کاربرد عصاره‌های متانولی آویشن، اسپند، زیره‌ی سبز و چای کوهی در کنترل *Fusarium culmorum* و *F. graminearum* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای

صنم احترامی[۱]، سویل نعمت اللهی[۲*] و بهنام پوزشی میاب[۳]

۱- دانشجوی سابق کارشناسی ارشد گروه گیاه پزشکی واحد تبریز دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استادیار، گروه گیاه پزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- گروه گیاهپزشکی، واحد مرند، دانشگاه آزاد اسلامی، مرند، ایران.

* مسئول مکاتبه nematollahi2001@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۱۹

چکیده

قارچ‌های *Fusarium culmorum* و *F. graminearum* از مهم‌ترین عوامل بیماری‌زای غلات هستند که خسارت‌های کمی و کیفی به گندم وارد می‌آورند. با توجه به خطرات زیست محیطی کاربرد ترکیبات شیمیایی، استفاده از روش‌های جایگزین در مدیریت این بیمارگرها از ضرورت برخوردار می‌باشد. در این تحقیق اثر عصاره‌های متانولی آویشن، اسپند، زیره‌ی سبز و چای کوهی در مهار رشد این دو بیمارگر در غلظت‌های ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. نتایج نشان داد که از بین تمامی عصاره‌های مورد آزمایش، عصاره‌ی متانولی آویشن در غلظت ۱۰۰۰ پی-پی‌ام با ۸۱/۲۵ درصد بازدارندگی از رشد میسلیومی، موثرترین تیمار علیه *F. culmorum* بود. عصاره‌ی متانولی اسپند نیز در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام با ۸۲/۳ درصد بازدارندگی، دارای بیشترین اثر بر رشد میسلیومی *F. graminearum* بود. عصاره‌ی آویشن کمترین حداقل غلظت بازدارندگی (یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کمترین حداقل غلظت کشندگی (دو میلی-گرم بر میلی‌لیتر) علیه قارچ *F. culmorum* را داشت. عصاره‌ی اسپند نیز دارای کمترین حداقل غلظت بازدارندگی (۰/۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و کمترین حداقل غلظت کشندگی (۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) علیه قارچ *F. graminearum* بود. عصاره‌های متانولی آویشن و اسپند، در شرایط گلخانه‌ای نیز موجب افزایش وزن تر و خشک ریشه‌ها و ساقه‌های گندم در مقایسه با گیاهان شاهد شدند.

واژه های کلیدی: فعالیت ضد قارچی، عصاره، گیاهان دارویی، گندم.

مقدمه

گندم با نام علمی *Triticum aestivum* L. در ردیف مهمترین محصولات استراتژیک ایران قرار دارد که در سطح وسیعی از مناطق مختلف کشور بصورت دیم و آبی کشت می شود (کاظمی اربط ۱۳۸۴). *Fusarium culmorum* و *F. graminearum* جزومهم‌ترین گونه‌های خسارت‌زای فوزاریوم در مزارع گندم هستند (صفائی و همکاران ۱۹۹۰، سمایلی ۱۹۹۶، اسکرم و همکاران۲۰۱۳) و سبب کاهش قابل توجه محصول می‌شوند. بعضی از جدایه‌های این بیمارگرها، علاوه بر ایجاد خسارت کمی در محصول، زهرابه‌های قارچی نیز تولید می‌کنند که برای بشر و حیوانات خطرناک هستند (نلسون و همکاران ۱۹۹۳، پاری و همکاران ۱۹۹۵). حیدریان و ارشاد (۱۳۸۰) به‌منظور تعیین عوامل پوسیدگی طوقه و ریشه گندم در استان چهار محال و بختیاری، مزارع گندم آبی مناطق مختلف این استان را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که در بین قارچ‌های بیماریزا، *F. graminerarum* و سپس *F. culmorum* بیشترین فراوانی برخوردار بوده و جزو بیمارگرهای عمده‌ی طوقه و ریشه‌ی غلات محسوب می‌شوند.

امروزه به‌دلیل افزایش جمعیت، نیاز بـه تولیـد مـواد غذایی بیشتری وجود دارد و از طرفـی جامعـه‌ی بشـری برای تولیـد فـرآورده‌هـای کشـاورزی سـالم و عـاری از بیماری با دشواری رو به رو است. روش‌هـای شـیمیایی، در کنترل آفات و بیماری‌های گیاهی در کوتاه‌مدت نتـایج موثری به‌همـراه داشـته‌انـد امـا بـه‌تـدریج اثـرات سـوء ترکیبات شـیمیایی بـر موجـودات زنـده و محـیط زیسـت آشکار گردیده‌است از این رو، روش‌هـای مختلفـی ماننـد کنترل بیولوژیک و استفاده از عصاره‌ی گیاهـان دارویـی به‌منظور رفـع ایـن مشـکل توصـیه شـده‌انـد. عصـاره‌ی گیاهان دارویی به‌دلیل عوارض جانبی کمتر، عدم مقاومت پاتوژنی، پایین بودن هزینه‌ی تولید، تجزیه شدن در خاک و عـدم آلـودگی زیسـت محیطـی مـی‌تواننـد جـایگزین مناسبی بـرای سـموم شـیمیایی باشـند (قاسـمی ۲۰۱۰). اثرات ضد قارچی بسیاری از عصـاره‌هـا و اسـانس‌هـای گیاهی بر روی بیمارگرهای مختلف بررسی شده اسـت (حبیـب زاده و بیگـی ۱۳۹۷ ،رسـولی و همکـاران ۲۰۰۶، سولو و همکاران ۲۰۰۷). با توجه بـه گـرایش جهـانی بـه طب گیاهی در سـال‌هـای اخیـر و خـواص آنتـی‌بیـوتیکی آویشن، اسپند، چای کوهی و زیره سبز و از آن جایی که گونه‌های مختلف این گیاهان در ایـران در دسـترس مـی-باشـند، مطالعـه‌ی حاضـر بـا هـدف مقایسـه‌ی اثـر مهارکنندگی این گیاهـان بـر پوسـیدگی‌هـای فوزاریـومی سنبله و طوقه‌ی گندم انجام شد.

مواد و روش ها

جمع آوری و آماده سازی گیاهان

پس از جمع آوری چهار گیـاه آویشـن، اسـپند، زیـره سبز و چای کوهی در خرداد ماه ۱۳۹۵ از اطـراف تبریـز (منطقه پیام مرند، دامنه‌های میشو)، قسـمت هـای هـوایی پس از شستشـو در شـرایط آزمایشـگاه و دور از تـابش نور مستقیم آفتاب، خشک شدند. سپس، توسط آسیاب به طور کامل خرد گردیـده و تـا زمـان انجـام آزمایشـات بعـدی در کیسـه‌هـای محـافظ نسـبت بـه ورود هـوا و رطوبـت، در فریـزر ۱۸- درجـه‌ی سلسـیوس نگـه‌داری شدند.

تهیه‌ی عصاره متانولی

ابتدا ۴۰ گرم از پودر خشک هر یک از گیاهان مـورد بررسی در ۴۰۰ سی سی حلال متانول ریخته شده و به-مدت ۲۴ ساعت روی شیکر مغناطیسی با سرعت رفـت و برگشت ۱۵۰ حرکت در دقیقه در دمای اتـاق و در محـیط آزمایشگاه قرار داده شدند سپس ارلن‌ها به دور از تابش مستقیم خورشید توسط صافی، عصاره‌گیری شـدند. بـه منظور جداسـازی حـلال آلـی از عصـاره‌هـا، از دسـتگاه روتـاری در خـلاء (مـدل IKA RC10، سـاخت آلمـان) استفاده گردید. در ادامه رقـت‌هـای سـریالی بـه صـورت ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ پـی‌پـی‌ام و در مـورد عصـاره‌ی گیاهی چای کوهی رقت‌های ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ پـی‌پـی‌ام نیـز تهیه شد. عصاره‌هـای رقیـق شـده در رقـت‌هـای مـورد آزمایش پس از سرد شدن نسبی محیط کشـت PDA بـه آن اضافه شدند.

جدایه‌های قارچی

جدایه‌های قارچی اسـتفاده شـده در ایـن تحقیـق از دانشگاه آزاد اسلامی واحـد مرنـد تهیـه شـد. گونـه‌هـای مـورد اسـتفاده در ایـن تحقیـق *F. culmorum* و *F. graminearum* بودند. برای بررسی دقیق‌تر ریخت‌شناختی و تاکسونومیکی جدایه‌ها و بررسی صفات ماکروسکوپی و میکروسکوپی، از محیط‌های غذایی PDA، SNA و CLA استفاده شد. شناسایی ریخت‌شـناختی بـر اسـاس منـابع علمی در دسترس بویژه کلیدها و مقـالات معتبـر موجـود نظیر بوث (۱۹۷۱)، نلسون و همکـاران (۱۹۸۳) و لزلـی و سامرل (۲۰۰۶) انجام گرفت.

