اثر بازدارندگی اسانس‌های آویشن و زنیان روی رشد قارچ *Rhizoctonia solani* عامل شانکر ساقه سیب‌زمینی درشرایط آزمایشگاه و گلخانه

The inhibitory effect of *Thymus vulgaris* and *Carum copticum* essential oil on the growth of *Rhizoctonia solani,* the causal agent of potato stem canker under laboratory and greenhouse conditions

نازنین علی‌بیک طهرانی[۱]، داریوش شهریاری[۲*] و مژده ملکی[۳]

دریافت: ۱۳۹۶/۴/۳ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۰/۱۴

چکیده

سیب‌زمینی یکی از محصولات مهم غذایی و اقتصادی در جهان است، ولی قارچ *Rhizoctonia solani* عامل بیماری شانکر ساقه هر ساله خسارت زیادی به کیفیت و کمیت محصول وارد می‌کند. در این مطالعه، اثر اسانس گیاه آویشن و زنیان در آزمایشگاه روی سرعت رشد پرگنه قارچ و بازدارندگی رشد در غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ ppm در محیط کشت PDA بررسی گردید. در آزمایشات گلخانه‌ای، اسانس‌های آویشن و زنیان با دو غلظت ۰/۵ و۰/۷۵ در هزار، ترکیب آویشن ۰/۲۵ + زنیان ۰/۲۵ در هزار و قارچ‌کش روال تی اس به غلظت ۱/۵ در هزار در قالب طرح کاملاً تصادفی در چهار تکرار بررسی شدند. اسانس‌ها و قارچکش به بستر غده‌های سیب‌زمینی در خاک آلوده به قارچ در گلدان‌ها افزوده شدند. آماربرداری از شدت بیماری مطابق الگوی Das شش هفته بعد از مایه‌زنی انجام شد. نتایج نشان داد سرعت رشد در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام اسانس آویشن (۲۱/۶۳)، زینان (۱۷/۷) و آویشن توأم با زنیان (۱۴) میلی-متر/روز بوده است. در مقایسه بازدارندگی از رشد میسلیومی، اسانس آویشن (۷۰/۸۸ درصد)، آویشن توأم با زنیان (۶۷/۸۵ درصد) بیش از ۵۰ درصد بازدارندگی از رشد قارچ داشتند. نتایج شدت شاخص بیماری در گلخانه مشخص کرد، اسانس آویشن و زنیان به ترتیب با ۲۸/۱ و ۳۵/۹۲ درصد و قارچ‌کش روال تی اس با ۱۷/۱۷ درصد در کنترل قارچ موفق بودند و همچنین، میانگین وزن تر و خشک قسمت هوایی در تیمار آویشن با افزایش نسبی همراه بوده است.

واژگان کلیدی: سیب‌زمینی، *Rhizoctonia solani*، اسانس، آویشن، زنیان، بازدارندگی

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

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

نویسنده مسئول مکاتبات: dshahriari37@gmail.com

مقدمه

سیب‌زمینی (*Solanum tuberosum* L.) یکی از مهم‌ترین محصولات زراعی در سراسر جهان می‌باشد. بر اساس گزارش اخیر فائو (FAO, 2009)، سازمان خوار و بار و کشاورزی ملل متحد، سیب‌زمینی جزء مهم‌ترین محصولات غذایی بوده که نقش مهمی در افزایش امنیت غذایی و کاهش فقر جهانی ایفاء می‌نماید. طبق آمار وزارت جهاد کشاورزی، سطح برداشت سیب‌زمینی از کل گروه سبزیجات کشور برابر با ۳۱/۸ درصد و رتبه اول از سطح برداشت را به خود اختصاص داده ولی از نظر تولید با ۳۰/۷ درصد کل تولیدات سبزی و صیفی در مقام دوم قرار دارد و استان‌های همدان، اردبیل و اصفهان بیش‌ترین سطح زیر کشت در کشور را دارند (بی‌نام ،۱۳۹۳). این گیاه زراعی به طریقه غیرجنسی با کاشت قطعات غده یا غده کامل تکثیر می‌شود. این روش تکثیر اغلب باعث انتقال عوامل بیماری‌زا، از سالی به سال دیگر و از یک نقطه به نقطه دیگر می‌شود. به‌طور کلی در تمام مناطق دنیا، خسارات وارده به محصول سیب‌زمینی بر اثر عوامل بیماری‌زا، ۷ تا ۲۴ درصد بوده اما مقدار این خسارت در مناطقی که بیشتر از مواد شیمیایی (Agrichemical) استفاده می‌کنند، کمتر می‌باشد (Oerke, 2006).

یکی از بیماری‌های مهم خاکزاد در مزارع کشت سیب‌زمینی در ایران، بیماری شانکر ساقه است. عامل بیماری شوری سیاه (black scurf) و شانکر ساقه/ استولون/ ریشه سیب‌زمینی، قارچی خاکزاد بنام *Rhizoctonia solani* Kühn (تلومورف: *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk) می‌باشد (Banville *et al.*, 1996). این قارچ فاقد اسپورهای غیرجنسی بوده و به صورت میسلیوم (ریسه)، اسکلروت (ساختارهای ساکن هیفی غیرجنسی متراکم) یا بازیدیوسپورها basidiospores رشد می‌کند (Ogoshi, 1987). چرخه بیماری ریزوکتونیا سیب‌زمینی شامل شانکرهای ریزوکتونیایی با زخم‌هایی بر روی اندام‌های زیرزمینی گیاه است که در هر مرحله‌ای از رشد گیاه، باتجمع اسکلروت‌ها (ساختارهای قارچی غیرجنسی متراکم) بر روی سطح غده‌های دختری همراه می‌باشد؛ این اسکلروت‌ها به دلیل پراکنش بالای این محصول به صورت غده‌های بذری و رشد رویشی آن در تمام مناطق تحت کشت سراسر دنیا مشاهده می‌شوند (Banville *et al.*, 1996). در تولید انبوه سیب‌زمینی، کنترل ماده تلقیحی بذرزاد از طریق ضدعفونی بذر با سموم دفع آفات امکان پذیر می‌باشد. اسانس‌های گیاهی یکی از بهترین جایگزین‌های سموم شیمیایی محسوب می‌شوند، این ترکیبات به دلیل فرار بودن و ماندگاری بسیار کوتاه مدت در محیط، به عنوان مواد طبیعی سازگار با محیط زیست مطرح می‌شوند (ابراهیمی، ۱۳۹۱). با توجه به نقش و اهمیت اسانس‌های گیاهی در کنترل بیماری‌های گیاهی، ارزیابی اثربخشی عصاره‌های گیاهی آویشن و زنیان در برابر قارچ *R. solani*، عامل بیماری شانکر ساقه سیب‌زمینی در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای در دستور این تحقیق قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه مواد گیاهی و استخراج اسانس به روش تقطیر آب با کلونجر

