزار)	1.31	e	2.45	b	0.43	cd
pennyroyal(0.2 mL^{-1})	پونه (۰/۲در هزار)	3.06	b	0.96	d	0.22	ef
Pennyroyal((0.3 mL^{-1})	پونه(۰/۳در هزار)	2.50	c	1.60	c	0.32	de
Cumin(0.2 mL^{-1})	زیره (۰/۲ در هزار)	2.24	c	1.69	c	0.34	cd
Cumin(0.3 mL^{-1})	زیره (۰/۳ در هزار)	1.87	d	1.60	c	0.35	cd
Fungicide(1 mL^{-1})	قارچکش (۱ در هزار)	0.91	f	3.10	a	0.58	b
Fungicide(1.5 mL^{-1})	قارچکش (۱/۵ در هزار)	0.75	f	3.16	a	0.64	ab
Healthy control	شاهد سالم	0.18	g	3.20	a	0.74	a
Infected control	شاهد آلوده	4.87	a	0.68	d	0.14	f

*میانگین‌های دارای حداقل یک حرف مشترک، بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد تفاوت معنی‌دار ندارند.

*Means with at least one similar letter are not significantly different at 5% probability level based on Duncan test

a **b** **c**

شکل ۲- مقایسه گوجه‌فرنگی‌های تیمار شده در آزمایش گلخانه‌ای بررسی اثر اسانس‌ها در کنترل بیماری. (a) اسانس زیره، (b) آویشن، (C) پونه

Fig. 3. Comparison of tomatoes treated in greenhouse experiment and evaluating effect of essences in disease control. (a) Cumin (b) Thyme, (C) Pennyroyal

بحث

در این تحقیق که برای اولین بار برای کنترل قارچ عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گوجه‌فرنگی ناشی از *Phytophthora parasitica* با استفاده از اسانس‌های طبیعی در کشور، اثر هشت اسانس آویشن، زیره، پونه، نعناع، زینان، مرزه، ترخون و رازیانه بر روی قارچ بیماری‌زا گیاهی *Phytophthora parasitica* در محیط کشت و در گلخانه مورد مطالعه قرار گرفت. مشخص شد که نوع اسانس و غلظت‌های مورد استفاده اسانس و نوع قارچ در میزان بازدارندگی اسانس از رشد میسلیومی قارچ و خاصیت قارچکشی اهمیت دارد. از میان هشت اسانس مورد مطالعه بیش‌ترین درصد بازدارندگی از رشد پرگنه (MGI) به ترتیب آویشن، پونه، زیره، نعناع و ترخون در گروه تأثیرگذار بر کاهش رشد مسیلیومی قارچ عامل بیماری قرار گرفتند. همچنین نتایج حاصل از غلظت مؤثر متوسط (EC_{50}) Median Effective Concentration مشخص گردید سه اسانس آویشن، پونه و زیره در غلظت ۱۸۰ پی‌پی‌ام از رشد ۵۰ درصدی قارچ نسبت به شاهد جلوگیری نمود. این تفاوت در میزان بازدارندگی احتمالاً به دلیل تفاوت در ساختار و قارچ‌شناسی گونه‌های مختلف قارچ، تفاوت در میزان حساسیت قارچ‌ها به اسانس‌های گیاهی، تفاوت در میزان تأثیر اسانس‌های گیاهی بر قارچ‌های بیماری‌زا می‌باشد. بر اساس ارزیابی‌های فرهنگ و همکاران (۱۳۹۴) روی اثرات ضدقارچی اسانس گیاه سیر و دو قارچکش متالاکسیل-مانکوزب و مانکوزب علیه سه گونه *Phytophthora caspici*، *P. dreschleri* و *P. melonis* عوامل بوته‌میری فلفل، خیار و طالبی در شرایط آزمایشگاهی نشان داد اسانس سیر خاصیت قارچ ایستایی و تاثیر چشمگیری روی کاهش رشد پرگنه‌های فیتوفترا دارد. بررسی‌های گلخانه‌ای مشخص کرد که اسانس آویشن به ترتیب با ۱/۶۵ و ۱/۳۱ شدت شاخص بیماری با قرار گرفتن در گروه آماری نزدیک به شاخص بیماری تیمار قارچکش (ریدومیل-مانکوزب) و شاهد سالم بیش‌ترین تأثیر را در کنترل بیماری داشتند؛ ولی اسانس زیره و پونه با قرار گرفتن در میانه جدول مقایسه میانگین‌ها در کنترل بیماری موفقیت زیادی نداشتند.