اثبات بیماریزایی

مایه‌زنی گیاه گندم با آلوده‌سازی خاک توسط بـذور ارزن آلوده به جدایه‌های قارچی مورد نظر انجام گرفـت. در این آزمایش از گیاهچه‌هـای یـک هفتـه‌ای رقـم مـیهن گندم استفاده شد. جهـت تهیـه‌ی مایـه تلقـیح، ابتـدا بـذور ارزن به مدت ۲۴ ساعت در آب خیسانده شـدند و سـپس در شیشه‌های مک کارتنی[1] ریختـه شـده و دو مرتبـه بـه فاصله ۲۴ ساعت سترون شدند. جدایه‌های قارچی مـورد نظر روی بذر ارزن به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجـه-

[1]Mccartney bottle

ی سلسیوس رشد داده شدند (اسنه و همکاران ۱۹۹۱). دو یا سه عدد بذر ارزن مایه زنی شده قارچ در دو سانتی متری خاک کنار ریشه قرار داده شده و گیاهان مایه‌زنی شده در گلخانه در دمای ۲۵ درجه‌ی سلسیوس نگهداری شدند. پنج هفته پس از مایه‌زنی در صورت تغییر رنگ ساقه از طوقه تا اولین گره، بیماری زایی اثبات شد.

ارزیابی تاثیر عصاره بر درصد بازدارندگی از رشد قارچ در محیط کشت PDA

پس از سرد شدن نسبی محیط کشت PDA، عصاره‌های استریل شده در غلظت‌های مورد آزمایش در زیر هود به آن اضافه شده و پس از اختلاط کامل، محیط کشت حاوی عصاره‌ها در داخل تشتک‌های پتری ریخته شد. قرص‌های میسلیومی شش میلیمتری از حاشیه پرگنه هفت روزه قارچ تهیه شده و در وسط محیط کشت حاوی عصاره قرار داده شد. در نهایت، پتری‌ها به مدت هفت روز در دمای ۲۵ درجه‌ی سلیوس قرار گرفتند. هر غلظت در سه تکرار مورد آزمون قرار گرفت و محیط کشت فاقد عصاره به‌عنوان شاهد، با قارچ بیمارگر تلقیح شد. شعاع پرگنه قارچ‌ها روزانه اندازه‌گیری شده و به سانتی‌متر ثبت گردید. این اندازه‌گیری تا زمان پر شدن پتری شاهد به‌وسیله میسلیوم‌های قارچ عامل بیماری ادامه یافت. درصد بازدارندگی از رشد در هر کدام از تیمارها نسبت به تیمار شاهد با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (دو و همکاران ۲۰۰۴):

$$IP = (C - T)/C \times 100$$ (٪ بازدارندگی)

C: قطر پرگنه‌ی قارچ در تشتک شاهد.

T: قطر پرگنه‌ی قارچ در تشتک تیمارهای عصاره‌ها.

تعیین غلظت عصاره‌ها

برای تعیین غلظت عصاره‌های بدست آمده، از روش تعیین وزن خشک عصاره‌ها استفاده شد بدین‌صورت که برای هر عصاره به طور جداگانه سه لوله‌ی آزمایش خالی توسط ترازوی دیجیتالی حساس وزن شد و سپس از هر کدام از عصاره‌های گیاهی یک میلی‌لیتر به هر لوله اضافه شد. پس ازنگهداری لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ تا ۵۰ درجه‌ی سلسیوس، عصاره‌ها کاملاً خشک شدند. لوله‌ها مجدداً توزین شد و با کم کردن وزن لوله‌های خالی، میانگین وزن خشک عصاره‌های گیاهی در هر میلی‌لیتر بدست آمد.

آزمون حداقل غلظت بازدارندگی (MIC)[1] و حداقل غلظت کشندگی (MFC)[2]

برای اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) عصاره‌های گیاهی، از روش میکروتیتر پلیت[3] (پفالر و همکاران ۲۰۰۴) استفاده شد. در این روش از پلیت‌های ۹۶ چاهکی الایزا[4] استفاده گردید. با توجه به وزن خشک عصاره‌ها در هر میلی لیتر، رقت‌هایی که به‌عنوان MIC و MFC نسبی عصاره‌ها تعیین شد به مقادیر وزنی عصاره‌ها تبدیل گردید. در نتیجه به‌منظور تعیین دقیق MIC و MFC، به‌وسیله ترازوی حساس مقادیر وزنی به روش سریال‌های رقتی ۱/۲، ۱/۴، ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴، ۱/۱۲۸، ۱/۲۵۶، ۱/۵۱۲ و ۱/۱۰۲۴ از پودر عصاره‌ها توزین و در یک میلی لیتر از محیط PDB[5] حل شدند. برای تهیه سوسپانسیون اسپور قارچ‌های بیمارگر، تعداد ماکروکنیدی‌ها با استفاده از لام هموسایتومتر[6] شمارش و غلظت نهایی اسپور روی 2×10^6 ماکروکنیدی در میلی لیتر تنظیم شد (آبریل و همکاران ۲۰۰۸). در شرایط سترون به هر چاهک از پلیت الایزا، ۱۰۰ میکرولیتر محیط PDB حاوی عصاره به‌ترتیب سریال رقت افزوده شد سپس به هر چاهک که حاوی رقت‌های مختلف عصاره بود ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی افزوده شد. دو چاهک نیز با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت PDB که یکی حاوی ۱۰ میکرولیتر اسپور قارچ و دیگری فاقد اسپور قارچ بود به‌عنوان شاهد مثبت و منفی در نظر گرفته شدند. پس از نگهداری ۴۸ ساعته در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس، چاهک‌ها از نظر رشد پرگنه قارچی بررسی شدند. عدم رشد پرگنه قارچ در چاهک نشان دهنده تاثیر مثبت کنترل کنندگی عصاره در رقت مورد نظر بود. کمترین غلظتی که در آن رشد

[1]Minimum Inhibitory Concentration
[2] Minimum Fungicidal Concentration
[3]Microtiter plate
[4]Enyzme-linked immunosorbent assay (ELISA)
Potato Dextrose Broth [5]
[6]Hemocytometer

اسپورهای قارچ مهار شده و هیچ رشدی انجام نشد به عنوان MIC تلقی گردید (نطنزیان قهفرخی و همکاران ۱۳۸۷). برای بررسی اثر قارچکشی یا قارچ ایستایی عصارهها (MFC)، پس از ۷۲ ساعت محتویات چاهک-هایی که رشد قارچ در آنها مشاهده نشده بود، روی محیط کشت PDA کشت داده شدند. رشد یا عدم رشد قارچ روی محیط کشت پس از چهار روز بررسی و ثبت شد. در صورت عدم رشد قارچ طی مدت زمان مذکور، این امر بهعنوان قارچکشی و در غیر اینصورت قارچ ایستایی تلقی شد. کمترین رقت موجود از عصاره که رشد قارچ در آن مشاهده نشد ، بهعنوان MFC هر عصاره در نظر گرفته شد (عبدالمالکی و همکاران، ۲۰۱۱). برای اطمینان از نتایج، آزمایش دو بار تکرار شد.

آزمایشات گلخانهای

کارآمدترین عصارههای مورد بررسی در آزمایشگاه انتخاب و در شرایط گلخانه نیز بررسی شدند. برای تهیهی مایهی تلقیح بیمارگر، ابتدا ۱۰۰ گرم از بذور ارزن به مدت دو ساعت در آب خیسانده شدند. پس از دو ساعت ارزنها از داخل آب مقطر خارج شده و داخل سلفون نایلونی ریخته شدند و دو مرتبه به فاصله ۲۴ ساعت و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجهی سلسیوس و در فشار ۱/۵ کیلوگرم بر سانتیمتر مربع سترون شدند سپس چهار قرص به قطر پنج میلیمتر از حاشیهی کشت هفت روزه بیمارگر به بذور ارزن اضافه شد. جدایههای قارچی مورد نظر روی بذر ارزن به مدت ۲۱ روز در دمای ۲۵ درجهی سلسیوس رشد داده شدند (اسنه و همکاران ۱۹۹۱).

بذور گندم نیز با هیپوکلرایت ۵ ٪ ضدعفونی سطحی شده و ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده شدند. بذرها روی کاغذ صافی استریل مرطوب در ۱۵ درجه با ۱۲ ساعت تاریکی و ۱۲ ساعت روشنایی نگهداری شد تا جوانه بزنند. پس از دو روز، بذور گندم، جوانه زده و آماده تلقیح با عصاره شد. عصارهی گیاهان آویشن کوهی و اسپند با غلظتهای ۱۰۰۰ پیپی-ام آماده شدند. بعد از جوانهزنی بذور گندم، بذرها به مدت پنج دقیقه در عصارهها غوطه ور شدند. ۹ عدد بذر گندم برای سه گلدان (به عنوان تکرار) درنظر گرفته شد. پس از ضدعفونی گلدانها، در داخل هر گلدان حاوی خاک و خاک برگ، دو یا سه عدد بذر ارزن مایه زنی شده با قارچ بیمارگر، اضافه گردید. همچنین شاهد سالم (شامل خاک و بذر ارزن مایه زنی نشده) و شاهد آلوده (شامل خاک و بذر ارزن مایه زنی شده با قارچ) در سه تکرار از هر کدام در نظر گرفته شد. گیاهان مایهزنی شده در گلخانه در دمای ۳۰-۲۵ درجهی سلسیوس نگهداری شد. پس از پنج هفته گیاهچهها از خاک خارج شده و پس از شستن ریشهها ، وزن تر ریشه و اندام-های هوایی اندازهگیری شد. سپس این اندامها بهصورت مجزا در آون و در دمای ۷۰ درجهی سانتیگراد بهمدت ۲۴ ساعت خشک شدند و وزن خشک اندامهای هوایی و ریشه اندازهگیری و به گرم ثبت شد (هیل و بلانت ۱۹۹۴) .

