وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی

گزارش نهایی طرح تحقیقاتی

بررسی تاثیرات ضد قارچی بریوفیت‌ها (خزه‌ها و هپاتیک‌ها)

وزارت جهاد کشاورزی
سازمان تحقیقات و آموزش کشاورزی
موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی

- عنوان طرح: بررسی تاثیرات ضد قارچی بریوفیت‌ها (خزه‌ها و هپاتیک‌ها)
- شماره مصوب: ۱۱۵-۸۰-۱۱-۱۱-۱۰۷
- نام و نام خانوادگی نگارنده: سعید شیرزادیان
- نام و نام خانوادگی مجری مسئول و هماهنگ کننده (اختصاص به پروژه‌ها و طرح‌های ملی و مشترك دارد): سعید شیرزادیان
- نام و نام خانوادگی مجری مسئول: همایون افشاری‌آزاد
- نام و نام خانوادگی همکاران: مجید اسکندری
- نام و نام خانوادگی مشاور: معصومه میرزایی
- محل‌های اجرا: بخش تحقیقات رستنی‌ها و بخش تحقیقات بیماری‌های گیاهان، موسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی
- تاریخ شروع: ۱۳۸۰/۱/۲۰
- مدت اجرا: ۴ سال
- ناشر:
- شمارگان (تیراژ):
- تاریخ انتشار: ۱۳۸۴

فهرست مندرجات

چکیده

واژه های کلیدی

مقدمه

مواد و روش‌ها

نتایج

بحث

پیشنهادات

فهرست منابع

چکیده انگلیسی

چکیده

در این پژوهش، تاثیر ضد قارچی عصاره های مختلف ۲۳ گونه از بریوفیت ها شامل ۲۱ گونه خزه به اسامی:
Amblystegium tenax, Bryum caespiticium, B. capillare, B. pallens, B. stenotrichum, B. weigelii, Cratoneuron commutatum, Didymodon spadiceus, Drepanocladus aduncus, D. uncinatus, Grimmia hartmanii, G. pulvinata, Gymnostomum aeruginosum, Haplocladium sp., *Leskea polycarpa, Orthotrichum rupestre, Philonotis fontana, Ph. marchica, Plagiomnium rugicum, Syntrichia princeps* و *Warnstorfia exannulata*
و دو گونه از هپاتیك (جگرواش) های برگدار به نام های: *Dumortiera hirsuta* و *Pellia epiphylla* برای نخستین بار در کشور صورت گرفت. برای این منظور، تاثیر عصاره های هر یك از گونه های مذکور روی هفت گونه قارچ بیماریزای گیاهی به اسامی: *Alternaria alternata, Fusarium oxysporum, F. solani, Macrophomina phaseolina, Pythium* sp., *Rhizoctonia solani, Verticillium dahliae* بررسی گردید. جهت انجام این کار، ابتدا نمونه هایی از بریوفیت ها جمع‌آوری و سپس در آزمایشگاه شستشو، خشك و پودر گردیدند و بعد توسط حلال های آبی (خام و جوشانده)، اتانولی، متانولی، استونی و اتر نفتی عصاره گیری و پس از آن مورد شناسایی قرار گرفتند. از آنجایی که از نتایج به دست آمده از حلال های فوق در سال های اول و دوم طرح از جمیع جهات بهترین نتیجه از عصاره اتانولی به دست آمد، لذا در سال های پایانی طرح فقط از حلال اتانول استفاده گردید. عصاره ها به نسبت حجمی ۱:۱۰ با محیط کشت زاپك مخلوط و رشد قارچ های مورد نظر روی آنها با شاهد (محیط کشت بدون عصاره) مقایسه گردید. نتایج حاصله نشان داد که از بین خزه های تحت بررسی، *Ph. marchica* توانست در جلوگیری از رشد *R. solani* و همچنین *G. pulvinata* علاوه بر کنترل قارچ اخیر رشد *A. alternata* را نیز به مقدار قابل ملاحظه‌ای مهار نماید. خزه های *P. rugicum* و *Haplocladium* sp. نیز در کنترل قارچ های *F. oxysporum*, *Pythium* sp., *R. solani*, *V. dahliae* مؤثر بودند. از سوی دیگر، دو گونه جگرواش *D. hirsuta* و *P. epiphylla* به ترتیب قادربه مهار قارچ های *Pythium* sp. و *R. solani* شدند. از طرف دیگر، کمترین تاثیر روی قارچ های مورد آزمایش توسط *S. princeps* و *G. aeruginosum* مشاهده گردید. در پایان،

نتایج آزمایش های انجام شده نشان داد که عصاره هیچیك از نمونه های بریوفیت در غلظت به کار رفته تاثیر کشنده روی قارچ های مورد آزمایش نداشتند و تنها موجب تاخیر در رشد آنها شدند.

واژه های کلیدی: بریوفیت، خزه، هپاتیك، جگرواش، ضد قارچ

مقدمه

طی تحقیقات متعددی که تا کنون در کشور های مختلف جهان در مورد بریوفیت ها (خزه ها و هپاتیك ها یا جگرواش ها) صورت گرفته است، علاوه بر دستیابی به موارد متعدد کاربردی آنها

(Ando & Matsuo 1984)، دامنه وسیعی از مواد آلی از این گیاهان استخراج و شناسایی گردیده که دارای خواص ضد قارچی و ضد باکتریایی بوده و هم اکنون در برخی کشور ها در گیاهپزشکی و دارو سازی مورد استفاده قرار می گیرند.

از سال ها پیش، دانشمندان متوجه این نکته شده بودند که بریوفیت ها برخلاف گیاهان عالی مورد حمله تعداد اندکی از میکروارگانیزم ها قرار می گیرند و در نتیجه برای نگهداری نمونه های هرباریومی آنها تیمار خاصی لازم نیست (Banerjee & Sen 1979). از طرف دیگر، با مرور برخی منابع چگونگی تاثیر عصاره این گیاهان در کنترل میکروارگانیزم ها به روشنی آشکار می گردد(Mc Cleary & Walkington 1966, Gunnison & Alexander 1975 and Glime & Saxena 1991).

