بررسی اثر بازدارندگی عصاره اتانولی و آبی *Cinclidotus fontinaloides* (Hedw.) P. Beauv بر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی *Fusarium solani* و *Bipolaris sorokiniana* در محیط آزمایشگاه و گلخانه

Inhibitory effects of ethanolic and aquatic extracts of *Cinclidotus fontinaloides* (Hedw.) P. Beauv. on phytopathogenic fungi *Fusarium solani* and *Bipolaris sorokiniana in vitro* and *in vivo*

رقیه اسدبلند[۱]، محمدرضا اصلاحی[۲*]، علیرضا ایرانبخش[۳] و سعید شیرزادیان[۴]

دریافت: ۹۸/۷/۱۱ پذیرش: ۹۸/۱۱/۲۸

چکیده

خزه‌ها گروهی از گیاهان ساده، کوچک و خشکی‌زی با خواص ضدمیکروبی هستند. در این پژوهش خواص بازدارندگی عصاره اتانولی و آبی یک گونه خزه با نام *Cinclidotus fontinaloides* بر رشد دو قارچ بیماری‌زای گیاهی با نام‌های *Fusarium solani* و *Bipolaris sorokiniana* از عوامل بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه در غلات به‌ویژه گندم با استفاده از روش دیسک‌گذاری روی محیط کشت PDA مورد بررسی قرار گرفت و با اثر قارچ‌کش‌های صنعتی بنومیل، دیفنوکونازول و تتراکونازول مقایسه شد. همچنین به منظور تعیین MIC از روش اختلاط با محیط کشت استفاده شد. جهت بررسی اثر عصاره خزه‌ها بر رشد قارچ‌های مذکور در محیط گلخانه، بذر گندم رقم چمران به عصاره خزه‌ها آغشته گردید و سپس در گلدان‌های حاوی مخلوط خاک و خاک آلوده به قارچ‌های بیماری‌زا با نسبت ۱:۱۰، کاشته و به مدت ۳۵ روز در گلخانه با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و نور طبیعی نگهداری شدند. پس از طی مدت زمان یاد شده، میزان پوسیدگی ریشه و ساقه بوته‌های گندم مورد بررسی قرار گرفت. داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9.2 و با استفاده از آزمون دانکن مورد تجزیه و تحلیل و مقایسه قرار گرفتند. نتایج بیانگر تأثیر انواع عصاره‌ها بر قارچ‌های مذکور بود؛ ضمن این‌که عصاره اتانولی تأثیر بازدارندگی بیشتری بر *B. sorokiniana* نسبت به *F. solani* نشان داد، در حالی‌که عصاره آبی تأثیر بازدارندگی یکسان بر رشد قارچ‌های مذکور داشت. همچنین نتایج نشان دهنده کاهش میزان پوسیدگی در گلدان‌های تحت تیمار نسبت به گلدان‌های شاهد (بدون تیمار) بود.

واژگان کلیدی: خزه، عصاره، بنومیل، دیفنوکونازول، تتراکونازول

۱- دانشجوی دکتری سیستماتیک گیاهی، دانشکده علوم، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات گیاه‌پزشکی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، اهواز، ایران

۳- استاد، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۴- دانشیار پژوهش، بخش تحقیقات رستنی‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

نویسنده مسئول مکاتبات: mr_eslahi@yahoo.com

مقدمه

خزه‌گیان (بریوفیت‌ها) گروهی از گیاهان ساده، کوچک و خشکی‌زی شامل سه رده خزه‌ها، جگرواش‌ها و شاخواش‌ها و معمولاً ساکن منطق مرطوب هستند. تاکنون بیش از ۲۲۰۰۰ گونه از خزه‌گیان در سراسر جهان گزارش شده است (Deora and Guhil, 2014). این گروه در دوران دونین (حدود ۴۰۰ میلیون سال قبل) ظاهر شده و در دوره کربونیفر (۳۴۵ میلیون سال قبل) گسترش یافته‌اند (قهرمان، ۱۳۷۳).

بریوفیت‌ها به‌دلیل دارا بودن مواد شیمیایی خاص، دارای خواص ضدسرطانی، ضدمیکروبی و ضدقارچی می‌باشند. ترکیباتی مثل پلی‌گودیال (Polygodial) از جنس *Porella* و نورپیگویزون (Nurpiguisone) از گونه *Concephalum conicum* و لونولارین (Lunularin) از گونه *Lunularia cruciate* به عنوان مواد ضدمیکروبی شناخته شده‌اند. همچنین فعالیت ضدقارچی عصاره متانولی *Herberta aduncus* علیه *Rhizoctonia solani*، اثر عصاره آبی *Bryum capilare* علیه *Drechslera maydis* و اثر بازدارندگی عصاره متانولی *Philontis revolute* علیه جوانه‌زنی هاگ قارچ *Helminthosporium turcicum* به‌خوبی شرح داده شده است (Deora and Guhil, 2014).

