اثر عصاره برگ کرفس در القای مقاومت علیه بیماری سفیدک پودری خیار*

EFFECTIVENESS OF CELERY LEAF EXTRACT ON THE INDUCTION OF RESISTANCE AGAINST CUCUMBER POWDERY MILDEW

اعظم سیروس و عبدالحسین جمالی زواره[۱]**

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۳/۴)

چکیده

بیماری سفیدک پودری که عامل آن قارچ *Podosphaera fusca* است، یکی از بیماری‌های مهم کدوئیان است و رایج‌ترین روش کنترل آن استفاده از قارچکش‌ها می‌باشد. اما اثرات جنبی کاربرد قارچکش‌ها یافتن روش‌های دیگری را برای کنترل بیماری ضروری می‌سازد که از جمله آنها، القای مقاومت در گیاه است. در این پژوهش، اثر عصاره برگ کرفس در کنترل بیماری سفیدک پودری خیار و امکان القای مقاومت سیستمیک در گیاه، در آزمایش‌های گلخانه‌ای بررسی شد. بدین منظور، عصاره آبی، استونی و یا متانولی برگ کرفس با غلظت‌های ۱% و ۵% (وزن به حجم)، یک روز قبل و یا یک روز بعد از مایه‌زنی بیمارگر روی برگ‌های میزبان به‌کار رفت و سپس شدت بیماری بر اساس تعداد لکه‌های ایجادشده روی برگ، ده روز پس از مایه‌زنی محاسبه شد. به علاوه، اثر این عصاره در کنترل سیستمیک بیماری و نیز بر تندش اسپور بیمارگر در سطح برگ مایه‌زنی شده بررسی شد. هم‌چنین پس از تیمار اولین برگ حقیقی با عصاره کرفس، اثر آن بر فعالیت آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز در اولین و دومین برگ حقیقی بوته سالم و مایه‌زنی شده با بیمارگر، بررسی و با شاهد مقایسه گردید. نتایج نشان داد که عصاره برگ کرفس بیماری را به‌صورت موضعی در برگ اول کنترل کرد و کاربرد عصاره استونی آن در غلظت ۵% تأثیر بیشتری در کنترل بیماری داشت. از طرفی کاربرد عصاره تأثیری بر جوانه‌زنی اسپور قارچ نداشت. بنابراین به‌نظر می‌رسد که کنترل بیماری توسط این عصاره، نه به دلیل خاصیت ضدقارچی، بلکه از طریق القای مقاومت در گیاه باشد. از طرف دیگر باتوجه به اینکه تغییرات فعالیت آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز در تیمارهای مختلف هماهنگی مشخصی با کنترل بیماری نشان نداد، به‌نظر می‌رسد این آنزیم نقش خاصی در مقاومت به بیماری ندارد و لازم است سایر سازوکارهای احتمالی القای مقاومت بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: ***Podosphaera fusca*** **، مقاومت القایی، عصاره گیاهی، آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز**

---

*: بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول، ارایه شده به دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

**: مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی ahjamaliz@yahoo.com

۱.به ترتیب دانشجوی سابق کارشناسی ارشد و استادیار بیماری‌شناسی گیاهی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهرکرد

مقدمه

سفیدک پودری کدوئیان از بیماری‌های مهم جالیز در نواحی معتدل و نسبتاً خشک است. عامل بیماری، قارچ *Podosphaera fusca* U. Braun & N. Shishkoff [syn. *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht Ex Fr.)Pollacci] می‌باشد. این بیماری در اکثر مناطق جالیزکاری کشور شیوع دارد و هر ساله خسارت قابل توجهی به محصول وارد می‌کند (Behdad 1980).

رایج‌ترین شیوه برای کنترل این بیماری استفاده از قارچ‌کش‌هاست، اما کاربرد مکرر ترکیبات قارچ‌کش برای انسان و محیط زیست اثرات جنبی نامطلوبی دارد و نیز منجر به ایجاد مقاومت در جمعیت‌های پاتوژن می‌شود (McGrath 1996). لذا تحقیقات در مورد کاربرد نمک‌های معدنی، روغن‌های معدنی و گیاهی، عوامل بیولوژیک، عصاره‌های گیاهی و ترکیبات القاکننده مقاومت در میزبان، برای کنترل سفیدک پودری توسعه یافته است (Liu *et al*. 2010). ترکیبات القاکننده مقاومت، گروه جدیدی از عوامل محافظت‌کننده محصولات هستند که اثر مستقیم ضدپاتوژنی ندارند و با فعال کردن سازوکارهای دفاع طبیعی موسوم به مقاومت اکتسابی سیستمیک (systemic acquired resistance) از ایجاد بیماری در گیاه جلوگیری می‌کنند (Tosi *et al*. 1999). این نوع خاص مقاومت گیاهی به‌وسیله بعضی عوامل زنده و غیرزنده بدست می‌آید و موجب محافظت گیاه در برابر طیفی از بیماری‌های قارچی و باکتریایی می‌شود (Ruess *et al*. 1996).

مطالعه روی سازوکارهای کنترل بیماری توسط عصاره‌ها یا فرآورده‌های گیاهی نشان داده است که اجزای فعال بیولوژیکی موجود در آنها ممکن است تأثیر مستقیم ضدمیکروبی (Ansari 1995) داشته باشند یا به‌عنوان محرک (Elicitor) با تحریک واکنش‌های دفاعی گیاهان میزبان (القای مقاومت) باعث جلوگیری از توسعه بیماری شوند (Schneider & Ullrich 1994).