در مجموع نتایج این تحقیق نشان داد که آویشن در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز دارای بیش‌ترین اثر مهارکنندگی رشد بر روی قارچ عامل بیماری *Phytophthora parasitica* در شرایط گلخانه‌ای است. بنابراین با استفاده از این عصاره گیاهی می‌توان از رشد قارچ بیماری‌زای تا حد مناسبی جلوگیری نمود و به تولید محصول سالم و عاری از سموم قارچکش کمک کرد.

منابع References

اعتباریان، ح. ر. ۱۳۷۶. بیماری‌های سبزی و صیفی و روش‌های مبارزه با آن‌ها. انتشارات دانشگاه تهران. ۵۵۲ صفحه.

بی‌نام، ۱۳۹۳. آمارنامه کشاورزی. وزارت جهاد کشاورزی. تهران.

شهریاری، د. و کریمی روزبهانی، ع. ۱۳۷۵. علل خشکیدگی گوجه‌فرنگی در ورامین. گزارش پژوهشی آزمایشگاه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی.

فرهنگ، و.، امینی، ج. و جوادی، ت. ۱۳۹۴. تاثیرات اسانس گیاه سیر مانکوزب و متالاکسیل-مانکوزب روی سه گونه قارچ فیتوفترا، عامل بوته‌میری گیاهان. نشریه کنترل بیولوژیک آفات و بیماری‌های گیاهی ۴(۱): ۴۷-۵۶.

فیضی، پ.، کمالی، ح.، یزدانی، ا. و هاشمی مقدم، ح. ۱۳۹۱. مقایسه روش استخراج کلونجر (تقطیر با آب) و استخراج با حلال برای استخراج اسانس روغنی گیاه آدمک و آنالیز ترکیب مواد با گاز کروماتوگرافی-اسپکتروسکوپی جرمی، مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، ویژه نامه فرآورده‌های طبیعی و گیاهان داوریی: ۳۵-۴۱ .

قادری، ف.، عسکری، ش. و عبدالهی، م. ۱۳۹۰. جداسازی و شناسایی گونه‌های فیتوفتورا از خیار گلخانه‌ای در جنوب استان کهگیلویه و بویراحمد و تعیین واکنش ارقام مختلف خیار به عامل بیماری. مجله پژوهش‌های تولید گیاهی ۱۸: ۳۱-۴۶.

نعمتی، ز. و بنی‌هاشمی، ض. ۱۳۹۴. واکنش ارقام مختلف کدوییان به *P. drechsleri* و *P. melonis* در شرایط گلخانه. بیماری‌های گیاهی. ۵۱: ۳۸۴-۳۷۵.

Amini, M., Safaie, N., Salmani, M. J. and Shams-Bakhsh, M. 2012 .Antifungal activity of three medicinal plant essential oils against some phytopathogenic fungi. Anniversary Edition Trakia Journal of Science 10 (1): 1-8.

Amvam zollo, P. H., Biyti, L., Tchoumbougnang, F., Menut, C., Lamaty, G. and Bouchet, P. 1998. Aromatic plants of tropical central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. Flavour Fragrance Journal 13: 107-114.

Bajpai, V. K. and Kang, S. C. 2012. *In vitro* and *In vivo* inhibition of plant pathogenic fungi by essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. Journal of Agriculture Science Technology 14: 845-856.

Banihashemi, Z. and Fatehi, J. 1989. Reaction of cucurbit cultivars to *Phytophthora drechsleri* and *P. capsici* in greenhouse. Proceedings of the 9th Iranian Plant Protection Congress, 4-7 September, Mashhad, Iran.

Bi, Y., Jiang, H., Hausbeck, M. K. and Hao, J. J. 2012. Inhibitory effect of essential oils for controlling *Phytophthora capsici*. Plant Disease 96: 797-803.

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

D'Mello, J. P. F., Macdonald, A. M. C, Postel, D., Dijksma, W. T. P., Dujardin, A. and Placinta, C. M. 1998. Pesticide use and mycotoxin production in Fusarium and Aspergillus phytopathogens. European Journal of Plant Pathology 104: 741-751.

Etebarian, H. R. 2012. Diseases of vegetable and cucurbit and their control. Published by University of Tehran, 600 pp.