مدسن و پتس (Madsen & Pates 1952) هشت گونه بریوفیت را بررسی کردند که از آن میان، گونه های *Orthotrichum rupestre* و *Dumortiera hirsuta, Sphagnum portoricense, S. strictum* علیه قارچ *Candida albicans* فعال بودند. همچنین مك‌کلری و همکاران (Mc Cleary *et al.* 1960) مهار قارچ مذکور را توسط خزه ها گزارش نمودند. ولترز (Wolters 1964) طی مطالعاتی که روی ۱۸ گونه از بریوفیت ها انجام داد (دو گونه متعلق به جگرواش ها و بقیه به خزه ها) نتیجه گرفت کهگونه های *Pogonatum aloides, Plagiothecium delicatulum* و *Diplophyllum albicans* در این ارتباط بیشترین نقش را ایفاء نمودند. در پژوهش

های بیشتری که بعدا انجام گرفت(Mc Clure & Miller 1967, Huneck 1969, Tutscheck & Rodolph 1971, Herout 1975, Huneck & Schreiber 1975 and Smith 1978a)، مواد مختلفی از جمله چربی های اشباع نشده، اسیدهای چرب استری، لیگنان ها، فلاونید ها، تری ترپنوییید ها، و مواد فنلی در بریوفیت هامورد شناسایی قرار گرفت. پرایس (Pryce 1972) نشان داد که اسید های Lunularic و Lunuralin موجود در گونه‌ای از این گیاهان، از جوانه زنی هاگ قارچ هایی نظیر:*Alternaria brassicola, Botrytis cinerea, Septorium nodurum* و *Uromyces fabae*جلوگیری می نماید. بانرجی و سن (Banerjee & Sen 1979) طی آزمایش هایی گسترده‌ای که روی ۵۲ گونه از بریوفیت ها در مقابل ۱۲ میکروارگانیزم از جمله: *Aspergiluus niger, Curvularia lunata,* و *Helminthosporium oryzae* انجام دادند، وجود مواد ضد قارچی را در این گیاهان اثبات نمودند. طبق اظهار آنها، خواص انتی بیوتیکی بریوفیت ها از گونه‌ای به گونه دیگر تفاوت محسوس دارد و به سن، زمان جمع آوری، جایگاه بوم شناختی (نظیر ارتفاع محل رویش و غیره) و حلال ارتباط مستقیم دارد. به علاوه، به عقیده آنها pH عصاره آبی هرگز نمی تواند کمتر از چهار و بالاتر از هفت برود. نظرمك کلری و واکینگتون (۱۹۶۶) در مورد عصاره‌های *Sphagnum cuspidatum, . palustre*و *Polythrichum commune* نیز این مطلب را تایید می نماید. بانرجی و سن (۱۹۷۹) نیز درصد وسیعی از اثرات بازدارندگی را در خزه‌ای به نام: *Brachythecium procumbens* و دو گونه جگرواشبه اسامی: *Asterella sanguinea* و*Marchantia palleacea* به اثبات رساندند. بورل و همکاران (Borel *et al.* 1993) پس از عصاره گیری از هشت گونه خزه، ماده بازدارنده رشدی به نام Dicranin از *Dicranum scoparium* استخراج و آنرا با موفقیت علیه میکروارگانیزم های پارازیت به کار بردند. لریمر و همکاران (Lorimer *et al.* 1993) موفق به استخراج ماده ضد قارچی دیگری به نام Bibenzyl از جگرواش ها شدند. همچنین این محقق همراه با یکی از همکارانش (Lorimer & Perry 1994) توانست ماده دیگری را به نام Hydroxyacetophenones در این گیاهان کشف نماید کهآن هم خاصیت ضد قارچی داشت. علاوه براین، اسید چرب جدیدی به نام Cyclopentenyl از خزه هایی به اسامی: *D. japonicum* و *Dicranum scoparium*

استخراج گردید که رشد قارچ*Pyricularia oryzae* را که موجب سوختگی برنج می شود کاملا مهار می نماید.

به گزارش مکوریا و همکاران (Makuria *et al.* 1998) در سال های اخیر، خزه ها برخلاف گیاهان گلدار فاقد مکانیزم های دفاعی ساختمانی هستند و لذا برای مقابله با میکروارگانیزم های بیماریزا از مکانیزم بیشتری برخوردار هستند. محققان این خاصیت ضد میکروبی آنها را به وجود موادپلی فنلی‌شان نسبت داده‌اند.

با توجه به مطالب فوق الذکر، علیرغم ادامه تحقیقات متعدد که در سال های بسیار اخیر در مورد مواد ضد قارچی و باکتریایی بریوفیت ها در سراسر جهان انجام گرفته (Tadesse 2002 and Frahm 2004) و یا در حال اجراست، متاسفانه هنوز در ایران در این خصوص پژوهشی صورت نگرفته و تنها می توان به یك مورد تحقیقات مقدماتی که در سال ۱۳۷۸ در قالب رساله دکتری (چاپ نشده) توسط میرزایی انجام گرفت اشاره نمود. لذا با توجه به مرور منابع، ضرورت انجام چنین طرحی اجتناب ناپذیر به نظر می رسید.

در پژوهش حاضر، تعداد ۲۳ گونه مختلف از بریوفیت ها که از این تعداد ۲۱ گونه مربوط به خزه ها و دو گونه هم به هپاتیك (جگرواش) های برگدار تعلق دارند برای نخستین بار در کشور انجام گرفت. جهت این کار، ابتدا عصاره گیری از نمونه ها که شرح مفصل آن در بخش های بعدی آمده است به عمل آمد و سپس تاثیر هر یك از گونه ها روی چند قارچ بیماریزا که در دسترس بود آزمایش و مورد مطالعه قرار گرفت (مشروح آن در بخش های بعدی این گزارش آورده شده است). با جمع آوری گونه های مورد نظر از این گیاهان که طی مراحل مختلف انجام و سپس مورد شناسایی قرار گرفتند، نگارنده سعی نموده است که با هدف برداشتن گام هایی در راستای اهداف مبارزه بیولوژیك، ضمن اثبات این امر بتواند گونه هایی از بریوفیت ها را که از آنها برای کنترل قارچ ها می توان استفاده نمود معرفی نماید. لذا با توجه به مطالب مذکور، می توان از این گیاهان که قادرند به طور طبیعی تاثیر بازدارندگی و مهار رشد قارچ های بیماریزا را ایفاء نمایند، با انجام روش هایی بسیار ساده و کم هزینه استفاده نمود. نتایج به

دست آمده بدون تردید می تواند به عنوان یکی از راهکار های بهینه در تضمین حل این مشکل در امر کشاورزی پیشنهاد و مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش ها

مراحل مختلف اجرای این طرح به شرح زیر انجام گردید:

۱- جمع‌آوری نمونه های بریوفیت (خزه ها و هپاتیك ها یا جگرواش ها)

نمونه برداری از بریوفیت ها از مناطق مختلف در سال های اول اجرای طرح طبق جدول زمان بندی شده در فصول مناسب انجام گردید (جدول ۱).