تحریک واکنش‌های دفاعی گیاه (القاء مقاومت) با استفاده از فرآورده‌های گیاهی در کنترل سفیدک پودری نتایج امیدبخشی داشته است. به‌عنوان مثال، تأثیر عصاره برگ گیاه *Reynoutria sachalinensis* در کنترل سفیدک پودری خیار در تحقیقات زیادی تأیید شده است (Herger *et al*. 1988، Herger & Klingauf 1990، Daayf *et al*. 1997). با توجه به تأثیر زیاد این عصاره در القای فاکتورهای دفاعی گیاه به‌نظر می‌رسد که سازوکار اثر این عصاره، بیش از این که از طریق خاصیت قارچکشی مستقیم آن باشد، القای سازوکارهای دفاعی گیاه است، بدین معنی که وقوع بیماری را از طریق مقاومت موضعی کاهش می‌دهد (Daayf *et al*. 2000, Wurms *et al*. 1999). هم‌چنین اوستول (Osthol یک ترکیب کومارینی استخراج شده از میوه خشک گیاه *Cniddi monnieri* Fructus) به‌عنوان نه‌تنها یک قارچ‌کش، بلکه پیشگیری‌کننده و القاکننده مقاومت علیه سفیدک پودری کدوئیان شناخته شده است (Shi *et al*. 2007). عصاره گیاهان *Euphorbia humifusa* (نوعی فرفیون) و *Robinia pseudoacacia* (اقاقیای سفید) تأثیر پیشگیری‌کنندگی و درمان‌کنندگی روی سفیدک پودری خیار نشان داده‌اند که تأثیر پیشگیری‌کنندگی این عصاره‌ها احتمالاً ناشی از ایجاد مقاومت القایی بوده و اثر درمانی آن‌ها می‌تواند ناشی از جذب ترکیبات فعال توسط سلول‌های گیاهی و در نتیجه ممانعت از توسعه میسلیوم قارچ بوده باشد (Liu *et al*. 2010). عصاره‌های پوست درخت بلوط (*Quercus robur* L.)، زردچوبه (*Curcuma longa* L.) و زنجبیل (*Zingiber officinalis* Roscoe) در القای مقاومت علیه سفیدک پودری روی ارقام حساس گندم

زمستانه مؤثر بوده‌اند و القای مقاومت با سنتز پروتئین‌های مرتبط با بیماری‌زایی (Pathogenesis-related proteins) خارج سلولی با فعالیت کیتیناز و گلوکاناز مرتبط بوده است (Vechet *et al*. 2005). محلول‌پاشی روغن سیاه دانه (Bso)، روغن تخم ترب (Roil) و روغن پارافین (Poil) ۰/۵% روی برگ‌ها شدت بیماری سفیدک پودری خیار، جو و کدو خورشتی را کاهش داده است و بررسی‌ها نشان داده که تأثیر حفاظت‌کنندگی روغن‌ها علیه سفیدک پودری بیشتر ناشی از بازدارندگی جوانه‌زنی کنیدیوم‌ها و ممانعت از رشد میسلیومی پاتوژن بوده و فعال‌سازی مکانیسم‌های دفاعی میزبان به مقدار کم اتفاق افتاده است (Hafez 2008).

باتوجه به اینکه عصاره برخی گیاهان خانواده کرفس اثرات ضدقارچی نشان داده‌اند (Ojala *et al*. 2000) و از طرفی پهنک برگ کرفس کمتر مورد استفاده تغذیه‌ای قرار می‌گیرد، در این تحقیق اثر عصاره آن در کنترل بیماری سفیدک پودری خیار بررسی شد. هم‌چنین باتوجه به اینکه عصاره برخی گیاهان می‌توانند با القای مقاومت در گیاه، باعث کاهش توسعه بیماری در گیاه شوند و گزارش‌های متعددی در مورد همراه بودن مقاومت گیاهان با تغییر در واکنش‌های دفاعی گیاه از جمله تغییر فعالیت آنزیم‌های مرتبط با دفاع گیاه وجود دارد (Vidhyasekaran 1992)، امکان ایجاد مقاومت القایی علیه سفیدک پودری خیار توسط عصاره برگ کرفس ارزیابی گردید. بدین منظور تأثیر عصاره برگ کرفس در کنترل سفیدک پودری خیار و نیز اثر قارچکشی آن مورد بررسی قرار گرفت، همچنین اثر این عصاره بر فعالیت آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز در گیاه خیار سالم یا مایه‌زنی شده با عامل بیماری سفیدک پودری در طول دوره توسعه بیماری بررسی گردید.

روش بررسی

۱- ترکیبات شیمیایی و طبیعی مورد استفاده

- پنکونازول (penconazole) با نام تجارتی توپاس (امولسیون دارای ۲۰% ماده مؤثر) در گلخانه با غلظت ۰/۰۵ در هزار ماده مؤثر به‌کار رفت.
- عصاره گیاه *Reynoutria sachalinensis* (F. Schmidt) Nakai (از خانواده Polygonaceae): عصاره استونی ۱% (وزن به حجم) مطابق روش *کوالوسکی و هرگر* (Kowalewski & Herger 1992) تهیه و مورد استفاده قرار گرفت.
- عصاره گیاه کرفس (*Apium graveolens* L.): پهنک برگ این گیاه پس از جمع‌آوری و شستشو، در سایه خشک شد و با استفاده از آسیاب خانگی در دمای آزمایشگاه تبدیل به پودر نرمی شد. پودر حاصله برای عصاره‌گیری به سه روش زیر مورد استفاده قرار گرفت.