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل نتایج آزمایشگاهی در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۱۸ تیمار در سه تکرار انجام گردید. تیمارها در آزمایشگاه شامل چهار نوع عصارهی آویشن، اسپند، زیره سبز و چای کوهی در چهار سطح ۵۰۰،۲۵۰، ۷۵۰ و ۱۰۰۰ پیپیام برای تمامی عصاره ها، (در عصاره چای کوهی سطح ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰ هم اضافه شد)+ اینوکلوم قارچ بود. متغیر مورد مطالعه، رشد قطری پرگنه ها بود و درصد بازدارندگی از رشد میسیلیوم، اندازه گیری شد. آزمایشات گلخانه ای نیز در قالب طرح کاملا تصادفی با چهار تیمار در سه تکرار انجام گردید. تیمارهای آزمایشی نیز شامل شاهد سالم (شامل خاک و بذر ارزن مایه زنی نشده) و شاهد آلوده (شامل خاک و بذر ارزن مایه زنی شده با قارچ) و عصاره۱۰۰۰ پیپیام از آویشن و اسپند بود. در صورت وجود اختلاف معنیدار، مقایسه میانگینها با آزمون دانکن، با سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام گرفت. تجزیه و تحلیل دادهها با استفاده از نرم افزار SPSS v. 20 و رسم نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel 2007 انجام گرفت.

نتایج

نتایج بازدارندگی از رشد میسلیومی قارچ ها

نتایج حاصل از آزمون بیماریزایی نشان داد که دو جدایه *F. culmorum* و *F. graminearum* استفاده شده در این تحقیق روی رقم گندم میهن بیماریزا هستند. بر روی گندم ۵۰ تا ۷۵ درصد تغییر رنگ و قهوه‌ای شدن در ناحیه‌ی طوقه تا اولین گره ساقه دیده شد. از جدایه‌هایی که بیماری‌زایی آنها اثبات شد در مراحل بعدی تحقیق استفاده گردید. نتایج بدست آمده از تجزیه واریانس بازدارندگی از رشد میسلیومی به‌وسیله عصاره‌ها نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود دارد پس تیمارها در مقایسه با شاهد، در سطح احتمال ۱٪ اثر بازدارندگی معنی داری در هر دو گونه قارچی داشتند (جدول ۱). مقایسه میانگین تاثیر عصاره‌های گیاهی بر *F. culmorum* نشان داد که آویشن، اسپند و زیره سبز به ترتیب بیشترین تاثیر را در بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ داشتند (جدول ۲). مقایسه‌ی میانگین تاثیر غلظت-های مختلف عصاره‌های گیاهی بر قارچ *F. culmorum* نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌های گیاهی، اثر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ‌های بیمارگر بیشتر می‌شود (جدول ۲). از بین تمام تیمارها، عصاره‌ی متانولی گیاه آویشن با غلظت ۱۰۰۰ و ۷۵۰ پی پی‌ام بیشترین خاصیت ضد قارچی را از خود نشان داد و به ترتیب ۸۱/۲۵٪ و ۷۳/۳۳٪ از رشد میسلیوم قارچ *F. culmorum* ممانعت کرد. سپس عصاره‌ی اسپند با غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام بیشترین خاصیت ضد قارچی را داشت که ۷۶٪ از رشد قارچ مورد نظر ممانعت کرد. همچنین عصاره‌ی چای کوهی در شش غلظت مختلف (۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰، ۱۵۰۰ و ۲۰۰۰) ضعیف‌ترین تیمار، ارزیابی شد که اثری در جلوگیری از رشد میسلیوم قارچ مورد نظر ندارد.

همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، عتئوکگی درصدبازدارندگی از رشد قارچ، نشان دهنده‌ی تاثیر عصاره‌های اسپند و آویشن بر قارچ بیمارگر *F. graminearum* بود. بر اساس جدول ۲ کمترین و بیشترین درصد بازدارندگی از رشد به ترتیب متعلق به عصاره‌ی متانولی چای کوهی و اسپند است. از بین تمام تیمارها، عصاره های متانولی اسپند و آویشن در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام، بیشترین خاصیت ضد قارچی را از خود نشان دادند و به ترتیب ۸۲/۳ و ۷۴/۵۸ درصد از رشد قارچ جلوگیری کردند. همچنین عصاره‌ی متانولی اسپند در غلظت ۷۵۰ پی‌پی‌ام نیز ۷۳/۷۵٪ از رشد قارچ مورد نظر جلوگیری کرد. این در حالیست که درصد بازدارندگی از رشد عصاره‌ی متانولی چای کوهی در شش غلظت متفاوت کمترین میزان را نشان داد.

جدول ۱- نتایج تجزیه و تحلیل تاثیر عصاره های گیاهی در غلظت های مختلف در مقایسه با شاهد بر درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Fusarium culmorum* و *F. graminearum* در محیط کشت PDA

Table 1-Analysis of the effect of different concentretions of plant extracts on inhibition of mycelial growth of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in PDA

Means square (میانگین مربعات)	Degree of freedom (درجه آزادی)	Source of variation (منابع تغییر)	Pathogen (بیمارگر)
2850.739*	17	تیمار	*F. culmorum*
15.211	39	خطا	
	10.91	CV%	
2784.167*	17	تیمار	*F. graminearum*
34.677	39	خطا	
	16.59	CV%	

* معنی دار در سطح احتمال ۱٪

*** Significant at 1% probability**

جدول ۲- مقایسه میانگین تاثیر عصاره های گیاهی در غلظت های مختلف بر درصد بازدارندگی از رشد قارچ *Fusarium culmorum* و *F. graminearum* در محیط کشت PDA

Table 2- Mean comparison of different concentretions of plant extracts on inhibition of mycelial growth of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in PDA

F. graminearum		*F. culmorum*			
Means of inhibitory percentage (میانگین درصد بازدارندگی (٪))	Percentage of growth inhibitory (درصد بازدارندگی از رشد (٪))	Means of inhibitory percentage (میانگین درصد بازدارندگی (٪))	Percentage of growth inhibitory (درصد بازدارندگی از رشد (٪))	Concentration (غلظت (پی‌پی‌ام))	Plants (نوع گیاه)
0	[I]0	0	0	0	**Control (شاهد)**
	۴۰ [e]		[ed]46.66	250	*Peganum harmala* (اسپند)
[a]64.84	[bc]63.33	[b]56.36	[d]50	500	
	[ab]73.75		[d]52.8	750	
	82.3 [a]		[ab]76	1000	
	[h]1.3		[h]1.53	250	*Stachys lavandulifolia* (چای کوهی)
	[h]1.46		[h]2.13	500	
[d]3.3	[h]3.58	[d]3.02	[h]2.35	750	
	[h]3.43		[h]3.26	1000	
	[h]4.85		[h]4.13	1500	
	[h]5.43		[h]4.72	۲۰۰۰	
	[f]32.3		[e]41.4	250	*Thymus vulgaris* (آویشن)
[b]55.2	[d]51	[a]64.1	[c]60.42	500	
	[bc]63		[ab]73.33	750	
	[ab]74.58		[a]81.25	1000	
	[g]19.58		[g]20.83	250	*Cuminum cyminum* (زیره سبز)
[c]43.54	[ef]37.5	[c]44.58	[gf]26.3	500	
	[ed]43.7		[cd]56.2	750	
	73.4 [ab]		[ab]75	1000	

میانگین ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

Means within each column folloed by the same letter are not significantly different at 1%.

نتایج آزمایش‌های MIC و MFC

حداقل غلظت بازدارندگی MIC و حداقل غلظت قارچکشی MFC چهار عصاره‌ی گیاهی در پلیت ۹۶ خانه‌ای تعیین شد. با توجه به غربالگری اولیه، اثر غلظت-های مختلف عصاره‌های اسپند، آویشن و زیره سبز در جلوگیری از رشد قارچ *F. culmorum* و *F. graminearum*

بررسی شد. نتایج نشان داد که دو روز پس از نگهداری در دمای ۲۸ درجه‌ی سلسیوس در چاهک‌های شاهد مثبت، قارچ‌های *F. culmorum* و *F. graminearum* تمامی سطح چاهک را پوشانده و در سایر چاهک‌ها با افزایش غلظت عصاره‌ها میزان رشد قارچ‌ها کاهش یافته‌است. مقایسه‌ی چاهک‌ها با شاهد مثبت توانایی کنترل رشد قارچ توسط عصاره‌ها را اثبات کرد. هر چند هیچ‌گونه مقایسه و تجزیه و تحلیل آماری در این زمینه انجام نگرفت.