طی سال‌های ۱۳۹۴ و ۱۳۹۵ گیاه آویشن *Thymus vulgaris* L. از منطقه خجیر (ایستگاه تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران)، گیاه زنیان *Carum copticum* Heirn متعلق به مناطق گرمسیر از بازار تهیه گردید و مطابق با کلیدهای موجود گیاهشناسی (فلور ایران) اقدام به شناسایی و تعیین گونه گردید. سپس گیاهان با آب شرب شهری شسته شدند، اندام‌های میوه و ریشه از آن‌ها جدا گردید و به تفکیک در شرایط آزمایشگاه خشک شدند. مواد گیاهی پس از خشک شدن، آسیاب شده و در داخل ظروف پلاستیکی نگهداری شدند.

برای استخراج اسانس گیاهان از روش تقطیر آب با دستگاه کلونجر مطابق روش فیضی و همکاران (۱۳۹۱) استفاده شد. در مرحله اول آزمایش، پودر آویشن و زنیان به‌طور مستقیم در بالن تقطیر آب قرار گرفت. بعد از ایجاد بخار، بخار آب حاوی مولکول‌های اسانس از مسیر لوله‌های سرد عبورداده شد تا تبدیل به مایع شده و در قسمت گیرنده جمع‌آوری گردد؛ این مرحله تا هنگام ثابت شدن حجم اسانس حدوداً سه تا پنج ساعت به‌طول انجامید. در مرحله

دوم، اسانس‌های حاصل با دقت در بشر ریخته و کمی سولفات سدیم (Na_2So_4) جهت جذب رطوبت اسانس اضافه گردید و پس عبور از صافی با کمی هگزان شستشو داده شد و نهایتاً اسانس حاصل درظرف تیره با درپوش در دمای ۳-۴°C جهت آزمایشات بعدی نگهداری گردید.

جداسازی، خالص‌سازی و شناسایی عامل بیماری

در سال زراعی ۹۴-۹۵ گیاهان آلوده سیب‌زمینی از استان تهران (مزارع شهریار وکرج) جمع‌آوری شد و نمونه‌برداری از طوقه و ریشه گیاهچه‌های آلوده با علایم زردی و پژمردگی با زخم‌های بیضوی رنگ قهوه‌ای در ناحیه طوقه انجام گرفت. دقت گردید در نمونه‌ها زخم‌ها معمولاً فرو رفته با اندازه‌های مختلف باشند و همچنین روی غده لکه‌های برجسته ورقی بی‌شکل و سیاهرنگ (اسکلروت‌ها) تشکیل شده باشد. در آزمایشگاه بافت‌های آلوده به مدت ۲-۱ ساعت توسط آب شرب شهری با ملایمت شسته شدند. سپس ریشه‌ها و میان گره بالای طوقه و ساقه‌های آلوده جدا شده و با هیپوکلریت سدیم یک درصد به مدت ۲تا ۳ دقیقه ضدعفونی سطحی شدند. سپس به قطعات ۵ میلی‌متری تقسیم و در تشتک پتری حاوی محیط Potato Dextrose Agar (شامل ۲۵۰ گرم عصاره سیب زمینی، ۱۶ گرم دکستروز و ۱۸ گرم آگار در یک لیتر آب مقطر) کشت گردید. تشتک‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵ درجه سلسیوس نگهداری شدند. پس از ۲۴ ساعت از رشد پرگنه قارچ نسبت به خالص‌سازی آن با استفاده از روش نوک ریسه اقدام شد. شناسایی جدایه قارچ بر اساس مشخصات مورفولوژیکی ریسه، سختینه، و رنگ پرگنه مطابق کلیدهای شناسایی معتبر انجام شد (Kronland and Stanghellini, 1988).

آزمون بیماری‌زائی در گلخانه

آزمون بیماری‌زایی با استفاده از روش Das یا الگوی ثابت آزمون بیماری‌زایی *Rhizoctonia solani* بر روی سیب‌زمینی انجام گرفت. در این آزمایش سه غده سیب‌زمینی رقم مارفونا با اندازه و شکل تقریباً یکسان (وزن تقریبی ۱۰۰ گرم) در نظر گرفته شد. غده‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم ۳٪ قرار داده شدند و سپس ۵ بار با آب مقطر شستشو شدند. پس از خشک شدن کامل، بر روی سطح غده‌ها با دقت و حفظ شرایط استریل، حفره‌هایی به قطر ۲ و عمق ۶ میلی‌متر با چوب پنبه سوراخ‌کن در نوک ناحیه اتصال به استولون و قسمت میانی غده ایجاد شد. مایه قارچ به مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر از سوسپانسیون میسلیوم از کشت سه روزه جدایه با سرنگ تهیه و به درون حفره‌های غده تزریق گردید و سریعاً دهانه حفره‌ها جهت جلوگیری از ایجاد آلودگی‌های ثانویه توسط پارافیلم و پارافین جامد مسدود شد. در تیمار شاهد از آب مقطر استریل استفاده شد. غده‌های مایه‌زنی شده در خاک استریل درون گلدان کاشته شده و سپس در شرایط مناسب دما و نور و رطوبت تا ظهور علایم نگه‌داری شدند (Das, 2013).