Feen, M. A. and Coffey, M. D. 1984.Studies on the in vitro and in vivo antifungal activity of Fosetyl-Al and phosphorous acid. Phytopathology 74: 606-611

Gilardi, G., Demarchi, S., Gullino, M. L. and Garibaldi, A. 2014. Managing *Phytophthora* crown and root rot on tomato by pre-plant treatments with biocontrol agents, resistance inducers, organic and mineral fertilizers under nursery conditions. Phytopathologia Mediterranea 53(2): 205-215.

Kannwischer, M. E. and Mitchell, D. J. 1981. Relationships of numbers of spores of *Phytophthor*a *parasitica* var *nicotianae* to infection and mortality of tobacco. Phytopathology 71: 69-73.

Khan, M. A., Zhihui, C., Xuemi, X., Khan, A. R. and Ahmed, S. S. 2011. Ultrastructural studies of inhibition effect against *Phytophthora capsici* of root exudates collected from two garlic cultivar salong with their qualitative analysis. Crop Protection 30: 1149-1155.

Marandi, R. J., Hassani, A., Abdollahi, A. and Hanafi, S. 2011. Improvement of the vase life of cut gladiolus flowers by essential oils, salicylic acid and silver thiosulfate. Journal of Medicinal Plants Research 5(20): 5039-5043.

Nazavari, K. H., Jamali, F., Bayat, F. and Modarresi, M. 2016. Evaluation of resistance to seedling damping-off caused by *Phytophthora drechsleri* in cucumber cultivars under greenhouse Conditions. Biological Forum. 8: 54-60.

Quesada-Ocampo, L. M. and Hausbeck, M. K. 2010. Resistance in tomato and wild relatives to crown and root rot caused by *Phytophthora capsici*. Phytopathology 100: 619–627.

Rasooli, I., Moosavi, M. L., Reazee, M. B. and Jaimand, K. 2002. Susceptibility of microorganisms to *Myrtus communis* L. essential oil and its chemical composition. Agriculture Science Technology 4: 127-133.

Ribeiro, O. A. 1978. Source Book of the Genus *Phytophthora*. J. Cramer, Vaduz, Liechtenstein. 417pp.

Riccioni, L., and Orzali, L. 2011. Activity of Tee Tree (*Melaleuca alternifolia,* Cheel) and thyme (*Thymus vulgaris,* Linnaeus.) Essential Oils against Some Pathogenic Seed Borne Fungi. Journal of Essential Oil Research 23: 43-47.

Sabetghadam, N., Fassihiani, A., Sharzei, A. and Rastegar, M. 2012. Identification of *Phytophthora capsici* the incident of root and crown rot of tomato by molecular and morphological method. Proceedings of the 20thIranian Plant Protection Congress, 25–27 August, Shiraz, Iran.

Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S. and Radica, M. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. Food Chemistry 91: 621-632.

Sarpeleh, A., Sharifi, K. and Sonbolkar, A. 2009. Evidence of antifungal activity of wild rue (*Peganum harmala* L.) on phytopathogenic fungi. Journal of Plant Diseases and Protection 116(5): 208-213.

Serra, R., Lourenco, A., Alipio, P. and Venancio, A. 2006. Influence of the region of origin on the mycobiota of grapes with emphasis on Aspergillus and Penicillium species. Mycological Researches 110: 550-553.

Sitara, U., Niaz, I., Naseem, J. and Sultana, N. 2008. Antifungal effect of essential oil on in vitro growth of pathogenic fungi. Pakistan Journal of Botani 40: 409-414.

Sokovic, M. and Griensven, L. J. L. D. 2006. Antimicrobial activity of essential oils and their components against the three major pathogens of cultivated button mushroom *Agaricus bisporus*. European Journal of Plant Pathology 116: 211-224.

Waterhouse, G. M., Newhook, F. J. and Stamps, D. J. 1983. Present criteria for classification of *Phytophthora*. Pp. 139-147. In: Erwin, D. C., Bartnicki-Garcia, S. and Tsao, P. H. (eds.) *Phytophihora,* Its biology, taxonomy. ecology and pathology. APS. St. Paul,

Zhang, J. W., Li, S. K. and Wu, W. J. 2009. The main chemical composition and in vitro antifungal activity of the essential oils of *Ocimum basilicum* Linn. var. *pilosum* (Willd.) Benth. Molecules 14: 273-278