میانگین وزن خشک عصاره‌های متانولی آویشن، اسپند و زیره سبز به ترتیب ۳۲، ۵۰ و ۸۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود که با توجه به این اوزان رقت‌های مختلف عصاره‌ها به پارامترهای وزنی تبدیل شد. بر این اساس مقادیر ۱۶، ۸، ۴، ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵ و ۰/۰۳۱۲۵ میلی‌گرم از پودر خشک شده عصاره‌ی آویشن، مقادیر ۲۵، ۱۲/۵، ۶/۲۵، ۳/۱۲، ۱/۵۶، ۰/۷۸۰، ۰/۳۹۰، ۰/۱۹۵، ۰/۰۹۷۵، ۰/۰۴۸۷۵میلی‌گرم از پودر خشک شده اسپند و مقادیر ۴۰، ۲۰، ۱۰، ۱۰، ۵، ۲/۵، ۱/۲۵، ۰/۶۲۵، ۰/۳۱۲، ۰/۱۵۶ و ۰/۰۷۸ میلی‌گرم از پودر خشک شده عصاره‌ی متانولی زیره سبز توزین و جهت آزمایش‌های حداقل غلظت بازدارندگی و کشندگی قارچ فوزاریوم استفاده گردید.

طبق جدول‌های ۳، ۵ و۷، MIC عصاره‌های متانولی آویشن، اسپند و زیره سبز به ترتیب ۱، ۱/۵۶ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی لیتر برای *F. culmorum* تعیین شد. اثر قارچ‌کشی غلظت‌های مختلف عصاره‌های آویشن، اسپند و زیره سبز روی *F. culmorum* به‌ترتیب ۲، ۳/۱۲ و ۵ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر تعیین شدند (جدول‌های ۴، ۶ و۸). عصاره‌ی آویشن با کمترین غلظت MIC (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و MFC (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بالاترین خاصیت قارچ کشی روی قارچ *F. culmorum* را داشت (جدول‌های ۳ و ۴).

همچنین، MIC عصاره‌های آویشن، اسپند و زیره سبز به ترتیب۱، ۰/۷۸ و۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای *F. graminearum* تعیین شد (جدول‌های ۳، ۵و ۷). اثر قارچ‌کشی غلظت‌های مختلف عصاره‌های آویشن، اسپند و زیره سبز روی *F. graminearum* به ترتیب۴، ۱/۵۶ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شدند (جدول‌های ۴، ۶ و۸). عصاره‌ی اسپند با کمترین غلظت MIC (۰/۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و MFC (۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بالاترین خاصیت قارچ کشی روی قارچ *F. graminearum* را داشت (جدول‌های۵ و۶).

جدول ۳- تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آویشن در بازدارندگی از رشد گونه‌های بیمارگر قارچ فوزاریوم در محیط کشت آزمایشگاهی

Table3-Effect of different concentrations of *Thymus vulgaris* extract on inhibition of mycelial growth of *Fusarium* specious in vitro conditions

Effect on pathogen inhibition (تاثیر مهارکنندگی بر بیمارگر)		Amount of effective substance (مقدار ماده موثر (mg/ml))	Thymus extract dilutions (رقت‌های عصاره آویشن)	Number (شماره)
F. graminearum	*F. culmorum*			
–	–	۱۶	1/2	1
–	–	۸	1/4	2
–	–	۴	1/8	3
–	–	۲	1/16	3
–	–	۱	1/32	5
+	+	0.5	1/64	6
+	+	0.25	1/128	7
+	+	0.125	1/256	8
+	+	0.0625	1/512	9
+	+	0.3125	1/1024	10
+	+	۰	–	11

جدول ۴-تاثیرقارچ‌کشی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی آویشن بر گونه‌های بیمارگر قارچ فوزاریوم در محیط کشت آزمایشگاهی

Table4- Fungicide effect of different concentrations of *Thymus vulgaris* extract on *Fusarium* specious in vitro coditions

Fungicide effect on Pathogen (تاثیر قارچ کشی بر روی بیمارگر)		Amount of effective substance (مقدار ماده موثر (mg/ml))	Thymus extract dilutions (رقت‌های عصاره آویشن)	Number (شماره)
F. graminearum	*F. culmorum*			
–	–	16	½	1
–	–	8	¼	2
–	–	4	1/8	3
+	–	2	1/16	4
+	+	1	1/32	5

جدول ۵– تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی اسپند در بازدارندگی از رشد گونه‌های بیمارگر قارچ فوزاریوم در محیط کشت آزمایشگاهی

Table 5- Effect of different concentrations of *Peganum harmala* extract on inhibition of mycelial growth of *Fusarium* specious in vitro coditions

Effect on pathogen inhibition (تاثیر مهارکنندگی بر بیمارگر)		Amount of effective substance (مقدار ماده موثر (mg/ml))	Peganum extract dilutions (رقت‌های عصاره‌ی اسپند)	Number (شماره)
F. graminearum	*F. culmorum*			
–	–	25	½	1
–	–	12.5	¼	2
–	–	6.25	1/8	3
–	–	3.12	1/16	4
–	–	1.56	1/32	5
–	+	0.780	1/64	6
+	+	0.390	1/128	7
+	+	0.195	1/256	8
+	+	0.0975	1/512	9
+	+	0.04875	1/1024	10
+	+	0	–	11

جدول ۶– تاثیر قارچ‌کشی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی اسپند بر گونه‌های بیمارگر قارچ فوزاریوم در محیط کشت آزمایشگاهی

Table 6--Fungicide effect of different concentrations of *Peganum harmala* extract on *Fusarium* specious in vitro coditions

Fungicide effect on Pathogen (تاثیر قارچ کشی بر روی بیمارگر)		Amount of effective substance (مقدار ماده موثر (mg/ml))	Peganum extract dilutions (رقت‌های عصاره اسپند)	Number (شماره)
F. graminearum	*F. culmorum*			
–	–	25	½	1
–	–	12.5	¼	2
–	–	6.25	1/8	3
–	–	3.12	1/16	4
–	+	1.56	1/32	5
+	+	0.780	1/64	6

جدول ۷– تاثیر غلظت‌های مختلف عصاره‌ی زیره سبز در بازدارندگی از رشد گونه‌های بیمارگر قارچ فوزاریوم در محیط کشت آزمایشگاهی

Table 7- Effect of different concentrations of *Cuminum cyminum* extract on inhibition of mycelial growth of *Fusarium* specious in vitro coditions

Effect on pathogen inhibition (تاثیر مهارکنندگی بر بیمارگر)		Amount of effective substance (مقدار ماده موثر (mg/ml))	Cumin extract dilutions (رقت‌های عصاره زیره سبز)	Number (شماره)
F. graminearum	*F. culmorum*			
–		40 –	½	1
–	–	20	¼	2
–	–	10	1/8	3
–	–	5	1/16	4
–	–	2.5	1/32	5
+	+	1.25	1/64	6
+	+	0.625	1/128	7
+	+	0.312	1/256	8
+	+	0.156	1/512	9
+	+	0.078	1/1024	10
+	+	0	–	11

جدول ۸– تاثیر قارچ‌کشی غلظت‌های مختلف عصاره‌ی زیره سبز بر گونه‌های بیمارگر قارچ فوزاریوم در محیط کشت آزمایشگاهی

Table 8- Fungicide effect of different concentrations of *Cuminum cyminum* extract on Fusarium specious in vitro coditions

Fungicide effect on Pathogen (تاثیر قارچ کشی بر روی بیمارگر)		Amount of effective substance (مقدار ماده موثر (mg/ml))	Cumin extract dilutions (رقت‌های عصاره زیره سبز)	Number (شماره)
F. graminearum	*F. culmorum*			
–		40 –	½	1
–	–	20	¼	2
–	–	10	1/8	3
–	–	5	1/16	4
+	+	2.5	1/32	5