بدین منظور نمونه ها بلافاصله پس از جمع‌آوری ابتدا درون کیسه های نایلونی قرار داده شدند و سپس مشخصات صحرایی هر یك شامل محل جمع‌آوری، ارتفاع، بستر رویش، تاریخ جمع‌آوری و ... به کیسه مربوطه الصاق گردید. نمونه ها را در کوتاه ترین زمان ممکن به فریزر انتقال داده تا مواد مؤثره آنها حد الامکان حفظ گردد. سپس قبل از شروع عملیات آزمایشگاهی جهت عصاره‌گیری ها (در مدت حداکثر ۴۸ ساعت پس از زمان جمع آوری) هر یك از نمونه ها را ابتدا با فشار آب معمولی و سپس با آب مقطر شستشو دادیم. پس از آن یك بخش از هر نمونه را در آزمایشگاه بخش تحقیقات رستنی ها جهت تهیه اسلاید های میکروسکوپی از اندام های مختلف هر یك از نمونه ها به کمك فیکساتیو گام کلرال (Hoyer's medium) جهت شناسایی و تعیین نام دقیق گونه ها با استفاده از فلور ها و کلید های معتبر نگهداری نموده (Smith 1978b and Crum & Anderson 1981) و در ضمن بخش اعظم هر نمونه را به آزمایشگاه بخش تحقیقات بیماری های گیاهان جهت انجام عصاره‌گیری ها منتقل کردیم. در آنجا تمام نمونه ها روی کاغذ در سایه در دمای آزمایشگاه خشك شده (شکل ۱) و بعدهر یك توسط آسیاب برقی پودر شده و از غربالی با منافذ ۰/۵ میلی متر گذرانده، سپس جهت انجام مراحل عصاره گیری ها به درون شیشه های تیره رنگ منتقل گردیدند.

۲- معرفی قارچ ها شامل تهیه و شناسایی:

تعدادی از قارچ های شناسایی شده موجود در کلکسیون بخش تحقیقات بیماری های گیاهان شامل چند جدایه قارچ خاکزاد و هوازاد انتخاب و برای بررسی تاثیر عصاره های بریوفیت در نظر گرفته شدند (جدول ۲).

شکل ۱- خشك كردن نمونه های بریوفیت پس از جمع‌آوری و شستشو.

جدول۲- مشخصات شش گونه قارچ بیماریزای گیاهی جهت بررسی تاثیر عصاره های بریوفیت ها

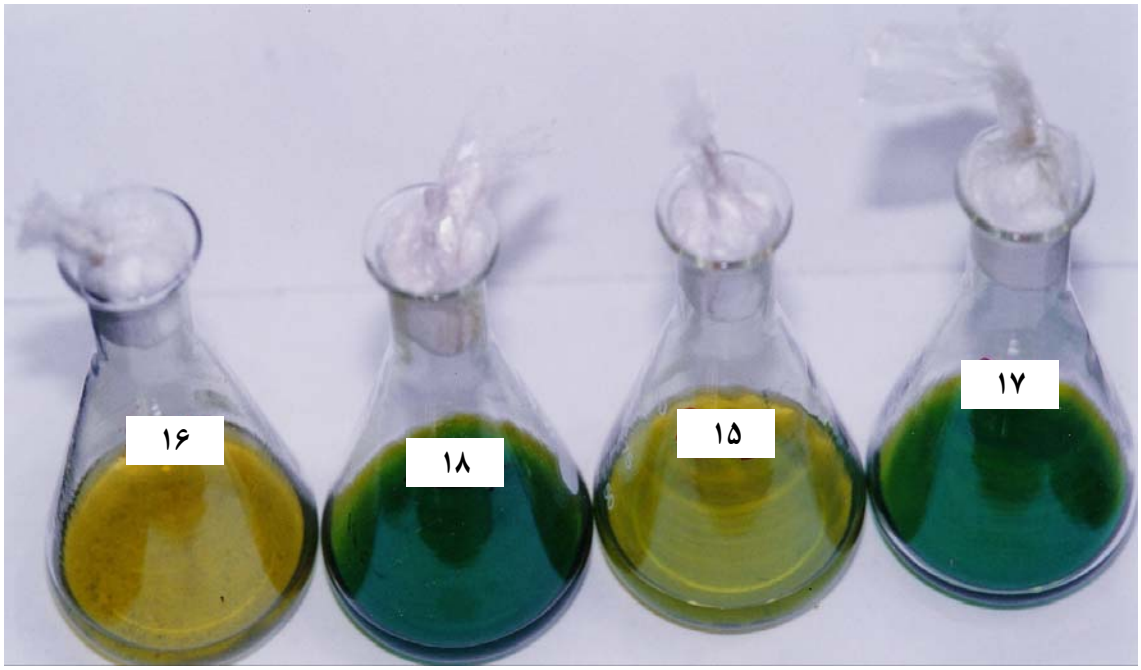
کد نمونه	نام علمی	محل جمع‌آوری	میزبان	تاریخ جمع‌آوری
۱۰٦	*Alternaria alternata*	مازندران: ساری- جویبار	برگ کلزا	۱۳۸۰/۱/۲۸
۶۰۸	*Fusarium oxysporum*	مازندران: رودبار- باغ اتکا	ریشه زیتون	۱۳۷۹/۳/۱۵
٦۱۳	*F. solani*	اصفهان: کبوترآباد	"	۱۳۷۷/۳/۱٤
۷۰۱	*Macrophomina phaseolina*	اردبیل: کشت و صنعت مغان	طوقه زیتون	۱۳۸۰/٤/۱۲
۸۰۴	*Pythium* sp.	مازندران: ساری- جویبار	ریشه کلزا	۱۳۸۰/۱/۲۸
۱۰۵۰	*Rhizoctonia solani*	گلستان: گرگان- کریم آباد	ریشه سویا	۱۳۷۷/۸/۱۵

۳- عصاره گیری:

عصاره گیری از پودر نمونه های بریوفیت طبق روش بانرجی و سن (Banerjee & Sen 1979)

با تغییرات جزیی انجام گرفت. از آنجایی که از نتایج به دست آمده پس از آزمودن حلال های آبی (خام و جوشانده)، اتانولی، متانولی، استونی و اتر نفتی در سال های اول و دوم طرح از جمیع جهات بهترین نتیجه از حلال اتانول به دست آمد، لذا در سال های پایانی طرح (در غلظت به کار

رفته) فقط از عصاره اتانولی استفاده گردید. بدین منظور، مقدار یك گرم پودر خشك از هر نمونه بریوفیت با ۱۰ میلی لیتر حلال مخلوط نموده و به مدت ۲۴ ساعت روی شیکر با سرعت ۱۲۰ دور در دقیقه در دمای اتاق تکان داده شد. سپس بقایای گیاه ازطریق سانتریفیوژ کردن به مدت ۱۰ دقیقه در ۴۵۰۰rpm از عصاره جدا گردید. برای حذف حلال از عصاره ها، از دستگاه تقطیر دوار در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. پس از خارج نمودن حلال، حجم عصاره ها با آب مقطر استریل به حجم قبلی رسانده شده و برای انجام آزمایش ها به کار گرفته شدند (شکل ۲).