عصاره‌گیری با متانول

برای تهیه عصاره ۵% (وزن به حجم)، پنج گرم از بافت آسیاب شده برگ کرفس در ۹۵ میلی‌لیتر متانول به‌مدت ۲۴ ساعت در ۲۰°C، روی شیکر با سرعت ۳۵۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از این مدت مخلوط با استفاده از کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد و ۷۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل با افزودن ۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد و سپس با حجم مساوی هگزان مخلوط گردید. این مخلوط دو ساعت روی شیکر با همان سرعت قرار داده شد، سپس بخش‌های مختلف آن جدا گردید و بخش متانولی، برای تبخیر متانول و استحصال عصاره نهایی زیر هود قرار داده شد (Bahraminejad *et al*. 2008). عصاره ۵% حاصل شده به

نسبت ۱ :۴ با متانول ۴۵% رقیق شد تا عصاره ۱% به‌دست آید.

عصاره‌گیری با استون

استخراج با استفاده از استون و مطابق روش استخراج با متانول انجام گرفت. با این تفاوت که بلافاصله پس از رساندن به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر، مخلوط جهت تبخیر استون و استحصال عصاره در زیر هود قرار داده شد (Nayeemulla Shariff *et al*. 2006). عصاره ۵% حاصل‌شده با آب مقطر برای تهیه عصاره ۱% رقیق شد.

عصاره‌گیری با آب گرم

برای تهیه عصاره ۵% (وزن به حجم)، پنج گرم از بافت برگ گیاه با ۹۵ میلی‌لیتر آب مقطر جوش مخلوط و یک ساعت در حمام آب جوش قرار داده شد. سپس مخلوط در محیط آزمایشگاه نگهداری و بعد از گذشت ۲۴ ساعت به خوبی مخلوط و با کاغذ صافی واتمن شماره یک صاف شد و عصاره ۵% حاصل شده با آب مقطر برای تهیه عصاره ۱% رقیق شد.

۲- پرورش بوته‌های خیار در گلخانه

بذر خیار رقم سوپر دامینوس (Super Dominus محصول شرکت Seminis امریکا) در گلدان‌هایی به قطر ۱۴ سانتی‌متر در خاک استریل کاشته شد و در شرایط حرارتی ۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰ تا ۸۰ درصد و دوره روشنایی ۱۴ ساعته پرورش یافت. پس از اینکه دومین برگ حقیقی بوته‌ها کامل گردید، گلدان‌هایی که ۴ بوته یکنواخت داشتند، برای انجام آزمایش مورد استفاده واقع شدند.

۳- مایه‌زنی قارچ و ایجاد بیماری روی گیاه

قارچ بیمارگر از گلخانه‌ای واقع در گلدشت نجف‌آباد جمع‌آوری و با توجه به مطابقت مجموع مشخصات این قارچ (جدایه گلدشت) با شرح خداپرست در مورد گونه *Podosphaera fusca* (Khodaparast 2002)، جدایه قارچ بیمارگر با نام *P. fusca* شناخته شد.

مایه‌زنی به روش جمالی زواره و همکاران (Jamali Zavareh *et al*. 2004) با کاربرد سوسپانسیون اسپور قارچ در آب (دارای ۴۰۰۰۰ اسپور در میلی‌لیتر) انجام شد. بوته‌های مایه‌زنی شده به‌مدت ۲۴ ساعت در شرایط تاریکی (در زیر پوشش غیرشفاف) و رطوبت بالای ۹۰% نگهداری و سپس به شرایط عادی گلخانه برگردانده شدند. پس از ۸ تا ۱۰ روز، لکه‌های بیماری روی برگ‌ها کاملاً مشخص بود.

جهت تأمین توده اسپور موردنیاز در بقیه مراحل تحقیق، خزانه بیماری در گلخانه ایجاد شد.

۴- بررسی اثر عصاره برگ کرفس در کنترل بیماری درگلخانه

آزمایش به‌روش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه حلال، سه غلظت، دو زمان و هشت تکرار انجام شد. بوته‌ها به دو گروه مساوی تقسیم شدند. عصاره برگ کرفس، با سه حلال (آب، استون و متانول) و سه غلظت (صفر به‌عنوان شاهد، ۱% و ۵%) تهیه شد و در بوته‌های گروه اول یک روز قبل از مایه‌زنی بیمارگر، و در بوته‌های گروه دوم یک روز بعد از مایه‌زنی بیمارگر، با استفاده از یک افشانه دستی بر سطح بالا و زیر برگ‌های کوتیلدونی بوته‌ها پاشیده شد. ده روز بعد از مایه‌زنی، تعداد لکه‌های مجزای بیماری روی هر برگ شمارش و بر اساس آن شدت آلودگی و میزان کنترل بیماری نسبت به شاهد محاسبه شد.