شرایط گلخانه

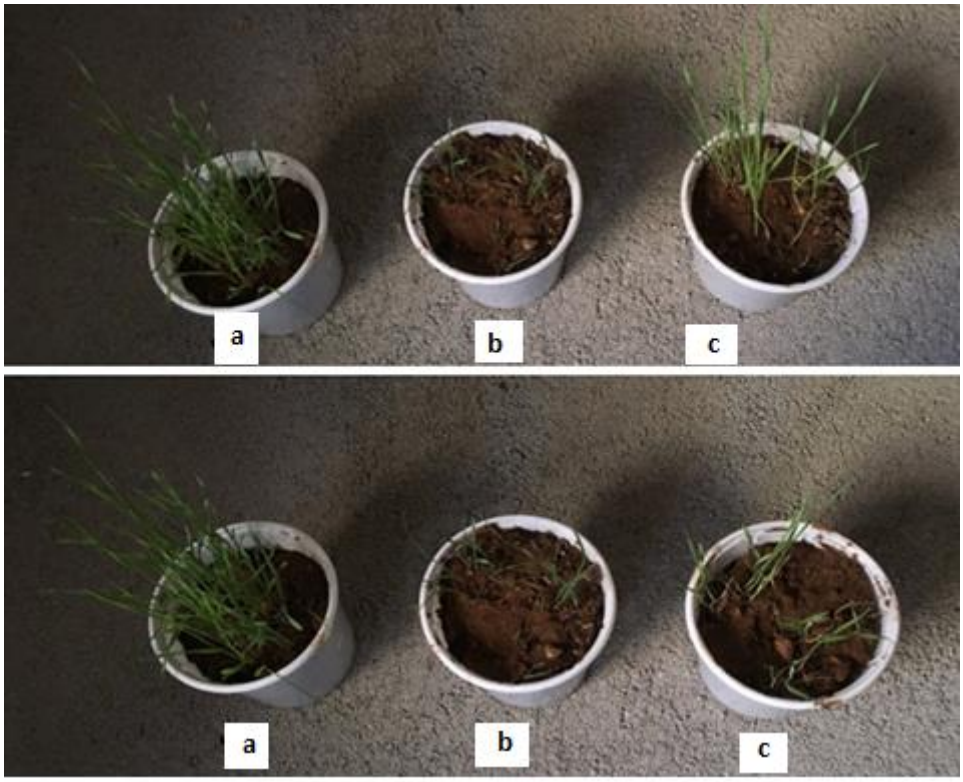
نتایج آزمایشگاهی بازدارندگی عصاره ها نشان داد که عصاره های متانولی آویشن و اسپند بالاترین بازدارندگی را در بین عصاره های مورد مطالعه دارند. این تیمارها در آزمایش گلخانه‌ای نیز ارزیابی شدند. نتایج تجزیه واریانس تاثیر عصاره ها بر صفت‌های رشدی گیاه بین تیمارهااختلاف معنی دار در سطح یک درصد نشان داد (جدول۹). مقایسه‌ی میانگین تاثیر عصاره‌ی گیاهی آویشن در غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام نسبت به شاهد حاکی از آن است که این عصاره به‌طور معنی داری آلودگی گندم به قارچ *F. culmorum* را کاهش می‌دهد (شکل ۱). همچنین عصاره‌ی گیاهی اسپند نیز در غلظت ۱۰۰۰ پی پی ام تاثیر معنی داری در مقایسه با شاهد در کنترل قارچ *F. graminearum* داشت (شکل ۲ و۳) این تیمارها علاوه بر داشتن اثر بازدارندگی روی شدت آلودگی، موجب بهبود شاخص‌های رویشی گندم در مقایسه با شاهد آلوده نیز شدند (جدول ۱۰). مقایسه‌ی نتایج آزمایشات گلخانه‌ای با نتایج آزمایشگاهی، بیانگر هم خوانی بین این آزمایشات است.

شکل ۱- جوانه زنی بذور گندم در بوته‌های تیمار شده با عصاره‌ی آویشن در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام علیه بیمارگر *F. culmorum* **(بالا) و** *F. graminearum* **(پایین) . (a) شاهد سالم، (b) شاهد آلوده و (c) دارای عصاره آویشن**

Figure 1-Germination of wheat seeds in plants treated with 1000 ppm concentration of *Thymus vulgaris* against *F. culmorum* (top) *and F. graminearuum* (down). (a)uninfected control, (b) infected control and (c) treate with Thymus extract.

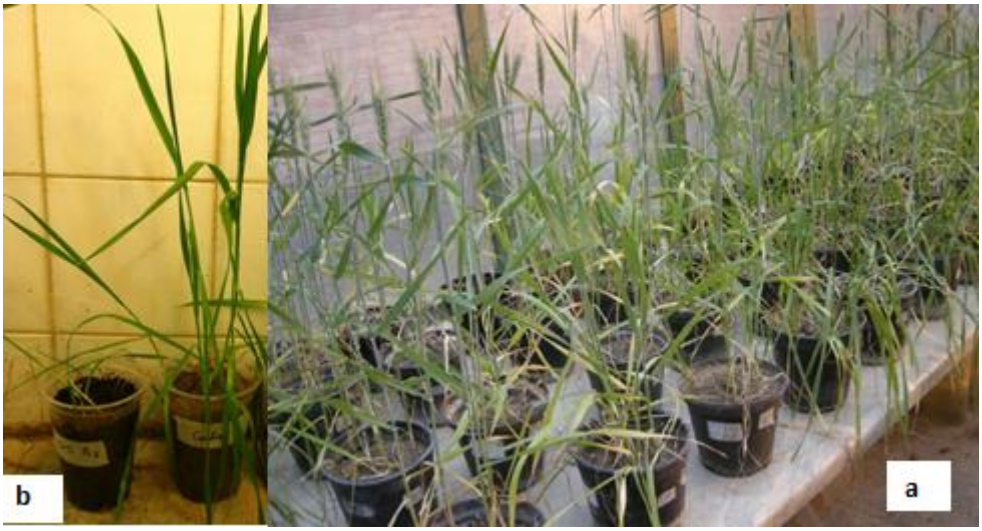
بحث

گونه‌های فوزاریوم باعث بیماری‌های مخربی در طیف وسیعی از محصولات کشاورزی می شوند. بلایت خوشه، پوسیدگی طوقه و ریشه از بیماری‌های مهم غلات هستند که توسط *Fusarium culmorum* و *F. graminearum* ایجاد میشوند. (اسمایلی ۱۹۹۶؛ اسکرم و همکاران ۲۰۱۳). کنترل بیمارگرهای خاکزاد شامل استفاده از تناوب زراعی، روشهای زراعی، کنترل شیمیایی و استفاده از ارقام مقاوم می باشد. بقای طولانی مدت برخی از قارچ‌های خاکزاد در خاک عملا روش تناوب را ناکارآمد می کند. روشهای شیمیایی نیز علاوه بر اینکه در خیلی از موارد مقرون به‌صرفه نمی-باشند، از لحاظ آلودگی محیط زیست، ایجاد مقاومت در بیمارگرها و خطرات سلامت برای انسان و حیوانات به-نوعی تهدید محسوب میشوند (سومیا و همکاران ۲۰۰۰ ، ان و همکاران ۲۰۱۵). به دلایل فوق الذکر بسیاری از محققان سعی در یافتن روشهای جایگزین با سمیت کمتر و موثر در کنترل بیمارگرها دارند (منجمله پینتو و همکاران ۲۰۱۰). در این میان استفاده از فراورده‌های گیاهی نظیر روغنها و عصاره‌های گیاهان دارویی به دلیل عوارض جانبی کمتر، عدم مقاومت پاتوژنی، پایین بودن هزینه‌ی تولید، تجزیه شدن در خاک و عدم آلودگی، در کنترل بیمارگرها مورد توجه قرار گرفته است (چودهاری و همکاران ۲۰۱۷). بازدارندگی رشد میسیلیومی گونه های مختلفی از *Fusarium* توسط



شکل ۲- جوانه زنی بذور گندم در بوته‌های تیمار شده با عصاره‌ی اسپند در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام علیه بیمارگر *F. culmorum* (پایین) و *F. graminearum* (بالا) . (الف) شاهد سالم، (ب) شاهد آلوده و (ج) دارای عصاره‌ی اسپند

Figure 2-Germination of wheat seeds in plants treated with 1000 ppm concentration of *Peganum harmala* against *F. graminearuum* (top) and *F. culmorum* (down) . (a)uninfected control, (b) infected control and (c) treate with Peganum extract.



شکل۳-الف) گلدانهای تلقیح شده با زادمایه قارچ ***Fusarium culmorum*** به همراه عصاره اسپند پنجاه روز بعد از کشت (ب)گلدان حاوی گیاهان مایه زنی شده با قارچ ***F. graminearum*** پنجاه روز بعد از کشت (سمت چپ) و گلدان آلوده به همراه عصاره‌ی اسپند (سمت راست)

Figure 3- a- Inoculated plants with *Fusarium culmorum* and *Peganum* extract 50 days after growing .b- inoculated plants with *F. graminearum* 50 days after planting (left) and with *Peganum* extract (right)

جدول ۹- تجزیه واریانس تاثیر عصارهای گیاهی اسپند و آویشن بر شاخص های رشدی گندم آلوده به *Fusarium culmorum* و *F. graminearum*

Table 9-Varianse analysis of *Thymus* and *Peganum* extract effect on wheat growth indices infected with *Fusarium culmorum* and *F. graminearum*

Means square (میانگین مربعات)				Degree of freedom (درجه ازادی)	Degree of freedom (منابع تغییر)	Pathogen(بیمارگر)
Dry weight of aerial part (وزن خشک اندام های هوایی)	Fresh weight of aerial part (وزن تر اندام هوایی)	Dry weight of root (وزن خشک ریشه)	Fresh weight of root (وزن تر ریشه)			
0.006*	0.331*	0.013*	0.048*	3	تیمار	*F. culmorum*
0.0001	0.0003	0.00005	0.00009	8	خطا	
13.52	2.8	7.95	4.31		CV%	
						F. graminearum
0.005*	0.218*	0.004*	0.026*	3	تیمار	
0.00001	0.001	0.00006	0.0001	8	خطا	
5.66	38.2	11.78	5.5		CV%	