پس از مشاهده علایم بیماری، سه هفته بعد از مایه‌زنی، برای تأیید حضور بیمارگر به عنوان عامل بیماری و تکمیل اصول کخ، گیاهچه‌های آلوده به همراه غده‌ها از خاک خارج شدند. مجدداً پس از جداسازی قارچ از ریشه و طوقه گیاه، خصوصیات مرفولوژیکی و تاکسونومیکی آنها با صفات جدایه‌های مایه‌زنی شده مطابقت داده شدند.

آزمایشات بررسی تأثیر اسانس‌های گیاهی روی قارچ عامل بیماری (*In Vitro*)

این آزمایشات در آزمایشگاه بیماری‌شناسی بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان تهران انجام شد. دراین بررسی‌ها، تیمارها شامل دو اسانس گیاهی آویشن و زنیان، شاهد محیط کشت (آب مقطر)، شاهد قارچ‌کش روال-تی اس (اپیرودیون + کاربندازیم پودر وتابل ۵۲/۵ ٪) و شاهد حلال اسانس‌ها (Tween 20) در پنج غلظت به‌کار گرفته شد. تمام آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی درچهار تکرار در دمای اتاق

۲۵-۲۴ درجه سلسیوس انجام شدند. نتایج حاصل از نظر مشاهده اختلاف معنی‌دار بین تیمارهای مختلف مورد تجزیه واریانس یک‌طرفه ANOVA در سطح اعتماد ۹۵٪ قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن انجام شد.

تعیین سرعت رشد قارچ

به منظور اختلاط اسانس‌ها با محیط کشت PDA ابتدا از توئین ۲۰ درصد (Tween 20) به‌عنوان حلال استفاده شد. سپس غلظت‌های ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۳۰۰ و ۵۰۰ پی‌پی‌ام از اسانس‌ها در ارلن‌مایر تهیه و با محیط PDA در دمای ۴۵-۴۰ درجه سلسیوس مخلوط گردید. برای شاهد محیط کشت، از آب مقطر و شاهد توئین از توئین ۲۰ درصد و شاهد قارچ‌کش روال-تی اس به غلظت یک در هزار استفاده شد. پس از انتقال تیمارها به تشتک‌های پتری استریل و بسته شدن محیط، دیسک‌های ۵ میلی‌متری از حاشیه کلنی قارچ ۷ روزه با چوب‌پنبه سوراخ‌کن تهیه و به مرکز تشتک‌های فوق منتقل شد و تا رشد کامل قارچ در تشتک شاهد آب مقطر در دمای ۲۵°C در انکوباتور نگهداری شد. اندازه‌گیری قطر کلنی قارچ با خط‌کش در روز دوم و سوم انجام شد و تفاضل آن‌ها به عنوان سرعت رشد کلنی ثبت گردید.

تعیین درصد بازدارندگی از رشد MGI

با تکمیل رشد قارچ در تشتک شاهد نسبت به اندازه‌گیری‌ها میزان رشد قارچ در غلظت‌های مختلف دو اسانس گیاهی اقدام گردید و درصد بازدارندگی از رشد با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد: (Riccioni., *et al*, 2011)

$$I=\frac{C_2-C_1}{C_2}\times 100$$ (درصد بازدارندگی از رشد)

I: درصد بازدارندگی، C_1: قطر کلنی در تیمار، C_2: قطر کلنی در شاهد

تعیین خاصیت کشندگی یا بازدارندگی اسانس‌ها

در این مرحله آن دسته از اسانس‌هایی که بیشترین بازدارندگی از رشد قارچ را داشتند، انتخاب شدند. بعد از یک هفته دیسک‌های ۵ میلی‌متر از تشتک‌های پتری مذکور برداشته و به محیط PDA منتقل گردید. تشتک‌ها در انکوباتور در دمای ۲۵°C قرار داده شد و طی یک هفته قطر کلنی قارچ توسط خط کش اندازه‌گیری شد. در صورت رشد مجدد قارچ خاصیت بازدارندگی (-) و در صورت عدم رشد خاصیت کشندگی (+) برای اسانس‌های مورد آزمایش ثبت گردید.

تعیین غلظت مؤثر متوسط Median Effective Concentration (EC_{50}[1])

برای ارزیابی EC50 اسانس‌ها بر روی قارچ *R solani* از داده‌های بازدارندگی استفاده شد و از طریق رگرسیون پروبیت خطی بر روی نمودار با نرم افزار SPSS محاسبه گردید (Feen and Coffey, 1984).

بررسی اسانس گیاهان در کنترل بیماری در شرایط گلخانه‌ای

تهیه مایه قارچ برای آلوده‌سازی خاک

بدین منظور سبوس گندم به میزان ۱۰۰ گرم در ارلن مایر ۵۰۰ سی سی با ۲۰۰ سی سی آب مقطر مخلوط و در اتوکلاو به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس استریل گردید. سپس به هریک از ارلن‌ها ۱۰ دیسک ۸ میلی‌متری از کشت چهار روزه قارچ افزوده ودر دمای اتاق و شرایط نور طبیعی به مدت ۳۰ روز نگهداری شدند. پس از

۱- حداقل غلظتی از اسانس می‌باشد که از ۵۰ درصد رشد مسیلیوم قارچ نسبت به تیمار شاهد جلوگیری به‌عمل می‌آورد.