۵- مقایسه اثر کنترلی عصاره کرفس با قارچ‌کش پنکونازول و عصاره گیاه *R. sachalinensis*

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با چهار تیمار و هشت تکرار انجام شد. عصاره استونی کرفس با غلظت ۵% و عصاره استونی *R. sachalinensis* با غلظت ۱% و قارچ‌کش پنکونازول با غلظت ۰/۰۵ در هزار ماده مؤثر در آب مقطر تهیه شدند. بوته‌ها به دو گروه مساوی تقسیم شدند. در بوته‌های گروه اول یک روز قبل از مایه‌زنی بیمارگر و در بوته‌های گروه دوم یک روز بعد از مایه‌زنی بیمارگر، ترکیبات با به‌کارگیری یک افشانه دستی بر سطح بالا و زیر برگ‌های کوتیلدونی بوته‌ها پاشیده شد. از آب مقطر خالص به‌عنوان شاهد استفاده شد. پس از ده روز تعداد لکه‌های بیماری روی هر برگ شمارش و شدت آلودگی و میزان کنترل بیماری نسبت به شاهد محاسبه شد.

۶- بررسی سیستمیک بودن اثر عصاره کرفس

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار (برگ اول، برگ دوم، برگ شاهد) و هشت تکرار (بوته) انجام گرفت. محلول استونی عصاره کرفس با غلظت ۵% تهیه و با به‌کارگیری یک افشانه دستی بر سطح بالا و زیر اولین برگ حقیقی بوته مورد نظر پاشیده شد. سایر قسمت‌های بوته پوشانیده شد تا عصاره به آنها نرسد. برای بوته‌های شاهد از آب مقطر خالص استفاده گردید. مایه‌زنی بیمارگر یک روز بعد و روی همه برگ‌های بوته صورت گرفت. پس از ده روز، تعداد لکه بیماری روی اولین برگ حقیقی (تیمار شده) و دومین برگ حقیقی (تیمار نشده) و برگ بوته‌های شاهد شمارش و شدت آلودگی نسبت به شاهد محاسبه شد.

۷- بررسی اثر عصاره کرفس بر میزان تندش اسپور بیمارگر

آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با دو تیمار (عصاره و شاهد) و ده تکرار (نمونه) انجام شد. عصاره استونی برگ کرفس با غلظت ۵% تهیه و با به‌کارگیری یک افشانه دستی بر سطح بالا و زیر برگ بوته‌های خیار پاشیده شد. برای بوته‌های شاهد از آب مقطر خالص استفاده گردید. پس از ۲۴ ساعت، بوته‌ها با سوسپانسیون اسپور *P. fusca* مایه‌زنی شده و در شرایط مناسب برای بیماری‌زایی قرار گرفتند. برای بررسی میزان تندش اسپور قارچ بیمارگر در سطح برگ میزبان با تغییراتی در روش *اسکیپ و سمبورسکی* (Skipp & Samborski 1974)، در ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی گیاه، نمونه‌گیری از برگها در ده تکرار انجام شد. بدین‌صورت که دو قطعه دایره‌ای به قطر ۸ میلی‌متر بطور تصادفی از پهنک هر برگ گرفته و در محلول رنگ‌بر (مخلوط سه قسمت اتانول ۹۵% و یک قسمت اسید استیک خالص) به مدت ۴۸ ساعت نگهداری گردید تا کاملاً بی‌رنگ شوند. پس از خارج‌کردن از محلول رنگ‌بر، دو مرتبه با آب مقطر شستشو گردید و تا زمان بررسی در آب مقطر نگهداری شد. برای بررسی میکروسکوپی، قطعه برگ رنگ‌بری شده در روی لام میکروسکوپی در یک قطره لاکتو فنول کاتن‌بلو قرار گرفته و با لامل پوشانیده شد و با استفاده از میکروسکوپ نوری و عدسی شیئی x۴۰ کل سطح آن بررسی و تعداد کل اسپور و تعداد اسپور تندش یافته در هر نمونه شمارش و میانگین درصد تندش اسپور نمونه‌ها محاسبه شد.

۸- بررسی اثر عصاره برگ کرفس بر فعالیت آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز در گیاه سالم

آزمایش به‌روش فاکتوریل با سه سطح برگ (برگ اول، برگ دوم، برگ شاهد)، چهار زمان و دو تکرار انجام شد. عصاره استونی کرفس با غلظت ۵% تهیه و با به‌کارگیری

یک افشانه دستی بر سطح بالا و زیر اولین برگ حقیقی بوته‌های خیار پاشیده شد و گلدان‌ها در شرایط عادی گلخانه (حرارت ۲۲ تا ۲۸ درجه سانتی‌گراد، رطوبت نسبی ۷۰ تا ۸۰ درصد) نگهداری شدند. برای بوته‌های شاهد از آب مقطر خالص استفاده شد. سپس در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار، از اولین برگ حقیقی و دومین برگ حقیقی بوته‌های تیمارشده و برگ بوته‌های شاهد نمونه‌های یک گرمی در دو تکرار گرفته شد. نمونه‌ها بلافاصله به شرحی که ذکر خواهد شد، عصاره‌گیری شده و فعالیت آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز در آنها بررسی شد.

۹- بررسی اثر عصاره برگ کرفس بر فعالیت آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز در طی فرآیند بیماری‌زایی

آزمایش به روشی که برای گیاه سالم ذکر شد صورت گرفت، اما ۲۴ ساعت بعد از کاربرد عصاره برگ کرفس، کلیه برگ‌های بوته‌های خیار با پاشیدن سوسپانسیون اسپور قارچ بیمارگر، مایه‌زنی شده و در شرایط مناسب برای ایجاد بیماری قرار گرفتند. سپس در زمان‌های صفر، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از مایه‌زنی بیمارگر، نمونه‌گیری از اولین برگ حقیقی و دومین برگ حقیقی بوته‌های تیمارشده و برگ بوته‌های شاهد به شرحی که در بالا ذکر شد، صورت گرفت. نمونه‌ها بلافاصله عصاره‌گیری شده و فعالیت آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز در آنها بررسی شد.