در سال‌های اخیر، به دلیل افزایش علاقه به استفاده از مواد طبیعی و بالا رفتن سطح آگاهی مردم، محققان با جدیت بیش‌تری به موضوع استفاده از اسانس‌ها و عصاره‌ها در جهت کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی پرداختند.

در مطالعات بورل و همکاران (Borel *et al*., 1993) پس از عصاره‌گیری از هشت گونه خزه، ماده بازدارنده رشدی به نام دیکرانین (Dicranin) از عصاره *Dicranum scoparium* استخراج و با موفقیت علیه میکروارگانیسم‌های انگل به کار برده شد. در مطالعات لوریمر و پری (Lorimer and Perry, 1994) اسید چرب جدیدی به نام سیکلوپنتیل (Cyclopentenyl) از خزه‌های: *D. japonicum* و *D. scopairum* با توانایی مهار رشد قارچ *Pyricularia oryzae* عامل بیماری سوختگی برنج استخراج گردید.

ضمن بررسی اثر عصاره‌های مختلف خزه‌های *Bryum cellular* و *B. capilare* روی قارچ بیماری‌زای گیاهی *Drechslera maydis* عامل بیماری سفیدی برگ در ذرت، مشاهده گردید که عصاره اتانولی خزه‌های مذکور بالاترین میزان ممانعت از جوانه‌زنی هاگ را نسبت به سایر حلال‌ها دارند (Deora and Guhil, 2014).

در تحقیق دیگری عصاره آبی و اتانولی *C. fontinaloides* با استفاده از کروماتوگرافی گازی (GC-MS) مورد بررسی قرار گرفت و ۱۶۰ ترکیب شیمیایی از جمله متیل۳-۱دی دئتریو۲- پروپنیل اتر(Methyl-d3 1-dideuterio-2-propenyl ether)، هگزامتیل سیکلوتری سیلوکسان (Hexamethylcyclotrisiloxane) و ۱-هگزانول (1-Hexanol) از عصاره آبی با خواص آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی و آنتوسیانین بالا شناسایی شدند (Yayintas *et al.*, 2017). همچنین در همین تحقیق، ۱۵۲ ترکیب شیمیایی از عصاره اتانولی شامل فناسیل تیوسیانت (Phenacylthiocyanate)، بوتان‌ان‌تریل (Butanenitrile)، بنزوئیک اسید (Benzoic acid) و نونانوئیک اسید (Nonanoic acid) و تترادکان (Tetradecane) خواص آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی و آنتوسیانین استخراج شدند.

در ایران نیز شیرزادیان و همکاران (۱۳۸۸) ضمن بررسی اثر عصاره‌های مختلف ۲۳ گونه از بریوفیت‌ها شامل ۲۱ گونه خزه و ۲ گونه جگرواش روی ۷ گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی مشاهده کردند که عصاره اتانولی شش گونه خزه به اسامی: *Grimmia pulvinata*, *Philontis marchica*, *Drepanocladus aduncus*, *Bryum pallens*, *Haplocladium sp.*, *Plagimnium rugicum* و دو گونه جگر واش به اسامی: *Pellia epiphylla* و *Dumortiera hirsuta* دارای بیش‌ترین طیف تأثیر قارچ‌کشی بودند.

در این پژوهش اثر بازدارندگی عصاره آبی و اتانولی خزه *C. foninaloides* بر رشد قارچ‌های بیماری‌زای *F. solani* و *B. sorokiniana* عامل بیماری پوسیدگی ریشه و ساقه گندم در محیط آزمایشگاه و گلخانه مورد بررسی قرار گرفت و با اثر قارچ‌کش‌های صنعتی بنومیل، تتراکونازول و دیفنوکونازول مورد مقایسه قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه گیاهی

گونه *C. fontinaloides* (Hedw.) P. Beauv. در تابستان سال ۱۳۹۷ از زیستگاه طبیعی خود (تخته سنگ‌های در معرض جریان شدید آب) در بخش چلوشهر اندیکا در استان خوزستان (با مختصات جغرافیایی °۴۹ و '۶۸ شرقی - °۳۲ و '۴۰ شمالی)، جمع‌آوری گردید و پس از انتقال به آزمایشگاه با استفاده از منابع تاکسونومی از جمله اسمیت (Smith, 2004) و کورشنر (Kürschner 2006, 2007, 2008) شناسایی شد (شکل ۱).