* معنی دار در سطح احتمال ۱٪

*** Significant at 1% probability**

جدول ۱۰- مقایسه‌ی میانگین اثر عصاره‌های آویشن و اسپند بر *Fusarium culmorum* و *F. graminearum* روی گیاه گندم

Table 10-Mean **Comparison of *Thymus* and *Peganum* extracts on *Fusarium culmorum* and *F. graminearum on wheat in vivo***

Dry weight of aerial part (وزن خشک اندام هوایی (گرم))	Fresh weight of aerial part (وزن تر اندام هوایی (گرم))	Dry weight of root (وزن خشک ریشه (گرم))	Fresh weight of root (وزن تر ریشه (گرم))	Treatment with pathogen (تیمار با بیمارگر)	
^{a}0.11	^{a}0.91	^{ab}0.1	^{ab}0.28	-	Uninfected control(شاهد سالم)
^{c}0.03	^{c}0.28	^{c}0.02	0.07۰^{c}	*F. culmorum*	Infected control(شاهد آلوده)
^{c}0.03	^{c}0.27	^{c}0.015	^{c}0.065	*F. graminearum*	
^{a}0.13	^{a}0.95	^{a}0.17	^{a}0.37	*F. culmorum*	Thymus extract(عصاره آویشن)
^{c}0.04	^{bc}0.45	^{bc}0.04	^{bc}0.15	*F. graminearum*	
^{bc}0.07	^{bc}0.49	^{bc}0.06	^{bc}0.19	*F. culmorum*	Peganum extract(عصاره اسپند)
^{b}0.09	^{b}0.57	^{b}0.08	^{bc}0.23	*F. graminearum*	

میانگین‌ها با حروف مشابه در هر ستون فاقد اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵٪ هستند.

Means within each column folloed by same letter are not significantly different at 1%.

عصاره‌های گیاهان پیاز[1]، *Cassia nodosa*، چریش[2] (عبد الغنی و همکاران ۲۰۱۵)، سیر[3] و *Sapindustrifoliata* (گوهیل و والا ۱۹۹۶)، بذر چریش (گور و شارمایک ۱۹۹۸)، اکالیپتوس[4] (بانسال و گوپتا ۲۰۰۰) گزارش شده است.

در این تحقیق، خواص ضد قارچی عصاره‌ی متانولی گیاهان آویشن، اسپند، زیره سبز و چای کوهی علیه جدایه‌های بیماریزای گندم *F. culmorum* و *F. graminearum* در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای بررسی شد. نتایج نشان داد که عصاره‌های آویشن اسپند و زیره‌ی سبز رشد قارچ در پتری را کاهش دادند. بیشترین درصد بازدارندگی از رشد قارچ *F. culmorum* متعلق به عصاره‌ی متانولی آویشن بود که ۸۱/۲۵ درصد محاسبه شد و همچنین بیشترین اثر بازدارندگی از رشد میسلیوم قارچ *F. graminearum* متعلق به عصاره‌ی متانولی اسپند بود که این عصاره‌ی گیاهی توانست ۸۳/۳ درصد از رشد میسلیوم قارچ مذکور جلوگیری کند. در این پژوهش عصاره‌ی چای کوهی اثری در جلوگیری از رشد میسلیوم هیچ یک از قارچ‌های مذکور نداشت. از طرف دیگر، در هر نوع عصاره، با افزایش میزان غلظت، درصد بازدارندگی نیز افزایش یافت. حداقل غلظت بازدارنده برای عصاره‌های متانولی آویشن و اسپند علیه *F. culmorum* و *F. graminearum*، به ترتیب معادل ۱ و ۰/۷۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد. همچنین حداقل غلظت کشنده‌ی این عصاره‌ها نیز روی قارچ‌های بیمارگر مذکور به ترتیب معادل ۲ و ۱/۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ارزیابی شد. در گزارش لیرا دلئون و همکاران در سال ۲۰۱۴ در بین عصاره های مورد بررسی، بیشترین غلظت بازدارندگی (۵۶/۱۷ ٪) علیه قارچ *F.solani* مربوط به گیاه *Adenophyllum aurantium* با مقدار MIC=۰/۷۸mg/ml بود. تنوع در ترکیبات شیمیایی عصاره های گیاهی و همچنین فاکتورهایی همچون حلالیت، pH، قابلیت انتشار و حرکت در محیط کشت و نوع میکروارگانیسم مورد ازمایش میزان بازدارندگی عصاره‌ها را مشخص می کند (گیلیتزر و همکاران ۲۰۱۲).

عصاره‌ی گیاه آویشن بکار رفته در این تحقیق توانست در غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام بازدارندگی ۸۱/۲۵ از رشد قارچ *F. culmorum* نشان دهد (جدول۲). بررسی-های فیتوشیمیایی بر روی گیاه آویشن وجود ترکیبات فلاونوئیدی از جمله لوتئولین و کورستین، اسیدهای فنلی مانند رزمارینیک اسید و مشتقلات بنزوئیک اسید، توکوفرول کینون و ترپنوئیدها از جمله مشتقات پاراسایمن را ثابت می‌کند. در روغن فرار آویشن شیرازی ۲۴ ترکیب شامل تیمول، کارکرول، پاراسایمن و بتاکاریوفیلن شناسایی شده است (کرومبی و کرومبی ۱۹۸۶). تحقیقات گسترده بر روی ترکیبات موجود در آویشن با استفاده از روش‌های جدید شیمی تجزیه نشان دهنده‌ی این واقعیت است که تیمول دارای خاصیت ضد قارچی فراوانی است. علاوه بر تیمول، کارواکرول نیز، دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد (نقدی بادی و همکاران ۱۳۸۲). اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره آویشن در مطالعات گذشته بر روی طیف وسیعی از قارچ‌ها از جمله *Candida albicans*، *Aspergillus* spp.، *Alternaria alternata*، *Phytophthora infestans*، *Sclerotinia sclerotiorum*، *Rhizopus stolonifer*، *Penicillium digitatum*، *Rhizoctonia solani*، *Fusarium* sp. و *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* به اثبات رسیده است (مصحفی و همکاران ۱۳۸۵؛ فراهانی و همکاران ۱۳۹۱؛ غزلباش و همکاران ۱۳۹۲؛ صفری و همکاران ۱۳۹۳؛ دفارا و همکاران ۲۰۰۳؛ رسولی و همکاران ۲۰۰۶؛ سولو و همکاران ۲۰۰۷).

در این تحقیق عصاره‌ی اسپند در ممانعت از رشد قارچ‌های مورد تحقیق تاثیر قابل توجهی را نشان داد بطوریکه این عصاره گیاهی توانست ۸۳/۳ درصد از رشد میسلیوم *F. graminearum* جلوگیری کند (جدول ۲). این نتیجه مطابق با نتایج دیبا وهمکاران (۲۰۱۱) مطابقت دارد. آنها نشان دادند که عصاره‌ی این گیاه بر روی گونه‌های *Aspergillus niger*، *A. fumigatus*، *Candida parapsilosis*، *C. kefyr*، *C. dubliniensis*، *C. tropicalis* و *C. glabrata* اثر مهارکنندگی دارد. گیاه اسپند در

[1] *Allium cepa*
[2] *Azadirachtaindica*
[3] *Allium sativum*
[4] *Eucalyptus amygdalina*

بردارنده‌ی مواد ضد میکروبی فلاوونوییدی و آلکالوئیدهای بتاکربولینی بوده که در ریشه، دانه و کالوس گیاه یافت می‌گردند (محقق زاده و همکاران ۲۰۰۶). از جمله آلکالوئیدهای مهم این گیاه می‌توان به هارمالین، هارمین، هارمالول و وازیسین اشاره کرد که دارای اهمیت فراوانی از نظر صنعتی و پزشکی هستند (شربت‌کری ۲۰۰۷). در مطالعه‌ی دیگری اثر عصاره‌ی الکلی گیاه اسپند بر روی مخمر جنس کاندیدا و قارچ آسپرژیلوس بیماریزا در شرایط آزمایشگاهی بررسی شد. براساس یافته‌های این مطالعه، عصاره‌ی الکلی دانه-های اسپند فعالیت مهارکننده و کشنده معنی‌داری روی مخمرهای کاندیدا از خود نشان دادند (دیبا و همکاران ۲۰۱۱). همچنین در مطالعه دیگری نشان داده شده است که تمام اجزای تشکیل دهنده گیاه اسپند (عصاره‌های کلروفرم، متانولی و غیره) فعالیت چشمگیری علیه *Staphylococcus aureus* دارند (پراشانتا و جان ۱۹۹۹). در مطالعات سارپله و همکاران در سال ۲۰۰۹ فعالیت ضد قارچی عصاره‌ی اسپند بر روی قار چهای مختلف از جمله قارچ *F. oxysporum* f.sp.*melonis* گزارش شده است.