سپری شدن مدت مذکور سبوس گندم حاوی مسیلیوم و اسکلروت‌های فراوان در دمای اتاق خشک و با هاون به صورت پودر آماده شد (Zhang *et al*, 2014).

آلوده‌سازی غده‌های سیب‌زمینی

در این مرحله ابتدا خاک سترون به نسبت مساوی از کود، خاک رس و ماسه تهیه شد، سپس غده‌های بذری سیب-زمینی رقم مارفونا با ۵ گرم پودرحاوی اندام قارچ (شامل مسیلیوم و اسکلروت‌ها) پوشش داده شد؛ به صورتی که حفره‌ها و سطح غده‌ها کاملاً با پودر مذبور آغشته گردید. در هر گلدان دو غده کاشته شد. سپس برای اجرای آزمایش، اسانس‌های آویشن و زنیان هر کدام به طور جداگانه در غلظت‌های ۰/۵ و ۰/۷۵ در هزار، ترکیب آویشن + زنیان هرکدام با غلظت ۰/۲۵ در هزار، قارچ‌کش روال تی اس به غلظت ۱/۵ در هزار به میزان ۲۰ میلی‌لیتر محلول هم‌زمان با کاشت به منطقه بستر غده ریخته شد. در گلدان‌های شاهد از آب مقطر استفاده شد. این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تکرار اجراء گردید. گلدان‌ها در شرایط گلخانه تحت درجه حرارت ۵±۲۷ درجه سلسیوس نگهداری و هر دو روز یک بار آبیاری شدند (Zhang *et al*., 2014). یادداشت‌برداری پس از ظهور اولین علائم ظاهری *R. solani* شامل زردی و نشکیل اولین حلقه‌های زخم روی طوقه انجام گرفت. ارزیابی از شدت بیماری شش هفته پس از مایه‌زنی با استفاده از معیار درجه‌بندی بر اساس روش کارلینگ (Carling and Summer, 1992) انجام گرفت:

۰- هیچ گونه آلودگی

۱- آلودگی جزیی با لکه‌های کمتر از ۵ میلی‌متر روی جوانه‌ها

۲- آلودگی با لکه‌های بیشتر از ۵ میلی‌متر و حلقه‌ای شدن در برخی از جوانه‌ها

۳- آلودگی بالا با پدیدار شدن لکه‌های بزرگ و حلقه‌ای شدن لکه‌ها همراه با مرگ اکثر جوانه‌ها

۴- از بین رفتن کلیه جوانه‌ها

شاخص شدت آلودگی از رابطه ذیل محاسبه شد

$$\text{شاخص شدت بیماری} = \sum \frac{\text{نمره آلودگی} \times \text{تعداد بوته بیمار}}{\text{کل بوته} \times \text{حداکثرنمره}} \times 100$$

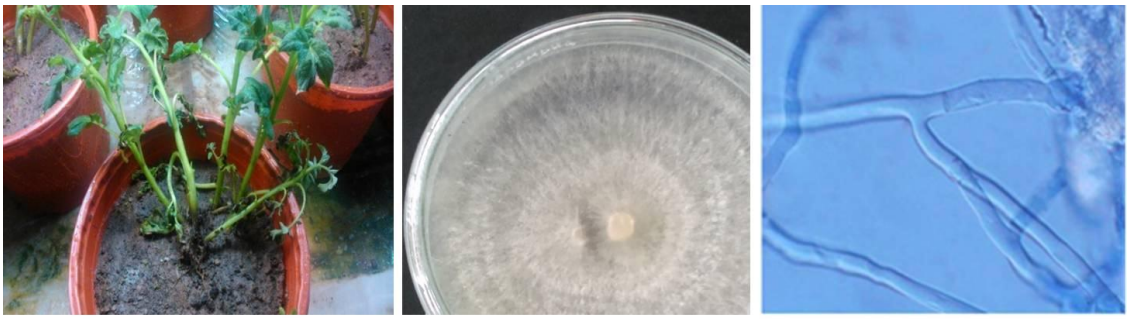
به منظور ارزیابی همبستگی (مثبت یا منفی) اثر شاخص شدت بیماری و درصد کنترل بیماری بوته‌های سیب-زمینی در مقایسه با گیاهان شاهد در پایان آزمایش، وزن تر و خشک قسمت هوایی و ریشه بوته‌های سیب‌زمینی نیز اندازه‌گیری شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌های ثبت شده در قالب طرح کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزار کامپیوتری SPSS و مقایسه تیمارها با آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن انجام شد.

نتایج

اثبات بیماری‌زائی و شناسایی قارچ

پانزده روز بعد از مایه‌زنی جدایه قارچ عامل بیماری بر روی غده‌های سیب‌زمینی، علایم اولیه ابتدا به‌صورت زردی در برگ‌های قدیمی و زخم‌های بیضوی قهوه‌ای روشن در ناحیه ساقه زیر خاک گلدان ظاهر شد و به تدریج به سمت بالای ساقه گسترش یافت. در هفته سوم، ضخیم شدن، لوله‌ای شدن و خمیدگی برگ‌ها به همراه تخریب پیشرفته ساقه در کل بوته و در پایان هفته چهارم پژمردگی و مرگ کامل بوته مشاهده شد (شکل a-۱). بعد از جداسازی مجدد قارچ از بافت بیمار با قارچ اولیه تطبیق داده شد و مشخصات آن بر اساس رشد پرگنه، ویژگی ریسه و اسکلروت به شرح ذیل ثبت شد. رشد ریسه جدایه روی محیط کشت آب آگار، دو روز پس از مایه‌زنی و رشد نوک ریسه‌ها در محیط کشت PDA در روز دوم آغاز شد که سرعت رشد در محیط کشت PDA بالاتر از محیط آب آگار بود. تمامی جدایه‌ها دارای خصوصیات پرگنه (رنگ سفید تا قهوه‌ای) بود (شکل b-۱). مشخصات هیف‌ها در محیط کشت PDA و سپس با