شکل ۱- نمونه‌های استفاده شده خزه *C. fontinaloides*

Fig. 1. Used samples of *C. fontinaloides*

آماده سازی عصاره

نمونه‌های گیاهی پس از انتقال به آزمایشگاه گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خوزستان با استفاده از آب به خوبی شسته و در سایه خشک شدند. سپس جهت تهیه عصاره اتانولی مقدار یک گرم از نمونه خشک، آسیاب شده با ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۶٪ (Merck Co.) مخلوط و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با دمای ۲۵ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت، با استفاده از سانتریفیوژ به مدت ۳۰ دقیقه و با شدت ۲۵۰۰ دور در دقیقه، بقایای گیاهی از عصاره‌ها جدا شدند. سپس به منظور جداسازی حلال‌ها، از دستگاه تقطیر دوار استفاده شد. در پایان محلول نهایی با استفاده از آب مقطر به حجم ۱۰ میلی‌لیتر رسانده شد. همه مراحل (به جز مرحله استفاده از دستگاه تقطیر دوار) جهت تهیه عصاره آبی نیز تکرار شد. عصاره‌های تهیه شده، جهت انجام مراحل بعدی در شیشه‌های درب‌دار تیره رنگ در یخچال در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تهیه قارچ‌های بیماری‌زا

قارچ بیماری‌زا *Fusarium solani* (Mart.) جدایه Sacc با کد ثبتی (IRAN 11 C) از آزمایشگاه بیماری‌شناسی مرکز تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور (تهران) و قارچ بیماری‌زا *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.) جدایه Shoemaker با کد ثبتی

(WK 110) از آزمایشگاه گیاه‌پزشکی پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران (کرج) تهیه گردید و سپس در آزمایشگاه گیاه‌پزشکی مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان (اهواز) در دمای ۲۷ درجه سلسیوس مجدداً بازیابی و نگهداری گردید.

بررسی اثر ضدقارچی عصاره آبی و اتانولی خزه *C. fontinaloides* بر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در محیط آزمایشگاه

برای بررسی اثر ضدقارچی عصاره‌های آبی و اتانولی خزه *C. fontinaloides* بر قارچ‌های *F. solani* و *B. sorokiniana* از روش انتشار دیسک (Disc Diffusion) استفاد شد (Harmala *et al*., 1992). بدین منظور در اتاقک کشت کنار شعله، با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن، قطعاتی به قطر شش میلی‌متر از حاشیه کشت هفت روزه قارچ‌های مورد آزمایش جدا و به مرکز پتری‌های حاوی محیط کشت PDA منتقل شد. سپس دیسک‌های کاغذی آغشته به عصاره آبی و اتانولی و همچنین قارچ‌کش‌ها با فاصله معین از مرکز پتری، روی محیط کشت قرار گرفته و به آن کمی فشار آورده تا دیسک با محیط کشت به‌طور کامل تماس یابد. پس ازدیسک‌گذاری، پتری‌ها به‌طور وارونه در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. قطر هاله بازدارندگی در سه نوبت و با فاصله ۲۴ ساعت به‌وسیله خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و ثبت گردید. آنالیز آماری و تحلیل داده‌های مربوط به قطر هاله بازدارندگی در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با استفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9.2 انجام شد و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC)

برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده عصاره‌ها، با استفاده از روش رقیق‌سازی سریالی (Two-fold serial dilution method) غلظت‌های مختلف (۱۰۰٪، ۵۰٪، ۲۵٪، ۱۲/۵٪، ۶/۲۵٪ و ۳/۱۲۵٪) از محلول اصلی عصاره‌های اتانولی و آبی تهیه گردید (Deora and Guhil, 2014). سپس میزان ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های به‌دست آمده از هر عصاره را در دمای ۴۵ درجه سلسیوس با ۱۰ میلی‌لیتر محیط کشت PDA مخلوط و در پتری استریل شده توزیع گردید. سپس در هر پتری یک قطعه شش میلی‌متری از کشت هفت روزه قارچ‌های مورد نظر در مرکز پتری قرار داده شد. همه پتری‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۲۷ درجه سلسیوس قرار داده شدند. پس از طی مدت زمان مقرر، قطر پرگنه قارچ در هر پتری با استفاده از خط‌کش میلی‌متری اندازه‌گیری و ثبت گردید. جهت اندازه‌گیری درصد بازدارندگی رشد از فرمول پندی و همکاران (Pandey *et al*., 1982) به‌صورت زیر استفاده گردید:

۱۰۰ × [میزان رشد در کنترل/ (میزان رشد در نمونه – میزان رشد در کنترل)] = درصد بازدارندگی رشد

در این حالت کم‌ترین غلظت عصاره که رشد قارچ در آن مشاهده نگردید، به‌عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) ثبت شد. آنالیز آماری و تحلیل داده‌های مربوط به تیمارها (شامل عصاره‌های آبی و اتانولی)، غلظت عصاره‌ها و اثر متقابل آن‌ها در قالب بلوک‌های کاملاً تصادفی (CRB) با استفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9.2 انجام شد و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

بررسی اثر ضدقارچی عصاره‌های آبی و اتانولی خزه *C . fontinaloides* بر قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی در محیط گلخانه

برای انجام این مرحله از پژوهش، ابتدا قارچ‌های *F. solani* و *B. sorokiniana* به‌مدت یک هفته روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. سپس محیط کشت قارچ‌ها به قطعاتی به مساحت ۲ سانتی‌متر مربع تقسیم و به فلاسک‌های