در این تحقیق عصاره‌ی بدست آمده از زیره‌ی سبز، به میزان ۷۳ تا ۷۵ درصد بازدارندگی از رشد دو گونه قارچ فوزاریوم مورد آزمایش، نشان داد. این نتیجه با نتایج محققین دیگر مطابقت دارد به‌طوری‌که نائینی و همکاران (۱۳۹۴)، نشان دادند زیره‌ی سبز می‌تواند علیه قارچ *C. albicans* مؤثر باشد. همچنین نائینی و همکاران (۱۳۹۰) اثرات ضدقارچی ۵۰ گیاه درمانی را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند گیاهانی چون زیره‌ی سبز دارای اثر ضدقارچی قوی می باشد. در تحقیق حاضر زیره‌ی سبز هرچند اثر بازدارندگی از رشد *F. culmorum* و *F. graminearum* نشان داد ولی بازدارندگی آن کمتر از عصاره‌ی اسپند و آویشن بود.

چای کوهی (*Stachys lavandulifolia*) از تیره نعنائیان می‌باشد. این گیاه دارای ترکیبات فعالی همچون فنیل اتانوئید، ترپنوئید و فلاونوئید بوده که دارای فعالیت بیولوژیکی هستند (سجادی و امیری ۲۰۰۷). اثر ضد قارچی عصاره‌ی اتانولی این گیاه علیه قارچ *Candida albicans* به اثبات رسیده است (اسکالتزا و همکاران ۲۰۰۳؛ مقیم و همکاران ۲۰۱۴). همچنین عزیزی و همکاران (۲۰۱۶)، نشان دادند چای کوهی علیه *Dothiorella sarmentorum* خاصیت ضد قارچی از خود نشان داده است. ولی در عین حال در آزمایش حاضر اثر ضد قارچی عصاره‌ی چای کوهی روی جدایه‌های فوزاریومی مشاهده نشد.

یکی از مهم ترین علل این نوع تفاوت‌ها می‌تواند به نوع حلال بکار رفته و یا روش عصاره گیری مربوط باشد. عصاره ها در واقع از حل شدن قسمت های قابل حل گیاهان دارویی در حلال حاصل می شوند. عمل متوقف سازی رشد به دلیل واکنش گروه های آلدهیدی یا گروه سولفیدریل صورت می گیرد و میزان توقف رشد قارچ ها در اثر این مواد به نوع قارچ و سن آن بستگی دارد به‌طوری‌که کشت‌های مسن‌تر نسبت به کشت‌های جوان از حساسیت بیشتری برخوردارند (مارجوریه ۱۹۹۹).

در این تحقیق از حلال متانول برای عصاره‌گیری استفاده شد. از آنجایی‌که بیشتر ترکیبات گیاهی که خواص ضد قارچی دارند، ترکیبات آلی اشباع شده یا ترکیبات آروماتیک هستند، از حلال‌های اتانولی یا متانولی برای استخراج آن‌ها استفاده می‌گردد. در واقع در بسیاری از مطالعات، از کاربرد آب به‌منظور جداسازی ترکیبات موثر گیاهی اجتناب شده است (عبدالمالکی و همکاران ۲۰۰۸).

اکثر تحقیقات در مورد بازدارندگی عصاره‌های گیاهی منحصر به شرایط آزمایشگاهی می باشد و آثار آنها در شرایط گلخانه برروی پاتوسیستم‌ها کمتر مطالعه شده‌است. .باتوجه به‌لزوم بررسی اثر بازدارندگی عصاره‌های گیاهی در شرایط گلخانه‌ای، عصاره‌های آویشن و اسپند که اثرات بازدارندگی قابل توجهی در شرایط آزمایشگاهی نشان داده بودند، در شرایط گلخانه‌ای نیز مورد آزمون قرار گفتند و مشاهده شد که این عصاره‌ها با غلظت ۱۰۰۰ پی‌پی‌ام تاثیرات معنی داری در بهبود صفات رشدی گیاه نسبت به شاهد آلوده نشان دادند. در مجموع نتایج این تحقیق نشان میدهد کاربرد دو عصاره‌ی گیاهی اسپند و آویشن میتواند اثر بازدارندگی قابل توجهی از رشد قارچ *F. culmorum* و *F.*

graminearum در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه‌ای نشان دهد بنابراین این عصاره‌ها می‌توانند به‌عنوان جایگزینی برای سموم شیمیایی در کنترل بیماری فوزاریمی غلات باشند. البته مطالعات بیشتری جهت توسعه فن‌آوریهای لازم جهت کاربردی کردن مصرف این عصاره‌ها در کنترل بیماری های گیاهی مورد نیاز می باشد.

منابع

کاظمی اربط ح، ۱۳۸۴. مورفولوژی و آناتومی غلات. دانشگاه تبریز. ۵۸۸ صفحه.

حبیب زاده س و بیگی ف، ۱۳۹۷. بررسی خاصیت ضد قارچی چند عصاره گیاهی از گیاهان بومی شما ایران بر روی بیمارگر *Penicillium digitatum* . پژوهش های کاربردی در گیاه پزشکی. دوره ۷، شماره ۱ ، صفحه‌های ۱۲۳-۱۳۴.

حیدریان الف و ارشاد ج، ۱۳۸۰. شناسایی قارچ های همراه طوقه و ریشه گندم های آبی استان چهار محال و بختیاری. دوره ۳۷، شماره‌های ۲-۱، صفحه‌های ۱۱۳-۹۷.

صفائی د، یونسی ح و شیخ الاسلامی م، ۱۳۹۰. گونه‌های فوزاریوم عامل پوسیدگی ریشه و طوقه گندم در استان کرمانشاه. بیماری های گیاهی، دوره ۴۸، شماره ۲، صفحه‌های ۱۶۸-۱۶۵.

صفری ن، همتی ر، فرزانه م و چگینی س، ۱۳۹۳. بررسی تاثیر اسانس سه گونه گیاه دارویی آویشن دنایی، نعناع فلفی و مرزه خوزستانی در کنترل *Penicillium expansum* عامل پوسیدگی کپک آبی سیب. پژوهش های کاربردی در گیاه پزشکی. دوره ۳، شماره ۱، صفحه‌های ۳۳-۱۹.

غزلباش ن، عبدالهی م و شهریاری د، ۱۳۹۲. اثر ضد قارچی عصاره آویشن شیرازی و چویل بر قارچ عامل پژمردگی گوجه فرنگی، *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*، در شرایط آزمایشگاهی و گلخانه ای. مجله علمی کشاورزی گیاهپزشکی، دوره ۳۶، شماره ۴، صفحه‌های ۶۵-۵۳.

فراهانی ح س، میرابوالفتحی م، رضایی دانش ی. کرمی اسبو ر الف، ۱۳۹۱. اثر پنج اسانس گیاهی بر تولید زرالنون و رشد *Fusarium graminearum* . آفات و بیمار یهای گیاهی، دوره ۸۰، شماره ۱، صفحه‌های ۹۴-۸۱.

مصحفی م ح, منصوری ش , شریفی فر ف و خشنودی م، ۱۳۸۵. اثرات ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی اسانس و عصاره گیاه آویشن شیرازی در برون تن. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره۱۴، شماره ۱، صفحه‌های ۴۳-۳۳.

نائینی ع، جلایر نادری ن، شکری ح ا، دواتی ع و ربیعی س م ر، ۱۳۹۴. ارزیابی اثرات ضد قارچی دهانشویه ی مرکب (زیره سبز، بادرنجبویه و چای سبز) بر سویه استاندارد کاندیدا آلبکنس (ATCC=10231). مجله دانشکده دندانپزشکی مشهد، شماره ۳۹، دوره ۳، صفحه‌های ۲۸۲-۲۷۳.

نائینی ع، ناصری م، کمال نژاد م، خوش زبن ف، رحبیان ط، اسماعیل زاده نامی ح، منصوری ص و زاویه د، ۱۳۹۰. بررسی اثرات اسانس ها و عصاره های ۵۰ گیاه دارویی ایران روی سویه ای استاندارد کاندیدا آلبیکنس در شرایط آزمایشگاهی. فصل نامه گیاهان دارویی، سال دهم، دوره ۲، شماره ۳۸، صفحه‌های ۱۷۲-۱۶۳.

نطنزیان قهفرخی م، ستاری م، یادگاری م ح، گودرزی غ ر و سحرخیز م ج، ۱۳۸۷. اثرات ضد قارچی اسانس و عصاره الکلی زنیان علیه ایزوله های بالیتی مقاوم و حساس به فلوکونازول کاندیدا آلبیکنس در شرایط ازمایشگاهی. مجله علوم پزشکی مدرس، دوره ۱۱، شماره‌های ۱ و ۲، صفحه‌های ۹۷-۹۱.

نقدی بادی ح و مکی زاده تفتی م، ۱۳۸۲. مروری بر گیاه آویشن (*Thymus vulgaris* L.). فصلنامه گیاهان دارویی، دوره ۱، شماره ۷، صفحه‌های ۱۲-۱.

Abdel-Ghany TM, Roushdy MM, Mohamed A and Abboud A, 2015. Efficacy of certain plant extracts as safe fungicides against phytopathogenic and mycotoxigenic fungi. Agricultural and Biological Sciences Journal 1(3): 71-75.