شکل ۲- عصاره های استخراج شده از چهار نمونه بریوفیت (کد های ۱۵ تا ۱۸) توسط حلال اتانول.

۴- بررسی تاثیر عصاره ها روی قارچ ها:

عصاره ها به نسبت حجمی ۱:۱۰ با محیط کشت زاپك-آگار (CzA) در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد مخلوط گردید و مقدار ۲۰ میلی لیتر از آنها در تشتك های پتری ۱۰ سانتی متری ریخته شد. بعد از سرد شدن مخلوط عصاره و محیط کشت، اقدام به انتقال یك قطعه کشت تازه قارچ مورد آزمایشبه قطر هفت میلی متر به مرکز ظرف حاوی محیط کشت گردید. عمل انکوباسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد صورت گرفت. ارزیابی تیمار ها به صورت اندازه گیری قطر کلنی قارچ کشت شده از زمانی شروع گردید که در تیمار شاهد (فاقد عصاره) قطر کلنی قارچ به حداکثر (۹۰ میلی متر) رسیده بود.

نتایج

تاثیر عصاره های گونه های مختلف بریوفیت روی قارچ های مورد نظر طی آزمایش های متفاوت زیر مورد بررسی قرار گرفت که نتایج هر یك نیز در جداول مجزا آورده شده است. شایان ذکر است که جهت دستیابی به نام علمی گونه های بریوفیت که در جداول ۳ تا ۱۵ به آنها اشاره شده است، می‌توان با در نظر گرفتن کد مربوطه به جدول زیر (جدول ۱) مراجعه نمود.

جدول۱- مشخصات گونه های بریوفیت (خزه و هپاتیك) جمع‌آوری و بررسی شده

کد نمونه	نام علمی	محل جمع‌آوری	ارتفاع محل جمع‌آوری (متر)	بستر رویش	تاریخ جمع‌آوری
۳	*Bryum caespiticum*	تهران: شمشك- دیزین	۳۰۰۰	روی سنگ	۱۳۸۰/۶/۲۳
۱	*B. capillare*	"	"	"	"
۲	*B. stenotrichum*	"	"	"	"
۲۷	*B. pallens*	تهران: فشم- ارتفاعات آبنیك	۲۹۰۰	کنار رودخانه و چشمه	۱۳۸۳/۴/۵
۲۹	*B. weigelii*	"	"	"	"
۴	*Pellia epiphylla* *	تهران: درکه	۱۸۰۰	پای درخت، کنار رودخانه	۱۳۸۰/۷/۲۲
۵	*Drepanocladus uncinatus*	"	"	"	"
۲۵	"	مازندران: جاده هراز- آبشار شاهاندشت	۱۵۰۰	روی خاك مرطوب	۱۳۸۲/۴/۲۲

۲۸	*D. aduncus*	تهران: فشم- ارتفاعات آبنیك	۲۹۰۰	کنار رودخانه و چشمه	۱۳۸۳/۴/۵
۱۹	*Warnstorfia exannulata*	کهگیلویه و بویر احمد: آبشار مارگون	۲۱۵۰	روی خاك مرطوب	۱۳۸۰/۲/۲۹

ادامه جدول۱:

۶	*Philonotis marchica*	تهران: درکه	۱۸۰۰	پای درخت، کنار رودخانه	۱۳۸۰/۷/۲۲
۳۱	*Ph. fontana*	تهران: فشم- ارتفاعات آبنیك	۲۹۰۰	کنار رودخانه و چشمه	۱۳۸۳/۴/۵
۷	*Leskea polycarpa*	تهران: درکه	۱۸۰۰	پای درخت، کنار رودخانه	۱۳۸۰/۷/۲۲
۱۵	*Grimmia hartmanii*	لرستان: خرم آباد- مخمل کوه	۱۵۰۰	روی صخره	۱۳۸۱/۱۲/۷
۱۶	*G. pulvinata*	"	"	"	"
۱۷	*Syntrichia princeps*	"	"	"	"
۱۸	*Orthotrichum rupestre*	"	"	"	"
۲۰	*Didymodon spadiceus*	لرستان: ماسور- آبشار نوژیان	۲۰۴۰	روی خاك مرطوب	۱۳۸۰/۴/۲۵
۲۱	*Gymnostomum aeruginosum*	کهگیلویه و بویر احمد: آبشار مارگون	۲۱۵۰	"	۱۳۸۰/۲/۲۹
۲۲	*Dumortiera hirsuta* *	"	"	"	"
۲۳	*Cratoneuron commutatum*	"	"	"	"
۲۴	*Plagiomnium rugicum*	مازندران: جاده هراز- آبشار شاهاندشت	۱۵۰۰	"	۱۳۸۲/۴/۲۲
۲۶	*Haplocladium* sp.	"	"	"	"
۳۰	*Amblystegium tenax*	آذربایجان شرقی: جلفا- کوه کیامکی- آبشار آسیاب خرابه	۱۰۰۰	روی خاك و رسوبات	۱۳۸۳/۳/۲۶

* نمونه‌ای از هپاتیك ها (جگرواش ها)

آزمایش شماره ۱:

این آزمایش به صورت مخلوط نمودن دو میلی لیتر از عصاره های آبی (خام و جوشانده)، اتانولی، متانولی، استونی و اتر نفتی هفت گونه از بریوفیت ها (کد های شماره ۱ تا ۷) با ۱۸ میلی لیتر محیط کشت سیب زمینی- دکسروز- آگار (PDA) به شرح زیر انجام گرفت. قارچ های بیماریزای مورد آزمایش شامل:
Alternaria alternate, Fusarium solani, Macrophomina phaseolina, Rhizoctonia solani, بودند (اشکال ۳ تا ۴ و جداول ۳ تا ۶).