درپوش‌دار ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۰۰ گرم ماسه، ۵ گرم آرد ذرت و ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل انتقال داده شدند. سپس بسترهای تلقیح شده در دمای اتاق به مدت ۳ هفته نگهداری شدند تا تمام سطح بستر از قارچ پوشیده شد. سپس به ازای ۱ کیلو خاک گلدان ضدعفونی شده، میزان ۱۵ گرم از این محیط کشت اضافه شد. بذر گندم رقم چمران با غوطه‌ور شدن در محلول هیپوکلریت سدیم ۱ درصد به‌مدت ۲ دقیقه ضدعفونی شده و پس از سه بار شستشو با آب مقطر استریل، با عصاره آبی و اتانولی بذرمال شد و سپس در گلدان‌هایی به قطر ۲۰ سانتی‌متر در خاک آلوده شده کاشته شدند. در هر گلدان ۱۰ بذر کاشته شد و گلدان‌ها به‌مدت ۳۵ روز در گلخانه مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خوزستان با دمای ۲۵ درجه سلسیوس و نور طبیعی نگهداری شدند. به منظور بررسی میزان تأثیرگذاری عصاره‌ها، همین مراحل با قارچ‌کش بنومیل به عنوان تیمار شاهد تکرار شد. ولی از قارچ‌کش‌های دیفنوکونازول و تتراکونازول استفاده نگردید. در پایان مدت مقرر، ۱۰ بوته از هر تیمار (عصاره آبی، اتانولی، بنومیل و بدون تیمار) از گلدان خارج شدند و پس از بررسی ریشه‌ها میزان بروز بیماری بر اساس معیار والورک (Wallwork, *et al*., 2004) تعیین گردید (جدول ۱). این آزمایش در سه تکرار انجام شد. آنالیز آماری و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی (CRD) با استفاده از نرم‌افزار SAS ver. 9.2 انجام شد و میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن مورد مقایسه قرار گرفتند.

جدول۱- ارزیابی میزان بیماری بر اساس معیار والورک (والورک و همکاران، ۲۰۰۴)

Table 1. Evaluation of disease rate based on Wallwork's index (Wallwork, *et al*., 2004)

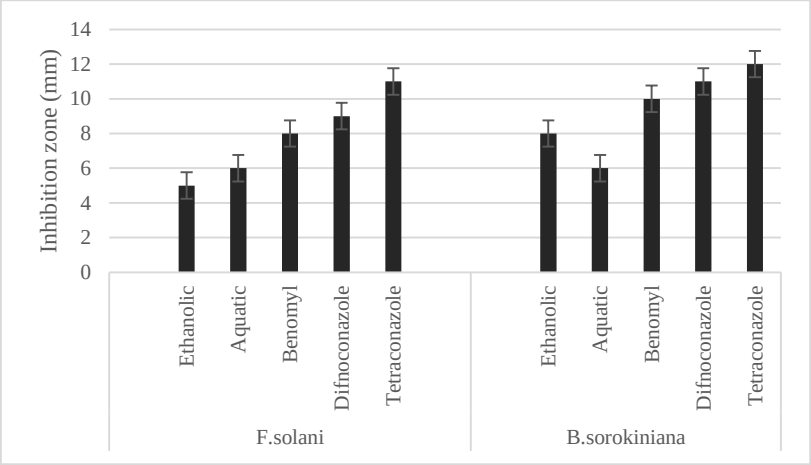
میزان پوسیدگی ریشه و ساقه Rate of root and stem rot	درجه بیماری Degree of disease
1-10 %	1
10- 25%	2
25- 50%	3
50-75%	4
> 75%	5

نتایج و بحث

بررسی اثر ضدقارچی عصاره اتانولی و آبی گونه *C. fontinaloides* به روش انتشار دیسک در محیط کشت PDA نشان داد که میانگین قطر هاله بازدارنده رشد به ترتیب برای *F.solani* برابر ۵ و ۶ میلی‌متر و برای *B. sorokiniana* به ترتیب برابر با ۸ و ۶ میلی‌متر بود. در حالی‌که میانگین قطر هاله بازدارنده قارچ‌کش‌های بنومیل، دیفنوکونازول و تتراکونازول به ترتیب برای *F. solani* برابر با ۸، ۹ و ۱۱ میلی‌متر و برای *B. sorokiniana* به ترتیب برابر با ۱۰، ۱۱ و ۱۲ میلی‌متر بوده است. این نتایج نشان می‌دهد که با وجود یکسان بودن اثر بازدارندگی عصاره آبی بر رشد هر دو قارچ بیماری‌زا، میزان تأثیرگذاری عصاره اتانولی بر رشد قارچ *B. sorokiniana* نسبت به *F. solani* بیش‌تر بود. این وضعیت درباره قارچ‌کش‌های بنومیل، دیفنوکونازول و تتراکونازول نیز به همین صورت بود، به این معنی که اثر بازدارندگی قارچ‌کش‌های مذکور بر رشد قارچ *B. sorokiniana* بیش از *F. solani* ثبت گردید (شکل ۲).