رنگ‌آمیزی هیف‌ها با محلول لاکتوفنل تریپان آبی ۰/۰۵٪ شامل انشعابات هیفی با زوایای تقریبی نود درجه، انشعابات در دیواره‌های انتهایی سلول‌ها و به صورت دیواره‌های عرضی دولیپور (dolipore septae) (شکل c-۱) بود. اکثر جدایه‌ها اسکلروت‌هایی (ساختارهای ساکن هیفی غیرجنسی متراکم) به رنگ قهوه‌ای تیره تا سیاه تولید کردند که از وسط تشتک پتری تا لبه‌های پرگنه‌ها توسعه یافتند. در مراحل آغازی (کشت ۷ روزه)، اسکلروت‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه-ای تیره و با گذشت زمان از قهوه‌ای تیره به سیاه تغییر رنگ دادند. میزان رشد قطری جدایه‌ها درآب آگار ۲٪ در مدت ۴ روز، در دمای ۲۲ درجه سلسیوس ۵ سانتی‌متر ثبت گردید.



شکل ۱- اثبات بیماری‌زایی و مشخصات میکروسکوپی *R. solani* (a) علایم بیماری شانکر ساقه به‌صورت زخم‌های پیشرفته در محل طوقه (b) پرگنه قارچ روی محیط PDA (c) انشعابات هیفی و یک دیواره منفذدار شبکه‌ای

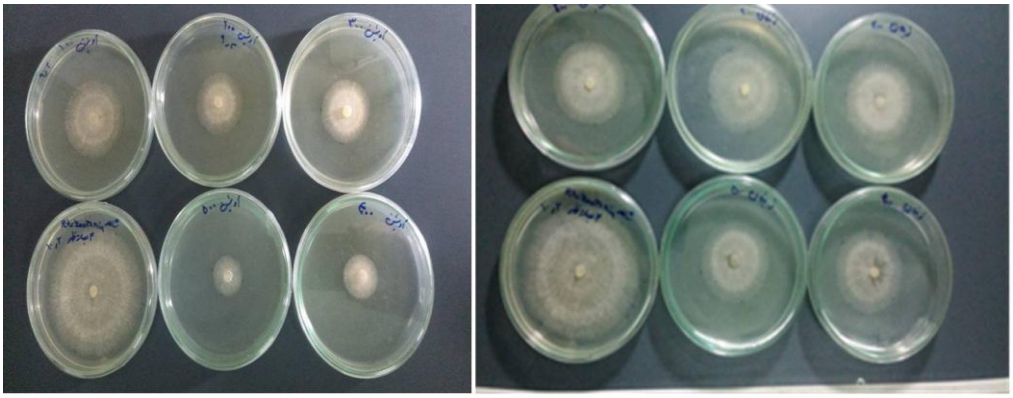
Fig. 1. Pathogenicity and microscopic characteristics of *R. solani* (a) Disease symptoms of stem canker as advanced sores in the crown b) Colony on PDA c) hyphal branches and dolipore wall

آزمایشات بررسی تأثیر اسانس‌ها، قارچ تریکودرما و قارچ‌کش در شرایط آزمایشگاهی (*In vitro*)

تعیین سرعت رشد میسلیومی قارچ

نتایج تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از تأثیر تیمارها بر روی سرعت رشد قارچ *R. solani* که از تفاضل قطر کلنی قارچ در فاصله زمانی ۳ و ۴ روز بعد از کشت در تشتک‌های پتری حاوی PDA به‌دست آمده بود، نشان داد تمام تیمارها در سطح ۱٪ باهم اختلاف معنی دار داشتند. در مقایسه میانگین‌ها، سرعت رشد قارچها در غلظت‌های مختلف اسانس‌ها و همچنین نوع اسانس با هم متفاوت بودند. در این بررسی سرعت رشد در اسانس آویشن و زنیان در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام (۲۱/۶۳ میلی‌متر/روز) و (۱۷/۷ میلی‌متر/روز) و آویشن توأم با زنیان هرکدام در غلظت ۲۵۰ پی‌پی‌ام (۱۴میلی‌متر/روز) تعیین گردید. در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف اسانس روی سرعت رشد کلنی قارچ مشخص گردید با افزایش غلظت از ۱۰۰ به ۵۰۰ پی‌پی‌ام سرعت رشد قارچ در روز در تمام اسانس‌های مورد آزمایش کاهش یافت (جدول ۱).

نتایج تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده از تأثیر اسانس دو گیاه آویشن و زنیان به همراه قارچ‌کش اپیریدیون + کاربندازیم ۵۲/۵٪ (روال تی اس) و شاهد آب مقطر، بر بازدارندگی از رشد قارچ عامل بیماری نشان داد که تیمارها (اسانس‌ها) و (غلظت‌ها) در سطح ۱٪ با یکدیگر اختلاف معنی‌دار داشتند. در مقایسه میانگین‌های اثر بازدارندگی مشاهده گردید که در بین تیمار اسانس‌ها، به ترتیب آویشن (۷۰/۸۸ درصد)، آویشن+ زنیان (۶۷/۸۵ درصد) با بیش از ۵۰ درصد بازدارندگی از رشد قارچ در گروه‌های آماری b، c و e قرار گرفتند؛ ولی اسانس زنیان در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام با (۴۹/۶۷ درصد) بازدارندگی از رشد قارچ در گروه آماری h قرار گرفت. در این بررسی قارچ‌کش اپیریدیون+کاربندازیم ۵۲/۵٪ (روال تی اس) بهترین تیمار در بازدارندگی از رشد کلنی قارچ با ۹۴/۶۳ درصد ثبت شد (جدول ۱ و شکل ۲).