جدول۳- تاثیر عصاره های هفت گونه بریوفیت در رشد میسلیوم قارچ *Rhizoctonia solani*

	قطر کلنی قارچ بر حسب میلی متر						
کد نمونه	شاهد	آبی خام	جوشانده آبی	اتانولی	متانولی	استونی	اتر نفتی
۱	۹۰	۹۰	۸۵	۸۰	۸۵	۹۰	۹۰
۲	۹۰	۹۰	۸۶	۸۵	۸۵	۸۶	۹۰
۳	۹۰	۹۰	۸۵	۷۵	٦۲	۸۴	٦٦
٤	۹۰	۹۰	۸۰	۳۹	۵۸	۷۸	۸۵
۵	۹۰	۹۰	۹۰	٤۵	۷۵	۸۴	۸۷
٦	۹۰	۹۰	۸۳	۲۷	۵۱	۶۵	۷۰
۷	۹۰	۹۰	۹۰	٤۸	۸۰	۸۵	۹۰

جدول٤- تاثیر عصاره های هفت گونه بریوفیت در رشد میسلیوم قارچ *Fusarium solani*

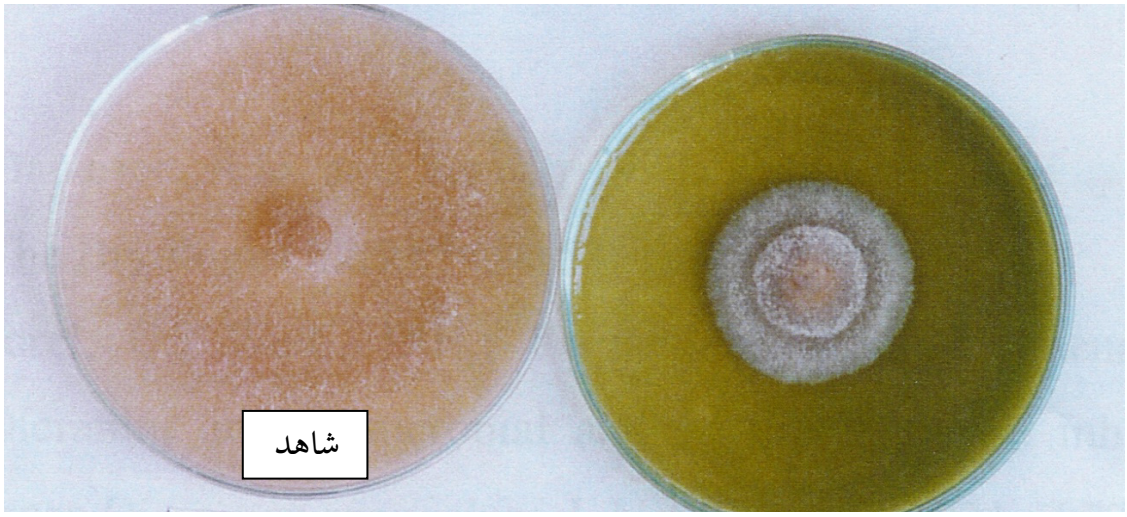
	قطر کلنی قارچ بر حسب میلی متر						
کد نمونه	شاهد	آبی خام	جوشانده آبی	اتانولی	متانولی	استونی	اتر نفتی
۱	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰
۲	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰
۳	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰
٤	۹۰	۹۰	۹۰	۸۰	۷۸	۸۲	۹۰
۵	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰
٦	۹۰	۹۰	۹۰	۷۸	۷۵	۸۰	۸۰
۷	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰

جدول٥- تاثیر عصاره های هفت گونه بریوفیت در رشد میسلیوم قارچ *Macrophomina phaseolina*

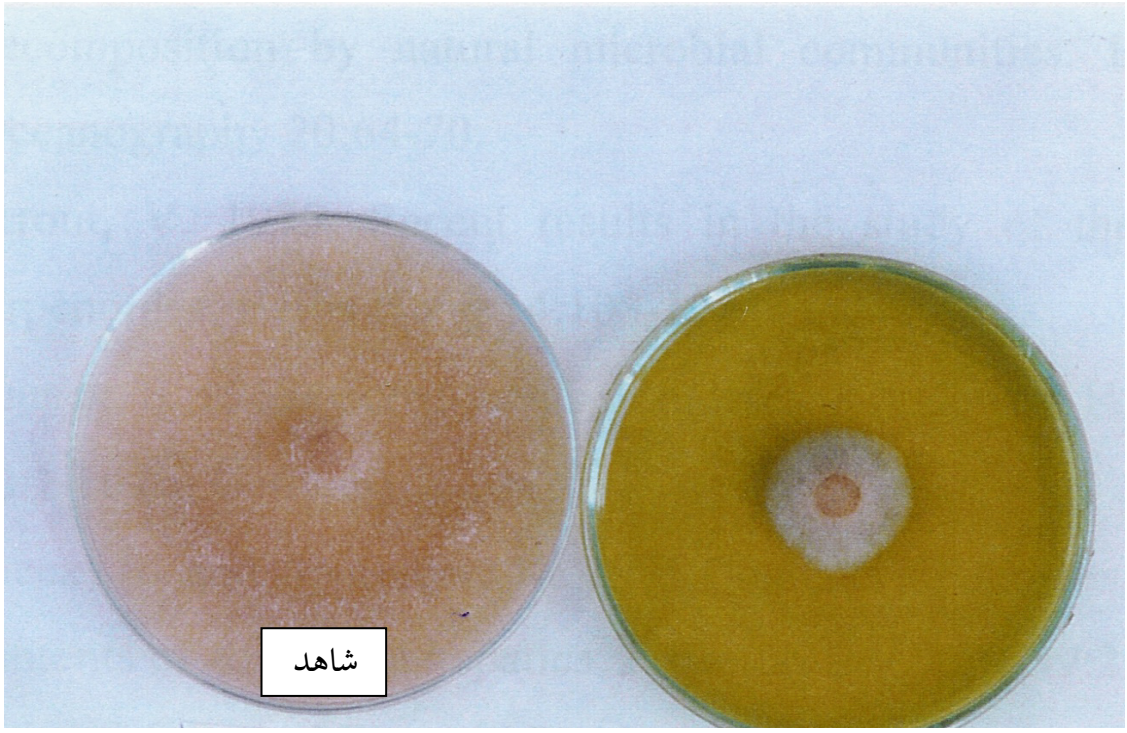
	قطر کلنی قارچ بر حسب میلی متر						
کد نمونه	شاهد	آبی خام	جوشانده آبی	اتانولی	متانولی	استونی	اتر نفتی
١	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠
٢	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠
٣	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠
٤	٩٠	٩٠	٩٠	٧٢	٨٦	٨٠	٩٠
٥	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠
٦	٩٠	٩٠	٩٠	٨٥	٨٢	٨٤	٩٠
٧	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠

جدول٦- تاثیر عصاره های هفت گونه بریوفیت در رشد میسلیوم قارچ *Alternaria alternate*

	قطر کلنی قارچ بر حسب میلی متر						
کد نمونه	شاهد	آبی خام	جوشانده آبی	اتانولی	متانولی	استونی	اتر نفتی
١	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠
٢	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠
٣	٩٠	٩٠	٩٠	٧٥	٨٥	٩٠	٩٠
٤	٩٠	٩٠	٩٠	٨٠	٨١	٨٥	٨٧
٥	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠
٦	٩٠	٩٠	٨٥	٦٥	٨١	٨٦	٧٥
٧	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠	٩٠



شکل ۳- تاثیر عصاره اتانولي *Pellia epiphylla* (تیمار شماره ۴) در رشد قارچ *Rhizoctonia solani*.