مطالعه حداقل غلظت بازدارنده (MIC) عصاره خزه‌ها بر رشد قارچ‌ها نشان داد که در مورد هر دو نوع عصاره مورد بررسی، غلظت ۳/۱۲۵٪ به عنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد (MIC) بود (جدول ۲). در بالاترین غلظت مورد بررسی (۱۰۰٪) عصاره اتانولی بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر رشد *B. sorokiniana* به میزان ۲۲/۷٪ و کم‌ترین اثر بازدارندگی را بر رشد *F. solani* به میزان ۱۵٪ نشان داد. در پایین‌ترین غلظت مورد بررسی (۳/۱۲۵٪) عصاره اتانولی بیش‌ترین اثر بازدارندگی را بر رشد *F. solani* به میزان ۱۰٪ و کم‌ترین اثر بازدارندگی را بر رشد *B. sorokiniana* به میزان ۴/۵۴٪ داشت

(جدول ۲). علاوه بر این، آنالیز آماری داده‌ها نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین عصاره‌ها، غلظت‌ها و اثر متقابل عصاره‌ها و غلظت‌ها بود (جدول ۳).



شکل ۲- فعالیت ضدقارچی عصاره‌های آبی و اتانولی گونه *C. fontinaloides* و قارچ‌کش‌ها بر رشد قارچ‌های *F. solani* و *B. sorokiniana* (قطر هاله بازدارندگی، میلی‌متر)

Fig. 2. Antifungal activities of extracts of *C. fontinaloides* and fungicides on growth *of F. solani* and *B. sorokiniana* (Inhibition zone, mm)

جدول ۲- بررسی اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های اتانولی و آبی خزه *C. fontinaloides* بر رشد قارچ‌های *F. solani* و *B. sorokiniana* و تعیین MIC

Table 2. Effects of different concentrations of ethanolic and aquatic extracts of *C. fontinaloides* on growth of *F. solani* and *B. sorokiniana* and MIC determination

قارچ	تیمار	Concentration			غلظت			MIC
Fungus	Treatment	100%	50%	25%	12.5%	6.25%	3.125%	
F. solani	Ethanolic	15 a	10 c	10 c	10 c	10 a	10 a	3.125 %
	Aquatic	17a	11 b	11 b	11 b	5 c	5 c	3.125 %
B. sorokiniana	Ethanolic	22.7a	18.1 a	18.1 a	9.09 d	9.09 b	9.09 b	3.125 %
	Aquatic	16.3 a	18.1a	18.1 a	13.6 a	4.54 d	4.54 d	3.125 %

* در هر ستون، مقادیر دارای حروف یکسان، باهم تفاوت معنی‌داری ندارند (دانکن P>0.05).

*Within each column having the same letters are not significantly different (Duncan p< 0.05).

جدول ۳- آنالیز آماری ANOVA اثر عصاره‌ها، غلظت‌ها و اثر متقابل عصاره‌ها و غلظت‌های مختلف آن‌ها بر رشد قارچ‌های *F. solani* و *B. sorokiniana*

Table 3. ANOVA table for the effect of moss extracts, different concentrations of moss extracts and their interaction on the growth inhibition of fungi *F. solani* and *B. sorokiniana*

Source of variance	منبع واریانس	درجه آزادی df.	مجموع مربعات Sum of Squares	میانگین مربعات Mean Squares	F value	Pr>F
Extract	عصاره	3	227.3717000	75.7905667	13.61	<0.0001
Concentration	غلظت	5	977.7420944	195.5484189	35.11	<0.0001
Extract × Concentration	عصاره× غلظت	15	385.9286500	25.7285767	4.62	<0.0001
Error	خطا	48	267.309933	5.568957		
Total	کل	71	1858.352378			
CV	ضریب تغییرات	19.46369				

با توجه به آنالیز داده‌ها، اثر بازدارندگی رشد عصاره‌های آبی و اتانولی خزه و قارچ‌کش‌های دیفنوکونازول و تترا کونازول و بنومیل بر رشد قارچ‌های بیماری‌زا در محیط آزمایشگاه تفاوت معنی‌داری داشتند (جدول ۴). به‌طوری‌که همه تیمارهای مورد بررسی در محیط آزمایشگاه به‌طور جداگانه گروه‌بندی شده‌اند. اما آنالیز داده‌های حاصل از بررسی تیمارها بر قارچ‌های مورد آزمایش در محیط گلخانه تفاوت معنی‌داری نشان نداد. عصاره‌های آبی و اتانولی به‌طور یکسان به میزان ۵۸/۳۳ درصد از بروز بیماری در بوته‌های گندم آلوده به *F. solani* جلوگیری کردند؛ در حالی‌که این میزان درباره بوته‌های گندم آلوده به *B. sorokiniana* به ترتیب به میزان ۴۷/۱۱ و ۴۹/۸۹ درصد نسبت به بوته‌های کاشته شده در گلدان‌های شاهد (بدون تیمار) بود (جدول ۵).