a b

شکل ۲- آزمایش تأثیر ترکیب اسانس‌های آویشن و زنیان با غلظت‌های ۱۰۰ الی ۵۰۰ پی‌پی‌ام مخلوط با محیط کشت بر سرعت رشد قارچ *R. solani* (a) غلظت‌های مختلف آویشن (b) غلظت‌های مختلف زنیان

Fig. 1. Experiment of the combination effect of thyme and Carum essential oils by concentrations of 100-500 ppm mixed with culture medium on the growth rate of *R. solani* (a) different concentrations of *thyme*. (b) different concentrations of *Carum*

جدول ۱- مقایسه میانگین درصد سرعت رشد و بازدارندگی از رشد کلنی قارچ *R. solani* در اسانس‌ها و غلظت‌های مختلف

Table 1. Mean comparison of the percentage of growth rate and growth inhibition of *R. solani* colony in different essential oils and concentrations

اسانس Essential oil	غلظت (پی‌پی‌ام) Concentration(ppm)	بازدارندگی از رشد (درصد) Growth inhibition (percent)		سرعت رشد (میلی‌متر) Growth rate(mm)	
آویشن *Thymus*	100	39.97	l	20.92	b
	200	52.83	g	16.73	e
	300	55.25	f	15.27	f
	400	64.88	d	14.52	g
	500	70.88	b	21.63	i
زنیان *Carum*	100	38.30	m	22.20	a
	200	42.20	k	21.00	b
	300	44.05	j	20.65	b
	400	46.03	i	19.65	c
	500	49.67	h	17.70	d
زنیان+ آویشن	250+250	67.85	c	14.00	h
قارچ‌کش	1000	94.63	a	1.00	j

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

* Mean with similar letters are not significantly different at 1% probability level

تعیین خاصیت کشندگی یا بازدارندگی اسانس‌ها

در آزمایش اثر کشندگی و یا بازدارندگی اسانس‌ها، قارچ بیمارگر بعد از انتقال کلنی قارچ از محیط حاوی اسانس‌ها به محیط PDA مجدداً رشد کرد. در این بررسی مشخص شد هیچ‌کدام از اسانس‌های گیاهی مورد آزمایش خاصیت کشندگی نداشته و اغلب مانع رشد قارچ (بازدارندگی) شدند.

تعیین غلظت مؤثر متوسط Median Effective Concentration (EC50)

نتایج حاصل از مقایسه حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌ها روی رشد میسلیومی قارچ *R. solani* نشان داد که اسانس آویشن در ۲۰۰ الی ۵۰۰ پی‌پی‌ام به ترتیب با ۴۷/۱، ۴۴/۷، ۳۵/۳ و ۲۹/۴ درصد کاهش رشد نسبت به شاهد

بیشترین بازدارندگی از رشد میسلیومی را داشته است؛ درحالی‌که EC50 اسانس زنیان بسیار ناچیزبوده است؛ زیرا در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام رشد مسیلیوم قارچ نسبت به شاهد به مرز ۵۰ درصد رسیده بود. میزان بازدارندگی ترکیب آویشن توأم با زنیان در غلظت ۲۵۰ پی‌پی‌ام نسبت به شاهد ۳۲/۳ درصد تعیین گردید (جدول ۲).

جدول ۲- غلظت EC50 اسانس‌های مختلف نسبت به شاهد بر اساس میزان بازدارندگی از رشد قارچ

Table 2. Ec50 Concentration of different essential oils to control based on inhibitory effect on fungal growth

درصد قطر کلنی نسبت به شاهد Percentage of colony diameter to check	قطر کلنی (mm) Colony diameter(mm)	غلظت اسانس (ppm) Essential Oil Concentration (ppm)	تیمارها Treatments
100	85	0	شاهد *Rhizoctonia* *Rhizoctonia* Check
60	51	100	آویشن *Thymus*
47.1	40	200	
44.7	38	300	
35.3	30	400	
29.4	25	500	
61.1	52	0	زنیان *Carum*
57.6	49	100	
56.4	48	200	
54.11	46	300	
49.4	42	400	
32.3	28	60	زنیان+ آویشن *Carum+ Thymus*

نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای

علایم بیماری از هفته دوم بعد از شروع آزمایش در تیمار شاهد آلوده ظاهر شد و در طی شش هفته بوته‌های سیب‌زمینی به‌طور کامل خشکیده شده و از ین رفتند؛ آماربرداری نهایی از میزان بیماری با استفاده از معیار درجه‌بندی بر اساس روش کارلینگ (Carling and Summer, 1992) انجام گرفت. نتایج تجزیه واریانس داده‌های به‌دست آمده بر اساس شاخص شدت بیماری نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری در سطح ۱٪ وجود دارد. نتایج مقایسه میانگین‌های شدت شاخص بیماری تحت تأثیر تیمار با اسانس‌های آویشن و زنیان و ترکیب دو اسانس مذکور با قارچ-کش روال تی اس مشخص کرد که اسانس آویشن به ترتیب با ۲۸/۱ و ۳۵/۹۲ درصد شدت شاخص بیماری، با قرار گرفتن در گروه آماری de و e نزدیک‌ترین شاخص بیماری با قارچ‌کش روال تی اس با ۱۷/۱۷ درصد به ترتیب در گروه آماری e و f قرار گرفتند؛ در حالی‌که درصد شاخص شدت بیماری در شاهد آلوده برابر با ۹۵/۳۷ و گروه آماری g بوده است. در تجزیه واریانس داده‌ها ی حاصل از اندازه‌گیری وزن تر و خشک قسمت هوایی و ریشه سیب‌زمینی‌ها تفاوت معنی‌دار تیمارها در سطح احتمال ۱٪ درصد به دست آمد؛ مقایسه میانگین وزن تر و خشک قسمت‌های هوایی و ریشه تحت تأثیر تیمارها نشان داد که در تیمار آویشن با کاهش درصد بیماری افزایش نسبی در بیومس گیاه ایجاد شد و مشابه تیمار قارچ‌کش و شاهد سالم بوده است (جدول ۳).