شکل ۴- تاثیر عصاره اتانولی *Pellia epiphylla* (تیمار شماره ۶) در رشد قارچ *Rhizoctonia solani*.

همان طور که در جدول ۳ مشاهده می شود، عصاره های آبی خام و جوشانده هیچیك از نمونه ها (کد های ۱ تا ۷) تاثیری در رشد کلنی *Rhizoctonia solani* نداشتند. علاوه بر این، به دلیل عدم دسترسی به فیلتر استریل میلی پور، در تمام تیمارهای مربوط به عصاره های آبی خام و جوشانده آلودگی باکتریایی وجود داشت. به غیر از عصاره اتانولی و متانولی نمونه های شماره ٤ و ٦ (هر یکبه مقدار دو میلی لیتر)، بقیه عصاره ها تاثیر قابل ملاحظه ای در رشد قارچ مزبور نداشتند. در نتیجه بیشترین تاثیر بازدارنده را به ترتیب عصاره اتانولی نمونه های شماره ٤ (شکل ۳) و ٦ (شکل ۴) فقط روی قارچ فوق الذکر نشان دادند.

نتایج بررسی تاثیر عصاره ها روی *Fusarium solani* تقریبا مشابه تاثیر آنها روی *Rhizoctonia solani* بود، با این تفاوت که میزا ن تاثیر آنها کمتر بود (جدول ٤).

در مورد *Macrophomina phaseolina* تاثیر بازدارنده رشد قابل توجهی ملاحظه نشد. همانند موارد قبل عصاره های آبی و جوشانده باعث آلودگی محیط کشت شدند (جدول ٥).

در ارتباط با *Alternaria alternata* نیز نتایج تقریبا مشابه سه مورد قبل بود. اکثر تیمارهای آبی و جوشانده، آلودگی باکتریایی داشتند و به غیر از عصاره اتانولی نمونه شماره ٦، بقیه عصاره ها تاثیر ضد قارچی قابل ملاحظه‌ای نشان ندادند (جدول٦).

آزمایش شماره ۲:

این آزمایش نیز مانند آزمایش قبلی به صورت مخلوط نمودن دو میلی لیتر از عصاره های آبی (خام و جوشانده)، اتانولی، متانولی، استونی و اتر نفتی پنج گونه دیگر از بریوفیت ها (کد های شماره ۸ و ۱۱ تا ۱۴) در ۱۸ میلی لیتر محیط کشت سیب زمینی- دکستروز- آگار (PDA) انجام گرفت. در این آزمایش، علاوه بر قارچ های قبلی یك قارچ بیماریزای دیگر به نام: *Fusarium oxysporum* نیز مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که هیچ یك از عصاره های حاصل از نمونه های بریوفیت در نظر گرفته شده تاثیر کنترل کننده و یا باز دارنده رشد نداشتند،

لذا از تعیین نام آنها صرفنظر گردید، ولی جزییات و نتایج این بررسی جهت مقایسه و تکمیل نتایج به شرح ذیل می باشد (جداول ۷ تا ۱۱):

جدول۷- تاثیر عصاره های پنج گونه بریوفیت در رشد میسلیوم قارچ *Rhizoctonia solani*

	قطر کلنی قارچ بر حسب میلی متر			
کد نمونه	شاهد	اتانولی	متانولی	استونی
۸	۹۰	۸۸	۹۰	۹۰
۱۱	۹۰	۸۹	۸۸	۹۰
۱۲	۹۰	۸۷	۹۰	۸۸
۱۳	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰
۱۴	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰

جدول۸- تاثیر عصاره های پنج گونه بریوفیت در رشد میسلیوم قارچ *Fusarium solani*

	قطر کلنی قارچ بر حسب میلی متر			
کد نمونه	شاهد	اتانولی	متانولی	استونی
۸	۹۰	۹۰	۹۰	۸۹
۱۱	۹۰	۸۹	۹۰۸۹	۹۰
۱۲	۹۰	۹۰	۸۹	۹۰
۱۳	۹۰	۹۰	۸۹	۸۸
۱۴	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰

جدول۹- تاثیر عصاره های پنج گونه بریوفیت در رشد میسلیوم قارچ *Fusarium oxysporum*

	قطر کلنی قارچ بر حسب میلی متر			
کد نمونه	شاهد	اتانولی	متانولی	استونی
۸	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰
۱۱	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰
۱۲	۹۰	۸۴	۸۸	۹۰
۱۳	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰
۱۴	۹۰	۹۰	۸۵	۹۰

جدول۱۰- تاثیر عصاره های پنج گونه بریوفیت در رشد میسلیوم قارچ *Macrophomina phaseolina*

	قطر کلنی قارچ بر حسب میلی متر			
کد نمونه	شاهد	اتانولی	متانولی	استونی
۸	۹۰	۸۷	۹۰	۹۰
۱۱	۹۰	۸۸	۸۷	۹۰
۱۲	۹۰	۹۰	۸۹	۹۰
۱۳	۹۰	۸۹	۹۰	۸۸
۱۴	۹۰	۹۰	۹۰	۸۹

جدول۱۱- تاثیر عصاره های پنج گونه بریوفیت در رشد میسلیوم قارچ *Alternaria alternata*

	قطر کلنی قارچ بر حسب میلی متر			
کد نمونه	شاهد	اتانولی	متانولی	استونی
۸	۹۰	۸۹	۹۰	۸۷
۱۱	۹۰	۹۰	۸۸	۹۰
۱۲	۹۰	۸۷	۹۰	۸۸
۱۳	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰
۱۴	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰

همان گونه که در جداول ۷ تا ۱۱ ملاحظه می شود، هیچیك از سه عصاره اتانولی، متانولی و استونی استخراج شده از پنج گونه بریوفیت ها (کد های ۸ و ۱۱ تا ۱۴) روی قارچ های در نظر گرفته شده تاثیر باز دارنده نداشتند، لذا از ذکر نام یا تعیین نام گونه های فوق صرفنظر گردید، نتیجه این که هیچیك از این گونه ها را نمی توان برای کنترل قارچ های مذکور توصیه نمود.