جدول ۴- آنالیز آماری ANOVA اثر بازدارندگی عصاره خزه‌ها و قارچ‌کش‌ها بر رشد قارچ‌های بیماری‌زا *F. solani* و *B. sorokiniana*

Table 4. ANOVA table for the effect of moss extracts and fungicides on inhibition of growth of *F. solani* and *B. sorokiniana.*

Source of variance	منبع واریانس	درجه آزادی df.	مجموع مربعات Sum of Squares	میانگین مربعات Mean Squares	F Value	Pr>F
Extract	عصاره	6	106.0714286	17.6785714	34.96	<0.0001
Error	خطا	14	7.0800000	0.5057143		
Corrected Total	کل اصلاح شده	20	113.1514286			

جدول ۵- مقایسه اثر عصاره‌های مختلف خزه *C. fontinaloides* و قارچ‌کش‌ها بر میزان رشد قارچ‌های بیماری‌زا *F. solani* و *B. sorokiniana* در محیط آزمایشگاه و گلخانه

Table 5. Effects of different extracts of *C. fontinaloides* and fungicides on growth of *F. solani and. B. sorokiniana in vitro* and *in vivo*

Treatment	تیمار	*In vitro* محیط آزمایشگاه		*In vivo* محیط گلخانه	
		F. solani	*B. sorokiniana*	*F. solani*	*B. sorokiniana*
Control	شاهد	0.00 e	0.00 f	0.00 c	0.00 c.
Etanolic	اتانولی	4.5 d	6.00 e	58.33 b	49.89 b
Aquatic	آبی	6.00 c	8.00 d	58.33 b	47.11 b
Benomyl	بنومیل	8.00 b	10.00 c	100 a	100 a
Difnoconazol	دیفنوکونازول	9.00 b	11.00 b	N.T	N.T
Tetraconazol	تتراکونازول	10.83 a	12.00 a	N.T	N.T

* در هر ستون، مقادیر دارای حروف یکسان، باهم تفاوت معنی‌داری ندارند(دانکن P>0.05).

*Within each column having the same letters are not significantly different (Duncan p< 0.05).

** N.T: Not Tested

یافته‌های به‌دست آمده در پژوهش حاضر بر اساس روش انتشار دیسک در محیط‌کشت PDA، نشان‌دهنده تأثیر بازدارندگی مناسبی بر رشد هر دو سویه قارچ بیماری‌زا دارد. این نتایج با یافته‌های شیرزادیان و همکاران (۱۳۸۸) هم‌سویی دارد. وی عصاره مختلف ۲۳ گونه از بریوفیت‌ها شامل ۲۱ گونه خزه و دو گونه جگرواش را روی هفت گونه قارچ بیماری‌زای گیاهی با نام‌های *Alternaria alternate*، *F. solani*، *F. oxysporium*، *Rhizoctonia solani*، *Macrophomina phaseolina*، *Verticillium dahlia* و *Pythium* sp در محیط آزمایشگاه با روش اختلاط با محیط کشت مورد بررسی قرار داد. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره اتانولی شش گونه خزه به نام‌های *Grimmia pulvinata*، *Philontis marchica*،

Drepanocladus aduncus، *Bryum pallens*، *Haplocladium* sp. و *Plagimnium rugicum* و دو گونه جگرواش با نام‌های *Pellia epiphylla* و *Dumortiera hirsute* اثر بازدارندگی چشم‌گیری بر رشد قارچ‌های مذکور داشتند.

لاتینوویچ و همکاران در بررسی خواص ضدقارچی عصاره *C. fontinaloides* و *Porella platyphylla* علیه قارچ بیماری‌زای گیاهی *Botryosphaeria dothidea* و*Calosphaeria* sp. در غلظت‌های مختلف، اثرات سرکوب کننده رشد میسلیوم قارچی را در سه غلظت ۵ میکرولیتر،۱۰ میکرولیتر و ۱۵ میکرولیتر مشاهده نمودند. در پژوهش حاضر نیز عصاره اتانولی و آبی *C. fontinaloides* علیه قارچ‌های *F. solani* و *B. sorokiniana* در محیط آزمایشگاهی اثرات بازدارندگی مطلوبی نشان داده‌اند (Latinovic *et al*., 2019).

روش انتشار دیسک یک روش غربال‌گری برای تعیین حساسیت میکروارگانیسم‌ها نسبت به مواد بازدارنده است و از آنجا که این روش تحت تأثیر میزان و سرعت انتشار مواد بازدارنده در محیط کشت قرار دارد، برای اندازه‌گیری دقیق فعالیت ضدمیکروبی مناسب نیست (Almedia *et al*., 2006) از طرفی استفاده از روش‌های ارزیابی مختلف در تحقیقات، ممکن است به مشاهده یافته‌های متفاوت در اندازه‌گیری میزان اثر مواد بازدارنده بیانجامد (Singh *et al*., 2005). لذا علی‌رغم تفاوت گونه‌ای قارچ‌های مورد بررسی، نتایج حاصل از این مطالعه و تحقیق اشاره شده تا حدی با هم هم‌خوانی دارد.