جدول ۳- مقایسه میانگین درصد شاخص شدت بیماری، وزن تر وخشک بوته و ریشه سیب‌زمینی تیمار شده با اسانس‌ها، قارچ تریکودرما و قارچ‌کش

Table 3. Mean Comparison of percentage of disease severity index, fresh and dry weight of shoot and root area of potato treated with essential oils, *Trichoderma* and fungicide

وزن خشک ریشه (گرم)		وزن تر ریشه (گرم)		وزن خشک بوته (گرم)		وزن تر بوته (گرم)		شاخص شدت بیماری		تیمارها
Root dry weight (gr)		Root fresh weight (gr)		Shoot Dry weight (gr)		Shoot fresh weight (gr)		Disease severity index		Treatments
0.53	c	6.68	ed	1.28	e	18.84	e	35.92	de	آویشن (۰/۵ در هزار) *Thymus* (0.5/1000)
0.87	b	7.72	cd	1.84	d	25.95	c	28.10	e	آویشن (۰/۷۵ در هزار) *Thymus* (0.75/1000)
0.53	c	5.74	e	1.26	e	16.62	e	51.55	bc	زنیان (۰/۵ در هزار) *Carum* (0.5/1000)
0.64	c	6.59	de	1.59	de	19.76	de	43.72	cd	زنیان (۰/۷۵در هزار) *Carum* (0.75/1000)
0.51	c	5.80	e	1.53	de	22.80	d	53.10	b	آویشن۰/۲۵+ زنیان (۰/۲۵ در هزار) *Carum+ Thymus* (0.25+0.25/1000)
1.05	a	9.38	b	2.62	b	33.65	b	17.17	f	قارچ‌کش (۱/۵ در هزار) Fungicide(1.5/1000)
1.11	a	11.90	a	3.04	a	37.85	a	3.10	a	شاهد سالم Healthy control
0.13	d	1.09	f	0.34	f	5.08	f	95.27	g	شاهد آلوده Infected control

*: 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

بحث

به‌کارگیری و توسعه استراتژی‌های مدیریت کنترل بیماری مستلزم شناخت عوامل بیوکنترلی سازگار با مکانیزم‌های مختلف تولید می‌باشد. بیماری ناشی از قارچ *Rhizoctonia solani* یکی از مخرب‌ترین عوامل خسارت‌زا در سیب‌زمینی می‌باشد. براساس نتایج این تحقیق، یکی از منابع مقرون به صرفه و ایمن اقتصادی در برابر قارچ عامل شانکر ساقه سیب‌زمینی استفاده از عصاره‌های گیاهی است که علاوه بر خواص ضد قارچی در کنترل بیماری‌ها فاقد اثرات زیان‌بار انسانی و زیست محیطی می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهند که استفاده از روش‌های منفرد در کنترل بیماری موفق نبوده و استفاده از روش‌های تلفیقی با تأکید بر پیش‌گیری از ورود بیماری به مزارع غیر آلوده ضروری است (Babadoost, 2004). در این تحقیق ابتدا اقدام به جداسازی قارچ عامل بیماری از بوته‌های آلوده سیب‌زمینی شد. سپس اثبات بیماری‌زایی بر اساس اصول کخ (Koch) صورت گرفت (Meyer *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2014). شناسایی ویژگی‌های مورفولوژیکی قارچ *Rhizoctonia solani* مطابق منابع معتبر علمی وجود قارچ عامل شانکر ساقه سیب‌زمینی تأیید شد. نتایج این مرحله از آزمایشات با نتایج حاصل از تحقیقات فرانک (Frank, 1981) و داس (Das, 2013) مطابقت دارد. بر اساس تحقیقات انجام شده علائم بیماری بوته‌های برآمده از سطح خاک شامل زخم در ناحیه طوقه و ریشه‌ها، پیچیدگی برگ‌ها به سمت بالا، کلروز، تغییر رنگ برگ‌ها به بنفش و کوتولگی قسمت‌های هوایی بوته می‌باشد (Frank, 1981). همچنین مشخصات مرفولوژیک قارچ مانند انشعابات هیفی و یک دیواره منفذدار شبکه‌ای (dolipore)، اسکلروت‌ها به رنگ قهوه‌ای روشن تا قهوه‌ای تیره که با گذشت زمان به سیاه تغییر رنگ دادند،گزارش شده است (Das, 2013).

ارزیابی فعالیت ضد قارچی دو گونه از اسانس‌های گیاهی علیه قارچ ریزوکتونیا با استفاده از تکنیک مواد غذایی مسموم در شرایط آزمایشگاهی انجام شد که اسانس آویشن (*Thymus vulgaris*) با ۷۰/۸۸ درصد، بیشترین بازدارندگی از رشد و مخلوط اسانس زنیان (*Carum copticum*) با آویشن با ۶۷/۸۵ درصد بازدارندگی از رشد قارچ *R.solani* به عنوان مؤثرترین ترکیبات شناخته شدند. همچنین حداقل غلظت بازدارندگی از رشد میسیلوم (MIC) اسانس آویشن و زنیان در غلظت ۵۰۰ پی‌پی‌ام تعیین گرده است. نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج امینی و همکاران (Amini *et al.*, 2012) مشابهت دارد؛ حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت قارچ‌کش (MFC) سه گیاه دارویی آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*)، آویشن معمولی (*Thymus vulgaris*) و آویشن کوهی (*Thymus kotschyanus*) بر روی رشد میسلیومی چهار قارچ *Pythium aphanidermatum*، *Rhizoctonia solani* (AG4)، *Fusarium graminearum* و *Sclerotinia sclerotiorum* توسط امینی و همکاران (۲۰۱۲) مورد ارزیابی قرار گرفت. حداقل غلظت بازدارندگی با قرار دادن قطعات میسلیومی از پرگنه قارچ‌ها در تشتک پتری حاوی محیط کشت PDA در غلظت‌های مشخصی از اسانس‌ها و مایه‌زنی در دمای ۱±۲۸ درجه سلسیوس به‌دست آمد. تجزیه و تحلیل داده‌ها اثربخشی بالای این اسانس‌ها علیه چهار گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی در غلظت ۲۰۰ میکرولیتر در لیتر با میانگین بازدارندگی از رشد ۱۰۰ درصد را نشان داد (Amini *et al.*, 2012).