۱۰- استخراج عصاره نمونه‌های گیاهی و ارزیابی فعالیت ویژه آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز

استخراج عصاره پروتئینی نمونه گیاه به روش چن و *همکاران* (Chen *et al.* 2000) با استفاده از بافر فسفات سدیم ۱۰۰ میلی مولار (pH=6) انجام شد و میزان کل پروتئین نمونه‌های استخراجی به روش برادفورد (Bradford 1976) با استفاده از معرف برادفورد و محلول پروتئین استاندارد مورد سنجش قرارگرفت. سپس ارزیابی فعالیت ویژه آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز به روش ابلز و فورنس (Abeles & Forrence 1970) با استفاده از لامینارین (به‌عنوان سوبسترا) و معرف دی‌نیتروسالیسیلیک اسید (DNS) انجام شد.

۱۱- محاسبات آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم‌افزار SAS و برنامه ANOVA: GLM و نیز نرم‌افزار MSTAT C استفاده شد. در موارد لازم برای نزدیک‌شدن به توزیع طبیعی، داده‌ها با استفاده از فرمول $\sqrt{X+0.5}$ تبدیل شد و عملیات آماری روی اعداد تبدیل شده انجام گردید. میانگین تیمارها با استفاده از آزمون LSD فیشر در سطح ۵% مقایسه شد.

نتایج و بحث

۱- اثر عصاره برگ کرفس بر کنترل بیماری

تجزیه آماری نتایج به‌دست آمده در آزمایش‌های انجام‌شده نشان داد که غلظت‌های مختلف عصاره و نوع حلال به‌کاررفته و اثر متقابل این دو عامل اختلاف معنی‌داری در نتایج ایجاد کرده‌اند، درحالی‌که در نتایج زمان‌های مختلف کاربرد اختلاف آماری دیده نمی‌شود. بر اساس این نتایج میزان آلودگی برگ پس از کاربرد دو غلظت مختلف عصاره برگ کرفس، با یکدیگر و با شاهد (غلظت صفر) اختلاف آماری نشان داد، به‌گونه‌ای که غلظت ۵% تاثیر بیشتری در کنترل بیماری داشت و گروه‌بندی میانگین آلودگی برگ، تیمار این

عصاره را در دو گروه جدا از شاهد قرار داد. هم‌چنین مقایسه میانگین اثرات متقابل نشان داد که عصاره استونی ۵% برگ کرفس بیشترین تأثیر را در کنترل بیماری داشته است (جدول ۱). از طرف دیگر میزان آلودگی برگ پس از کاربرد عصاره کرفس، در دو زمان یک روز قبل و یک روز بعد از تلقیح اختلاف آماری نشان نداد (جدول ۲).

در بررسی سیستمیک بودن اثر عصاره، مقایسه میزان آلودگی دومین برگ (تیمارنشده) با آلودگی اولین برگ (تیمارشده با عصاره کرفس) و آلودگی برگ شاهد نشان داد که میزان کنترل بیماری در برگ دوم بسیار کمتر از برگ اول بود و با برگ شاهد اختلاف معنی‌دار نداشت و بر اساس این نتایج عصاره برگ کرفس در کنترل بیماری به‌صورت سیستمیک مؤثر نبوده است (شکل ۱).

در تحقیقات سایر محققین نیز فعالیت ضد قارچی عصاره کرفس بررسی شده است. بر اساس گزارش *لیو و همکاران*، کاربرد عصاره اتانولی کرفس علیه بیماری سفیدک پودری خیار، ۱۱/۵۴% تأثیر پیشگیری‌کنندگی روی این بیماری داشته است (Liu *et al.* 2010)، همانطور که در پژوهش حاضر عصاره استونی برگ کرفس در کنترل سفیدک پودری خیار حدود ۸۵% مؤثر بود. البته این اختلاف میزان تأثیر می‌تواند ناشی از اختلاف شرایط آزمایش باشد، با توجه به اینکه آزمایش *لیو و همکاران* در تشتک پتری و روی دیسک‌های برگی انجام شده درصورتی‌که آزمایش ما در گلخانه انجام شد و هم‌چنین نوع حلال به‌کاررفته در دو آزمایش متفاوت است.

هم‌چنین در بررسی عصاره متانولی چند گیاه از خانواده کرفس (Apiacea) شامل *Petroselinum crispum* (جعفری)، *Aegopodium podagraria* (علف بز)، *Angelica archangelica* (سنبل ختایی)، *Anethum graveolens* (شوید)، *Levisticum officinalis* (انجدان رومی) و *Peucedanum palustre* که حاوی ترکیبات کومارینی اند، مشخص شده که بیشتر این عصاره‌های برگی از رشد *Fusarium culmorum* و استرین تک‌هسته‌ای *Rhizoctonia* ممانعت کرده‌اند و همه آنها از رشد *Heterobasidium annosum* ممانعت کرده‌اند، ولی رشد *Phytophthora cactorum* در حضور این عصاره‌ها تقویت شده و در این بین عصاره *P. crispum* بالاترین سمیت را علیه *R. solani* نشان داده است (Ojala *et al.* 2000). روغن بذر زیره سبز (*Cuminum cyminum*) متعلق به همین خانواده نیز روی قارچ‌های *Colletotrichum falcatum*، *Curvularia palescens* و *Periconia atropurpurea* اثر سمی داشته است (Rao *et al.* 1992).