مطالعه دوراگده و همکاران در بررسی اثربازدارندگی غلظت‌های مختلف قارچکش بنومیل بر رشد جدایه های مختلف قارچ *F. solani*، دریافتند که طیف وسیعی از غلظت‌ها از ۲۵ ppm تا ۱۰۰ ppm بر رشد جدایه های مورد بررسی اثر متفاوت داشتند. در پژوهش حاضر نیز قارچکش بنومیل روی سویه‌های مختلف قارچ‌های مورد بررسی اثر متفاوت داشت (Dorugade *et al*., 2015).

ماسیلو و همکاران در بررسی قارچ‌کش صنعتی دیفنوکونازول بر رشد میسیلیوم گونه‌های مختلف *F. graminearum*، *F. proliferatum* و *F. verticillioides* نشان دادند که این قارچ‌کش دارای اثر بازدارندگی متفاوتی از ۷۷٪ تا ۹۰٪ در بالاترین غلظت موردبررسی (۲۵۰ میلی‌گرم بر لیتر) و بازدارندگی ۶۷٪ تا ۸۲٪ در پایین‌ترین غلظت مورد بررسی (۲/۵ میلی‌گرم بر لیتر) بود (Masiello *et al*., 2019). همچنین بالیا و جادجا با بررسی شش قارچ‌کش سیستمیک از جمله کاربندازیم، دیفنوکونازول، تری‌سیکلوزول، هگزاکونازول، مایکوبوتانیل و پروپیکونازول در غلظت‌های ۵۰ppm، ۱۰۰ppm، ۲۵۰ppm و ۵۰۰ppm بر قارچ *F. solani* دریافتند که قارچ‌کش دیفنوکونازول در کم‌ترین غلظت مورد بررسی، میزان ۷۵/۵۳٪ بازدارندگی رشد نشان می‌دهد (Bhaliya and Jadeja, 2014). این نتایج با یافته‌های بات و سریواستاو درباره تأثیر بالای قارچ‌کش‌های گروه تریازول‌ها بر قارچ *F. solani* هم‌خوانی دارد (Bhat and Srivastava, 2003).

امروزه با کاهش تمایل برای مصرف قارچ‌کش‌ها، پژوهشگران برای دست‌یابی به ترکیبات طبیعی و دوست‌دار محیط زیست بسیار مشتاق هستند. علی‌رغم اهمیت کارایی، ترکیبات جدید ویژگی‌هایی از جمله تجزیه سریع و بر جا ماندن بقایای کم و بی‌خطر در مواد غذایی نیز باید در نظر گرفته شود. بر اساس نتایج پژوهش حاضر، عصاره‌های آبی و اتانولی خزه *C. fontinaloides* در محیط آزمایشگاه و گلخانه اثر بازدارندگی مناسبی بر رشد قارچ‌های بیماری‌زای گیاهی *F. solani* و *B. sorokiniana* نشان داد که می‌توانند به عنوان ترکیبات قارچ‌کش زیستی به منظور کنترل بیماری‌های قارچی فرموله شده و به تولید تجاری برسند.

منابع References

شیرزادیان، س.، افشاری آزاد، ه. و خلقانی، ج. ۱۳۸۸. بررسی مقدماتی تأثیر ضدقارچی عصاره بریوفیت‌ها. آفات و بیماری‌های گیاهی ۷۷(۱): ۲۲-۱.

قهرمان، ا. ۱۳۷۳. کروموفیت‌های ایران. جلد سوم. مرکز نشر دانشگاهی. تهران. ۷۰۰ صفحه.

Almedia, A. A. P., Farah, A., Silva, D. A. M., Nunan, E. A. and Beatriz, M. A. G. 2006. Antibacterial activity of coffee extracts and selected coffee chemical compounds against *Enterobacteria.* Journal of Agricultural and Food Chemistry 54: 8738 -8743.

Bhaliya, C. M. and Jadeja, K. B. 2014. Efficacy of different fungicides against *Fusarium solani* causing coriander root rot. The Bioscan 9 (3): 1225-1227.

Bhat, N. M. and Srivastava, L. S. 2003. Evaluation of some fungicides and neem formulations against six soil borne pathogens and three *Trichoderma* spp. in vitro. Plant diseases research 18(1): 56-59.

Borel, C., Welti, H., Fernandez, H. and Colmenarse, M. 1993. Dicranin, an antimicrobial and 15-lipoxygenase inhibitor from the moss *Dicranum scoparium*. Journal of Natural Products 56(7): 1071-1077.

Deora, G. S. and Guhil, N. 2014. Bryophytes: A potent tool for controlling some fungal diseases of crop plants. International Journal of Pharmaceutical Science Invention 3(6): 21- 26.