در تحقیق دیگر در ارتباط با اثر بازدارندگی چند اسانس گیاهی شناخته شده مثل حنا، فلفل هندی، شمعدانی عطری و Devadaru روی *Rhizoctonia solani*، عصاره‌های آبی برگ فلفل هندی (*Piper betel*) و حنا (*Lawsonia inermis*) و همچنین عصاره‌های اتیل استات چهار گیاه برگ فلفل هندی (*Piper betel*)، حنا (*Lawsonia inermis*)، شمعدانی عطری (*Pelargonium graveolens*) و Devadaru (*Polyalthia longifolia*)، فعالیت‌های ضد قارچی مناسبی را در مقابل رشد میسیلیومی و تشکیل اسکلروت‌های قارچ *R. solani* نشان دادند (Seema *et al.*, 2011).

نتایج مرحله آزمایشات گلخانه‌ای نشان داد که میزان اثر بخشی اسانس آویشن در کنترل بیماری شانکر ساقه سیب‌زمینی ۷۰/۶ درصد، زنیان ۵۴/۲ درصد و قارچ‌کش روال تی اس ۸۲ درصد بود. در این بررسی اسانس آویشن از نظر کنترل بیماری نزدیک به قارچ‌کش عمل کرد. با توجه به این‌که اسانس‌های گیاهی یکی از بهترین جایگزین‌های سموم شیمیایی محسوب می‌شوند، و همچنین به دلیل فرار بودن و ماندگاری بسیار کوتاه مدت در محیط، به عنوان مواد طبیعی سازگار با محیط زیست مطرح هستند و از این‌رو برای مبارزه با شانکر ساقه سیب‌زمینی قابل توصیه خواهند بود.

منابع References

ابراهیمی، م. ۱۳۹۱. بررسی اثر سه اسانس گیاهی برگ بو، اکالیپتوس و چریش روی مؤلفه های زیستی، مرگ و میر، باروری و طول عمر شته جالیز، پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی. دانشگاه ارومیه. ۱۰۰ صفحه.

بلالی، غ. ر.، ۱۳۷۹. استفاده از شناساگر DNA در تعیین میزان آلودگی به *Rhizoctonia solani* درخاک مزارع سیب زمینی. خلاصه مقالات چهاردهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه صنعتی اصفهان. صفحه ۹۸.

بی‌نام، ۱۳۹۳. آمارنامه کشاورزی. وزارت جهاد کشاورزی معاونت برنامه ریزی و اقتصادی دفتر آمار و فناوری اطلاعات، جلد اول، تهران.

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 فرآورده های طبیعی وگیاهان داوریی. صفحات ۳۵-۴۱.

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: 1-8.

Babadoost, M. 2004. *Phytophthora* Blight: A Serious Threat to Cucurbit Industries University of Illinois Department of Crop Sciences. AW - 101. Turner Hall 1102S. Goodwin Ave. Urbana, IL 61801

Banville, G. J., Carling, D. E. and Otrysko, B. E. 1996. Rhizoctonia disease on potato. Pp. 321-330. In: Sneh, B., Jabaji-Hare, Neate, S. and Dijst, G. (eds.) Rhizoctonia Species: Taxonomy, Molecular Biology, Ecology, Pathology and Disease Control. Kulwer Academic Publishers.

Carling D. E. and Summer, D. R. 1992. *Rhizoctonia*. Pp. 157-165. In: Singleton, L. L., Mihail, J. D. and Rush, C. M. (eds.). Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi. St Paul, Minnesota, The American Phytopathological Society Press.

Das, S. 2013. *Rhizoctonia solani* on potato in New Zealand: Pathogen characterization and identification of double-stranded RNA viruses that may affect their virulence. Ph.D. Thesis, Lincoln University, New Zealand. 241 pp.

FAO. 2009. New light on a hidden treasure. International Year of the Potato 2008. An end-of-year review**.** In New light on a hidden treasure. 134pp.

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

Frank, J. A. 1981. Rhizoctonia canker (black scurf). Pp. 52–54. In: W. Hooker, E. b. (eds.). Compendium of potato diseases. Paul, Minn, American Phytopathological Society.

Kronland, W. C. and Standghellini, M. E. 1988. Clean shido technique for observation of anastomosic and nuclear condition of *Rhizoctonia solani*. Phythology 78: 820-822.

Meyer, L., Wehner, F. C., Nel, L. H. and Carling, D. E. 1998. Characterization of the crater disease strain of *Rhizoctonia solani*. Phytopathology, 88: 366-371.

Oerke, E. C. 2006. Crop losses to pests. Journal of Agricultural Science 144: 31-43.

Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kuhn. Annual Review of Phytopathology 25: 125-43.

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

Seema, M. S. S. E., Sreenivas, S. S., Rekha, N. D. and Devaki, N. S. 2011. *In vitro* studies of some plant extracts against *Rhizoctonia solani* Kuhn infecting FCV tobacco in Karnataka Light Soil, Karnataka, India**.** Journal of Agricultural Technology 7: 1321-1329.

Zhang, X. Y., Yu, X. X., Yu, Z., Xue, Y. F. and Qi, L. P. 2014. A simple method based on laboratory inoculum and field inoculum for evaluating potato resistance to black scurf caused by *Rhizoctonia solani*. Breeding science 64: 156-163.