۲- مقایسه اثر عصاره برگ کرفس در کنترل بیماری با قارچ‌کش پنکونازول و عصاره گیاه *R. sachalinensis*

عصاره استونی ۵% کرفس با حدود ۸۷% کنترل، در مقایسه با قارچ‌کش پنکونازول با ۳۶ % کنترل بیماری، تأثیر بیشتری در پیشگیری از آلودگی داشت و به اندازه عصاره *R. sachalinensis* در پیشگیری از بیماری مؤثر بود و با آن در یک گروه آماری قرارگرفت. از لحاظ اثر کاربرد پس از تلقیح، عصاره استونی ۵%کرفس با ۹۲% کاهش بیماری، در مقایسه با عصاره *R. sachalinensis* تأثیر بیشتری در کنترل بیماری داشت و اثر کنترلی آن برابر با قارچ‌کش پنکونازول بود و با آن در یک گروه آماری قرار گرفت (جدول ۲).

جدول ۱. مقایسه میانگین اثر متقابل نوع حلال و غلظت بر میزان آلودگی برگ خیار به سفیدک پودری پس از کاربرد عصاره کرفس

Table 1. Interaction of solvent type and concentration on powdery mildew- infection rate of cucumber leaf after the application of celery extract

حلال * غلظت (Concentration * Solvent)						
Methanol 5%	Methanol 1%	Aceton 5%	Aceton 1%	Water 5%	Water 1%	control
21.01[1] de[2]	75.46 ab	10.01 e	71.0 bc	46.97 cd	81.63 ab	100 a

۱ . اعداد متن جدول میانگین آلودگی برگ نسبت به شاهد (%) است.

۲ . میانگین‌های دارای حروف مشابه اختلاف آماری ندارند.

1. means of leaf infection compared to the control (%)
2. Values with the same letters are not significantly different.

جدول۲. مقایسه میانگین میزان تأثیر ترکیبات مختلف در کنترل سفیدک پودری خیار به تفکیک زمان کاربرد

Table 2. Comparison of effectiveness means of different compounds in controlling cucumber powdery mildew at different application times.

تیمارها (treatments)			زمان (time)
پنکونازول Penconazole	عصاره *R. s extract*	عصاره کرفس Celery extract	
35.96 B	86.02 A	87.597 A	قبل از تلقیح Before inoculation
92.93 A	52.43 B	92.38 A	بعد از تلقیح After inoculation

۱. اعداد متن جدول میزان کاهش بیماری (درصد از شاهد) است.

۲. گروه‌بندی میانگین‌ها در هر ردیف (زمان) با حروف بزرگ نشان داده شده است.

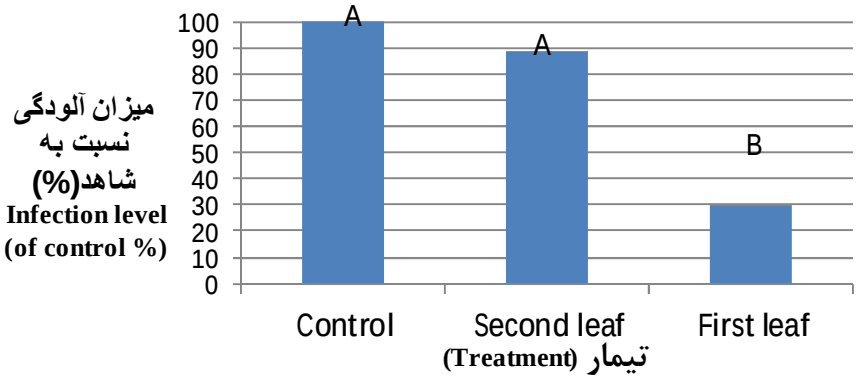
1. Numbers in the table are disease reduction rate (% of control).
2. Grouping of means at each row (time) are shown by upper case alphabets.

۳- اثر عصاره کرفس بر تندش اسپور بیمارگر

در این بررسی، عصاره برگ کرفس (با ۱۲/۶۷% تندش اسپور)، تأثیر قابل توجهی روی تندش اسپور قارچ نداشت و با شاهد (با ۱۶/۶۸% تندش اسپور) اختلاف آماری نشان نداد.

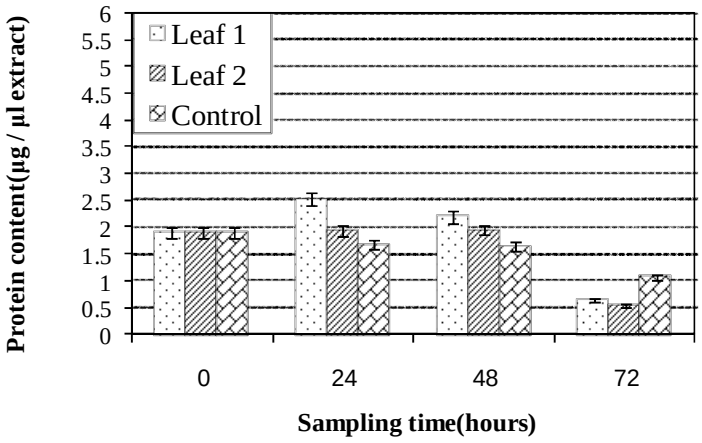
۴- ارزیابی اثر عصاره برگ کرفس بر فعالیت آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز

الف: مقدار پروتئین برگ اول و دوم گیاه خیار سالم تا ۴۸ ساعت پس از کاربرد عصاره کرفس روی اولین برگ افزایش نشان داد و سپس کاهش یافت. مقدار پروتئین در برگ اول گیاه تلقیح شده تا ۴۸ ساعت روند افزایشی داشت و سپس کاهش یافت و در برگ دوم گیاه تلقیح شده روند افزایشی نشان داد (شکل‌های ۲ و ۳). در اغلب زمان‌ها مقدار پروتئین در گیاه تلقیح‌شده بیشتر از گیاه سالم بود. مقدار پروتئین برگ اول عموماً بیشتر از شاهد بوده و به‌ویژه در گیاه سالم در ساعت ۲۴ و در گیاه مایه‌زنی شده



شکل ۱. مقایسه میزان آلودگی برگ اول (تیمارشده با عصاره کرفس) و برگ دوم (تیمارنشده) بوته‌های خیار مایه‌زنی شده با *Podosphaera fusca* با آلودگی بوته شاهد

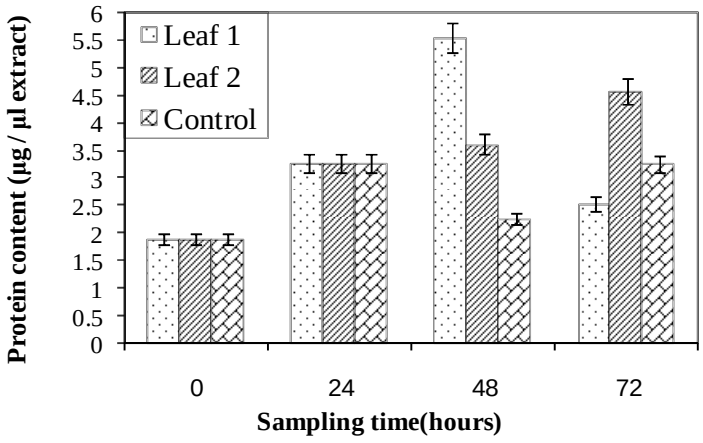
Fig. 1. Infection rate of the first leaf (treated with celery extract) and the second leaf (untreated) of *Podosphaera fusca*-inoculated cucumber plants with the control plants.



شکل۲. تغییرات مقدار کل پروتئین محلول عصاره برگ خیار پس از کاربرد عصاره کرفس روی برگ اول

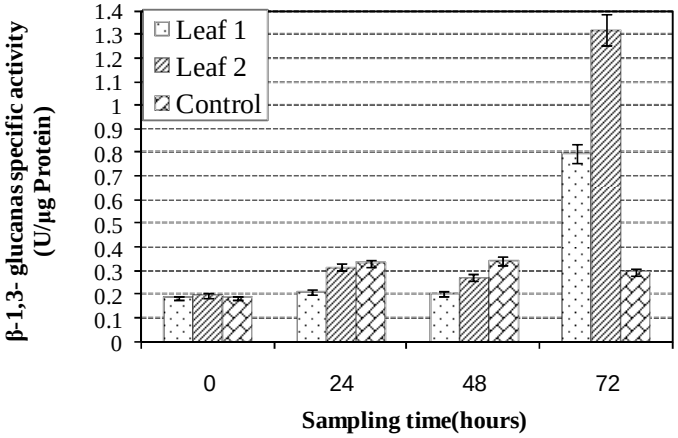
Fig. 2. Changes of total soluble protein of cucumber leaf extract after the application of celery extract on the leaf 1.

در ساعت ۴۸، این افزایش نسبت به شاهد بسیار مشخص و معنی‌دار بود. این افزایش می‌تواند ناشی از اثر عصاره برگ کرفس باشد و به دلیل اینکه در بوته سالم نیز دیده شد، برای القای آن نیازی به تحریکات بیمارگر نبوده است. این نکته نشان می‌دهد که کاربرد عصاره برگ کرفس، مقدار پروتئین را در برگ تیمارشده افزایش داده است. مقدار پروتئین برگ دوم نیز عموماً از شاهد بیشتر بوده و به‌ویژه در گیاه مایه‌زنی شده در ۴۸ و ۷۲ ساعت این افزایش نسبت به شاهد بسیار مشخص و معنی‌دار بود (شکل‌های ۲ و ۳). بنابراین تأثیر عصاره بر مقدار پروتئین میزبان به‌صورت سیستمیک بوده است. بر اساس گزارش *جمالی زواره و همکاران* (Jamali Zavareh *et al.* 2007) در طی ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از تلقیح، نفوذ قارچ بیمارگر به بافت میزبان صورت می‌گیرد و این تحریکات ممکن



شکل۳. تغییرات مقدار کل پروتئین محلول عصاره برگ خیار پس از کاربرد عصاره کرفس روی برگ اول و مایه‌زنی بیمارگر روی بوته

Fig. 3. Changes of total soluble protein of cucumber leaf extract after the application of celery extract on the leaf 1 and pathogen inoculation on the plant.