Dorugade, S. P., Walawade, M. N. and Kamble, S. S. 2015. Toxicity of fungicides on *Fusarium solani* causing dry rot of elephant foot yam. International Journal of Advanced Research 3(6): 1501-1504.

Harmala, P., Vuorela, H., Tornquist, K. and Hiltunen, R. 1992. Choice of solvent in the extraction of *Angelica archangelica* roots with reference to calcium blocking activity. Planta Medica 58: 176-183.

Kürschner, H. 2006. A key to the pleurocarpous mosses (Bryophytina) of the Near and Middle East towards a bryophyte flora of the Near and Middle East, 5. Nova Hedwigia 83: 353-386.

Kürschner, H. 2007. A key to the Pottiaceae (Bryopsida - Bryophytina) of the Near and Middle East Towards a bryophyte flora of the Near and Middle East, 6. Nova Hedwigia 84: 21-50.

Kürschner, H. 2008. A key to the acrocarpous mosses (Bryophytina p. p., excl. Pottiaceae) of the Near and Middle East. Towards a bryophyte flora of the Near and Middle East, 7. Nova Hedwigia 86: 43-103.

Latinovic, N., Sabovljevic, M. S., Vujicic, M., Latinovic, J. and Sabovljevic, A. 2019. Growth suppression of plant pathogenic fungi using Bryophyt extracts. Bioscience Journal 35: 1213-1219.

Lorimer, S. D. and Perry, N. B. 1994. Antifunjal Hydroxyacetophenones from the New Zealand Liwerwort, *Plagiochila fasciculate*. planta of medica 60(4): 386- 387.

Masiello, M., Somma, S., Ghionna, V., Logrieco, A. F. and Moretti, A. 2019. In Vitro and in Field Response of Different Fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* Species Causing Ear Rot Disease of Maize. Toxins 11: 1-18.

Pandey, D. K., Trpathi, N. N., Tripathi, R. D. and Dixit, S. N. 1982. Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *H. suaveolens*. Zeit. Pflazenkraneaten and Pflanznschutz 89: 344-349.

Singh, G., Marimuthu, P., Heluani, C. S. and Catalan, C. 2005. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of Nigella sativa seeds. Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 2297-230.

Smith, A. J. E. 2004. The Moss Flora of British and Ireland; Cambridge University Press, 1024pp.

Wallwork, H., Butt, M., Cheong, J. P. E. and Williams, K. J. 2004. Resistance to crown rot in wheat identified through an improved method for screening adult plants. Australasian Plant Pathology 33: 1–7.

Yayintas, O. T., Alpaslan, D., Yuceer, K. Y., Yilmaz, S. and Sainer, N. 2017. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and anthocyanin activities of mosses (*Cinclidotus fontinaloides* (Hedw.) P. Beauv. and *Palustriella commutata* (Hedw.) Ochyra) gathered from Turkey. Natural Product Research 1-7.

Inhibitory effects of ethanolic and aquatic extracts of *Cinclidotus fontinaloides* (Hedw.) P. Beauv. on phytopathogenic fungi *Fusarium solani* and *Bipolaris sorokiniana* in vitro and in vivo

R. Asadboland[1], M. R. Eslahi[2*], A. R. Iranbakhsh[3] and S. Shirzadian[4]

Received: 03 Oct., 2019 Accepted: 17 Feb., 2020

ABSTRACT

Mosses are a group of simple, small and xerophyte plants that have been shown to have anti-cancer, anti-microbial and anti-fungal effects. In this study, the inhibitory effects of ethanolic and aquatic extracts of a moss species named *Cinclidotus fontinaloides* on the growth of two phytopathogenic fungi *Fusarium solani* and *Bipolaris sorokiniana*, the causal agents of root and stem rot in crops, especially wheat, were studied by using disk diffusion method on PDA medium and mixing with culture medium to determine the MIC and compared with the effect of industrial fungicides benomyl, difenoconazole and tetraconazole. Data were analyzed by using SAS software v. 9.2 and the means were compared by using Duncan's test ($P < 0.05$). The results confirmed the inhibitory effect of different extracts on the fungi, but ethanolic extracts showed higher growth inhibitory effects on *F. solani*; further more aquatic extract had the same effects on tested fungi. To investigate the effect of moss extracts on the growth of these fungi *in vivo*, Chamran cultivar seeds were mixed with moss extracts planted in pots containing a ratio of 1:10 mixture of soil and soil contaminated with fungi and kept in a greenhouse at 25 ° C and natural light for 35 days. After the prescribed period, the rate of root and stem rot of wheat plants was examined. The results show a reduction in the rate of rot in treated pots compared to control pots.

Keywords: Mosses, Extract, Benomyl, Difnoconazole, Tetraconazole

1. PhD Student, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Plant Protection, Khouzestan Agriculture and Natural Resource Research and Education Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Ahvaz, Iran.
3. Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4. Associated Professor, Department of Botany, Iranian Research Institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

Corresponding author: mr_eslahi@yahoo.com