آزمایش شماره ۳:

این آزمایش نیز همانند آزمایش های قبلی به کمك چهار گونه دیگر از بریوفیت ها (کد های شماره ۱۵ تا ۱۸) در همان محیط کشت (PDA) به شرح جدول زیر (جدول ۱۲) انجام گرفت:

جدول۱۲- تاثیر عصاره اتانولی چهار گونه بریوفیت روی پنج قارچ بیماریزای گیاهی

	قطر کلنی قارچ ها بر حسب میلی متر				
کد نمونه	***Fusarium solani***	***Fusarium oxysporum***	***Rhizoctonia solani***	***Macrophomina phaseolina***	***Alternaria alternata***
۱۵	۶۵	۶۳	۱۵	۹۰	۴۵
۱۶	۵۰	۶۰	۹۰	۱۷	۲۰
۱۷	۸۲	۷۵	۹۰	۹۰	۳۴
۱۸	۷۲	۶۳	۲۵	۸۹	۲۰
شاهد	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰

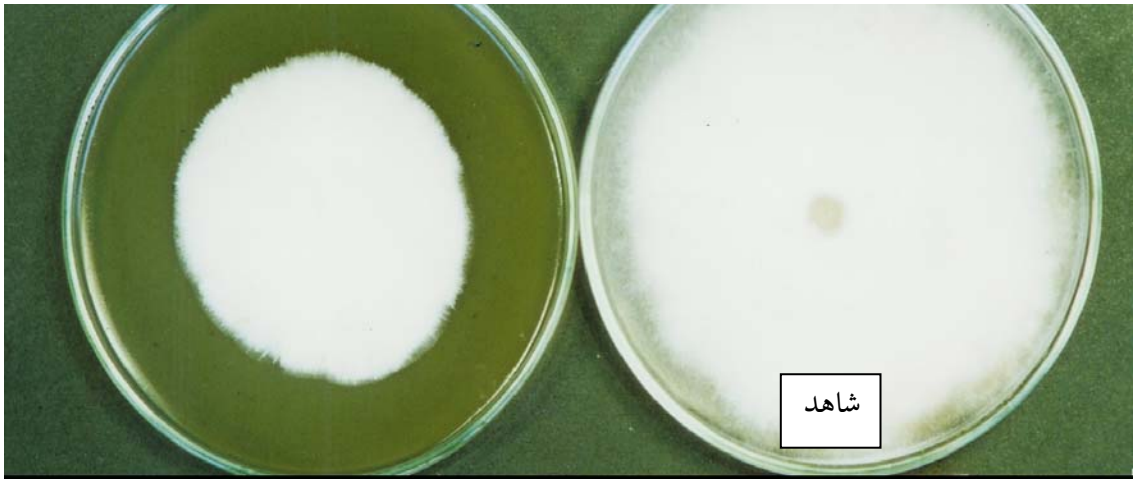
نتایج بررسی عصاره های اتانولی نمونه های شماره ۱۵ تا ۱۸ (جدول ۱۲) نشان داد که عصاره این نمونه ها برخلاف نمونه های قبلی روی قارچ های مورد نظر از تاثیر ضد قارچی قابل ملاحظه‌ای برخوردار بودند. عصاره نمونه ۱۶ دارای بیشترین تاثیر ضد قارچی بود، در حالی که نمونه شماره ۱۷ کمترین تاثیر را داشت. رشد قارچ های *Alternaria alternata* و *Rhizoctonia solani* توسط این گونه ها بیش از سایر قارچ ها کاهش یافت و کمترین تاثیر عصاره ها روی رشد قارچ *Macrophomina phaseolina* مشاهده شد. در این آزمایش نیز هیچیك از عصاره ها در غلظت آزمایش شده تاثیر کشنده نداشته و تنها موجب تاخیر در رشد قارچ ها شدند.

آزمایش شماره ۴:

این آزمایش به صورت مخلوط نمودن دو و چهار میلی لیتر از هر یك ازعصاره های اتانولی پنج گونه بریوفیت (کد های ۱۹ تا ۲۳) در ۱۸ میلی لیتر محیط کشت CzA روی چهار قارچ بیماریزای گیاهی انجام گرفت (اشکال ۵ تا ۸ و جدول ۱۳).

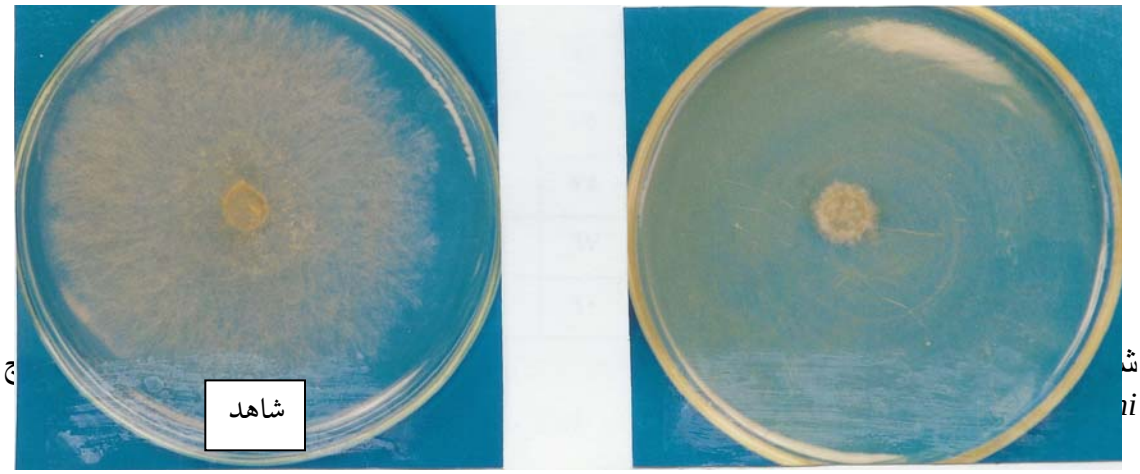
جدول۱۳- تاثیر ضد قارچی پنج گونه بریوفیت روی چهار قارچ بیماریزای گیاهی