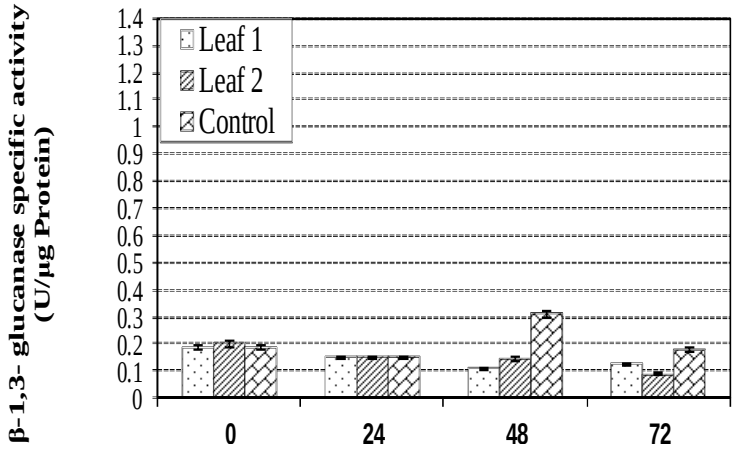
شکل ۴. تغییرات فعالیت ویژه بتا ۱، ۳ گلوکاناز عصاره برگ خیار پس از کاربرد عصاره کرفس روی برگ اول

Fig. 4. Changes of β- 1,3- glucanase specific activity of cucumber leaf extract after the application of Celery extract on the leaf 1.

است بر میزان پروتئین میزبان مؤثر باشد.

لذا به‌طور خلاصه می‌توان گفت در بوته تیمارشده با عصاره برگ کرفس، مقدار کل پروتئین محلول نسبت به شاهد بیشتر بود. این افزایش به‌صورت سیستمیک رخ داد و مستقل از تحریکات بیمارگر بود، هر چند به‌نظر می‌رسد که حضور بیمارگر میزان افزایش را بیشتر کرده است.

ب: پس از کاربرد عصاره برگ کرفس، فعالیت بتا ۱، ۳ گلوکاناز بوته سالم در برگ اول و دوم در ساعات اولیه کاهش جزئی و پس از ۷۲ ساعت افزایش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان داد (شکل ۴). در بوته مایه‌زنی شده،



شکل۵. تغییرات فعالیت ویژه بتا ۱، ۳ گلوکاناز برگ خیار پس از کاربرد عصاره کرفس روی برگ اول و مایه‌زنی بیمارگر روی بوته

Fig. 5. Changes of β- 1,3- glucanase specific activity of cucumber leaf extract after the application of Celery extract on the leaf 1 and pathogen inoculation on the plant.

فعالیت این آنزیم در هر دو برگ پس از ۴۸ ساعت کاهش معنی‌داری نسبت به شاهد نشان می‌دهد (شکل ۵). فعالیت آنزیم در بوته‌های مایه‌زنی شده در مجموع کمتر از بوته‌های سالم است که می‌تواند نمایانگر اثر بیمارگر در کاهش فعالیت آنزیم باشد. در شاهد آلوده فعالیت آنزیم پس از ۴۸ ساعت روند افزایشی یافته است که ممکن است بیان کند فعالیت آنزیم نتیجه واکنش گیاه در برابر بیماری است نه عامل مقاومت در برابر آن. در بوته آلوده تیمارشده با عصاره، افزایش فعالیت انزیم پس از ۴۸ ساعت کمتر است که ممکن است ناشی از اثر متقابل عصاره و بیمارگر باشد.

پس به‌طور خلاصه می‌توان گفت که در بوته خیار تیمارشده با عصاره برگ کرفس، میزان فعالیت بتا ۱، ۳ گلوکاناز برابر یا کمتر از شاهد بوده و در بوته مایه‌زنی شده کمتر از بوته سالم بوده است که احتمالاً ناشی از تعامل اثر عصاره و تنش ناشی از نفوذ بیمارگر بود.

در مجموع با توجه به اینکه عصاره کرفس بیماری را به‌صورت موضعی روی برگ اول کنترل کرد و اثری نیز بر جوانه‌زنی اسپور نداشت، به نظر می‌رسد که کنترل بیماری توسط این عصاره، نه به دلیل خاصیت ضدقارچی، بلکه از طریق القاء مقاومت در گیاه باشد. از طرف دیگر باتوجه به اینکه تغییرات فعالیت آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز در تیمارهای مختلف هماهنگی مشخصی با کنترل بیماری نشان نمی‌دهد، به نظر می‌رسد این آنزیم نقش خاصی در مقاومت به بیماری ندارد و لازم است سایر سازوکارهای احتمالی القای مقاومت بررسی شود.

پیش از این گزارش شده است که ویتامین B_1 (تیامین) و فسفات قادر به ایجاد مقاومت سیستمیک اکتسابی در گیاهان علیه بیماری‌ها هستند (Gottstein & Kuc 1983, Doubrava *et al*. 1988, Ahni *et al*. 2005) و وجود هر دو این ترکیبات در عصاره برگ کرفس (http://www.peseshkan.org/2009) بیان می‌کند که کنترل بیماری سفیدک پودری خیار توسط عصاره برگ کرفس احتمالاً از طریق القای مقاومت در گیاه توسط سازوکارهایی غیر از تغییر فعالیت آنزیم بتا ۱، ۳ گلوکاناز است.

منابع

جهت ملاحظه به صفحات (69-71) متن انگلیسی مراجعه شود.