Abdolmaleki M, Bahraminejad S, Salari M, Abbasi S and Panjehkeh N, 2011. Study of antifungal effect *Mentha piperita* L. on plant pathogen fungi. Medical Plants 38: 26-34.

Abdolmaleki M, Salari M, Bahraminejad S, Panjekeh N and Abassi S, 2008. Antifungal activity of cinnamon (*Cinnamomum zelanicum*) crude extracts against some phytopathogenic fungi. Iranian Journal of Plant Pathology 44: 255-26.

Abril M, Curry KJ, Smith BJ and Wedge DE, 2008. Improved microassays used to test natural product-based and conventional fungicides on plant pathogenic fungi. Plant Disease, 92(1):106-112.

Azizi Z, Pourseyedi S, Khatami M and Mohammadi H, 2016. *Stachys lavandulifolia* and *Lathyrus* sp. mediated for green synthesis of silver nanoparticles and evaluation its antifungal activity against *Dothiorella sarmentorum*. Journal of Cluster Science 27(5):1613-1628.

Bansal KR and Rajesh KG, 2000. Evaluation of plant extracts against *Fusarium oxysporum*, wilt pathogen of fenugreek, Indian. Journal of Phytopathology 53 (1): 107-108.

Booth C, 1971. The Ggenus Fusarium. Commonwealth Mycological Institute, Kew Survey. *England*, pp 237.

Choudhury D, Anand YR, Kundu S, Nath R, Kole RK and Saha J, 2017. Effect of plant extracts against sheath blight of rice caused by *Rhizoctonia solani*. Journal of Pharmacognosy and phytochemistry 6(4):399-404.

Crombie WML and Crombie L, 1986. Distribution of avenacins A-1, A-2, B-1 and B-2 in oat roots their fungicidal activity towards, take-all fungus. Phytochemistry 25: 2069-2073.

Daferera DJ, Ziogas BN and Polissiou MG, 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *ichiganensis*. Crop protection 22(1):39-42.

Dev U, Devakumar C, Mohan J and Agarwal PC, 2004. Antifungal activity of aroma chemicals against seed-borne fungi. Journal of essential oil Research, pp 5.

Diba K, Shoar MG, Shabatkhori M and Khorshivand Z, 2011. Antifungal activity of alcoholic extract of Peganum harmala seeds. Journal of Medicinal Plant Research 5(23):5550-4.

Ghesemi A, 2010. Medicinal and aromatic plants. 2ed .Islamic Azad University Pub, 2-10. Gillitzer P, Martin AC, Kantar M, Kauppi K, Dahlberg S, Lis D, 2012.Optimization of screening of native and naturalized plants from Minnesota for antimicrobial activity. Journal of Medical Plants Research 6(6): 938-49.

Gohil VP and Vala GD, 1996. .Effect of extracts of some medicinal plants on the growth of *Fusarium moniliforme*, Journal of Mycological Plant Pathology 26 (1): 110- 111.

Gour HN and Sharmaik C, 1998. Inhibition of growth, Sporulation and Phytotoxicity of Fusarium oxysporum fungal species Cumini, a wilt pathogen of cumin by plant extracts. Journal of Mycological Plant Pathology 2: 76- 77.

Hill JP and Blunt DT, 1994. Wheat seedlings response to root infection by *Cochliobolus sativus* and *Fusarium acuminatum* . Plant Disease 78:1150-1152.

Leslie JF and Summerell BA, 2006. The Fusarium laboratory manual: Black well publishing, pp 388.

Lira-De León KL, Ramírez-Mares MV, Sánchez-López V, Ramírez-Lepe M., Salas-Coronado R, Santos-Sánchez NF Valadez-Blanco R and Hernández-Carlos B, 2014.Effect of crude plant extracts from some Oaxacan two deleterious fungal phytopathogens and extract compatibility with a biofertilizer strain. Frontiers in Microbiology 5: 1-10.

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

Moghim H, Taghipoor S, Shahinfard N, Kheiri S and Rafieian S, 2014. Antifungal effects of *Allium ascalonicum*, *Marticaria chamomilla* and *Stachys lavandulifolia* extracts on *Candida albicans*. Journal of HerbMed Pharmacology 3-8.

Mohagheghzadeh A, Faridi P, Shams-Ardakani M and Ghasemi Y, 2006. Medicinal smokes. Journal of Ethnopharmacology 108(2):161-184.

Nelson DE, Desjardins AE and Plattner RD, 1993. Fumonisins, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. Annual Review of Phytopathology 31: 233-252.

Nelson P T, Toussoun TA and Marasas WFO, 1983. *Fusarium* Species: an Illustred Manual for Identification: The Pennsylvania State University, pp 167.

On A, Wong F, Ko Q, Tweddell RT, Antoun H. and Avis TJ, 2015. Antifungal effect of compost tea microorganism on tomato pathogens. Biological Control 80:63-69.

Parry DW, Jenkinson P and Mcleod L, 1995. *Fusarium* ear blight (scab) in small grain cereals. Review of Plant Patholology. 44: 207-238.

Perez-Sanchez R, Infante F, Galvez C and Ubera JL, 2007. Fungitoxic activity against phytopathogenic fungi and chemical composition of *Thymus zygis* essential oils. Food Science and Technology 13: 341-347.

Pfaller MA, Sheehan DJ and Rex JH, 2004. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidial testing and the need for standardization. Clinical Microbiological Review, 17:268-280.

Pinto, J. M. A., Souza, E. A. and Oliveira, D. F. 2010. Use of Plant extract in the control of common bean anthracnose. Crop Prot. 29:838-842.

Prashanth D and John S,1999. Antibacterial activity of *Peganum harmala*. Fitoterapia 70: 438-439.

Rasooli I, MB Rezaei and Allameh A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. Food Control 17: 359-364.

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.

Sajjadi M and Amiri H, 2007. Chemical constituents of the essential oils of different stages of the growth of *Stachys lavandulifolia* Vahl. from Iran. Pakistan Journal of Biological Sciences: 10(16):2784-6.

Scherm B, Balmas V, Spanu F, Pani G, Delogu G, Pasquali M and Migheli Q, 2013. *Fusarium culmorum* :causal agent of foot and root rot and head blight on wheat. Molecular Plasnt Pthology 14 (4):323-341.

Sharbatkori M, 2007. Study of cidal effect of alcoholic extract *of Peganum harmala* seeds on *Echinococcus granulosus* protoscolex. Tehran Univ Med J. 7(2):101-8.

Skaltsa HD, Demetzos C, Lazari D and Sokovic M, 2003. Essential oil analysis and antimicrobial activity of eight *Stachys* species from Greece. Phytochemistry 64(3):743-52.

Smiley RW, 1996. Pathogenic fungi associated with Fusarium Foot Rot of winter wheat in the semiarid pacific mosthwest. Plant Disease 80: 944-949.

Sneh, B, Burpee LL and Ogoshi A, 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society Press, St.Paul Minnesota, 133 pp.

Someya N, Kataoka N, Hirayae K, Hibi T and Akutsu K, 2000. Biological control of cyclamen soil borne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. Plant Disease 84:334-340.

Soylu S, Yigitbas H, Soylu EM and Kurt Ş, 2007. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. Journal of Applied Microbiology 103(4):1021-30.

Application of methanolic extracts of *Thymus vulgaris, Peganum harmala, Cuminum cyminum* and *Stachys lavandulifolia* in control of *Fusarium culmorum* and *F. graminearum* in laboratory and green house conditions

S, Ehterami[1], S Nematollahi[2*] and B Pouzeshimiyab[3]

[1]Former MSc Student, Department of Plant Protection ,Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
[2]Assistant Professor , Department of Plant Protection, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
[3]Assistant Professor, Department of Plant Protection, Marand Branch, Islamic Azad University, Marand, Iran.
[*]Corresponding author: Nematollahi2001@yahoo.com

Received: 20 January 2019 Accepted: 9 June 2019

Abstract

Fusarium culmorum and F. graminearum are causal agents of the important disease of cereals that lead to extensive yield and quality loss of wheat. Due to the hazardous effect of chemical compounds, alternative method to control these pathogens in the field is necessary. In this study, the effects of methanolic extract of *Thymus vulgaris*, *Peganum harmala*, *Cuminum cyminum* and *Stachys lavandulifolia* on mycelial growth of these species was studied in laboratory and green house conditions. The antimicrobial activity of these pathogens was determined through poison food assay at 250, 500, 750 and 1000 ppm concentrations. Among all methanolic extracts, *T. vulgaris* extract at concentration of 1000 ppm was potentially effective against *F. culmorum* by 81.25%. Also, methanolic extracts of *P. harmala* at concentration of 1000 ppm showed high antifungal activity against *F. graminearum* by 82.33%. *Thymus vulgaris* extract had the lowest MIC value (1 mg/ml) and MFC value (2 mg/ml) for *F. culmorum*. Also, *Peganum harmala* extract had the lowest MIC value (0.78 mg/ml) and MFC value (1.56 mg/ml) for *F. graminearum*. Methanolic extract of *T. vulgaris* and *P. harmala* were effective in incrising wet and dry weight of roots and shoots in greenhouse condition, too.

Keywords: Antifungal activity, Extract, Medicinal plants, Wheat.