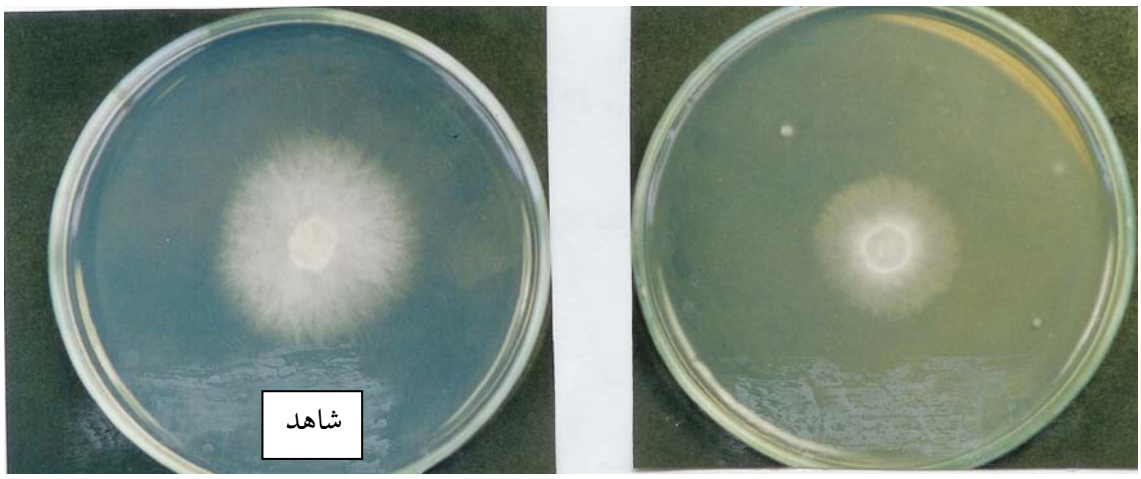
	قطر کلنی قارچ ها برحسب میلی متر								
	Fusarium solani		*Fusarium oxysporum*		*Macrophomina phaseolina*		*Pythium* sp.		
کد نمونه	2 ml	4 ml	2 ml	4 ml	2 ml	4 ml	2 ml	4 ml	
۱۹	۸٦	۷۰	٦٥	٥۸	۷۲	٤۰	۷۰	۷۰	
۲۰	۸۷	۸۷	۸۲	٦٥	٦٥	٤٥	۷۰	۷۰	
۲۱	۸۸	۷۰	۸۰	٥٥	۸۷	٤۷	۸۳	٦۰	
۲۲	۸٦	٦۲	٥٥	٥۲	۲۷	۲۲	٤۱	۳۷	
۲۳	۸۸	۸٥	٦٤	٦٤	۷٥	۳٥	٥٦	٥٥	
شاهد	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	



شکل ۵- تاثیر عصاره اتانولی *Dumortiera hirsuta* (تیمار شماره ۲۲) در رشد قارچ *Pythium* ..sp.

شکل ۶- تاثیر عصاره اتانولي *Dumortiera hirsuta* (تیمار شماره ۲۲) در رشد قارچ *Fusarium oxysporum*.





شکل ۸- تاثیر عصاره اتانولی *Cratoneuron commutatum* (تیمار شماره ۲۳) در رشد قارچ *Fusarium oxysporum* .

در جدول ۱۳، از تاثیر عصاره اتانولی پنج گونه مختلف بریوفیت (کد های ۱۹ تا ۲۳) روی چهار قارچ بیماریزای گیاهی، بیشترین تاثیر ضد قارچی را به ترتیب نمونه های شماره ۲۲ و کمترین را نمونه۲۱ نشان داد. در اغلب موارد با افزایش مقدار عصاره، میزان تاثیر پذیری نیز افزایش می یافت و هیچیك از عصاره ها در غلظت به کار رفته نتوانستند به طور کامل مانع رشد قارچ ها گردند (اشکال ۵ تا ۸).

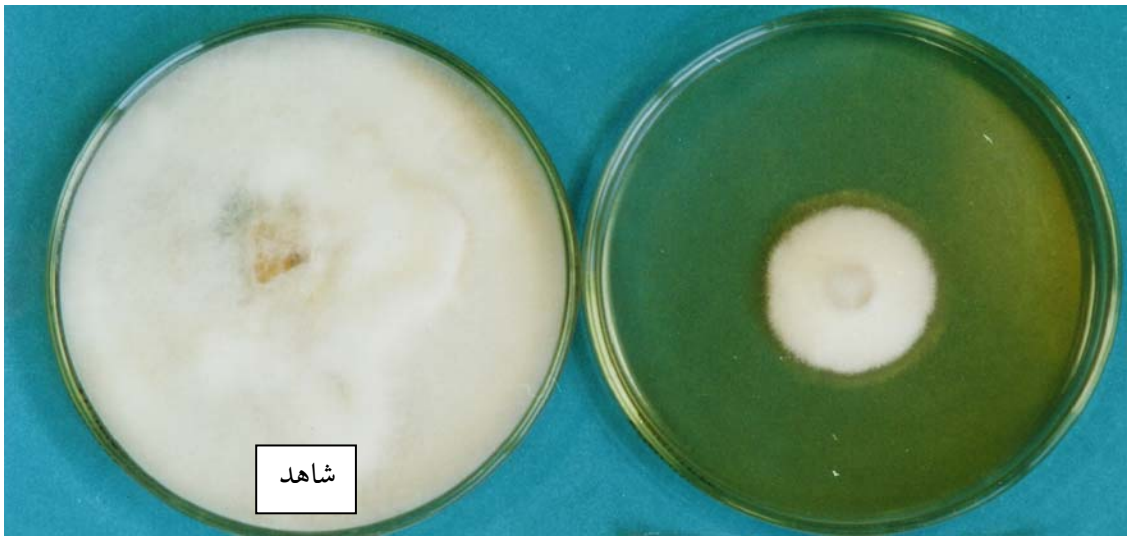
آزمایش شماره ۵:

این آزمایش به صورت مخلوط نمودن ۲ و ۴ میلی لیتر از هر یك از عصاره های اتانولی سه گونه بریوفیت (کد های ۲۴ تا ۲۶) در ۱۸ میلی لیتر محیط کشت CzA روی شش قارچ بیماریزای گیاهی انجام گرفت (شکل ۹ و جدول ۱۴).

جدول۱۴- تاثیر ضد قارچی سه گونه بریوفیت روی شش قارچ بیماریزای گیاهی

	قطر کلنی قارچ ها برحسب میلی متر											
	Fusarium solani		***Fusarium oxysporum***		***Macrophomina phaseolina***		***Pythium* sp.**		***Rhizoctonia solani***		***Verticillium dahliae***	
کد نمونه	**2ml**	**4ml**	**2ml**	**4ml**	**2ml**	**4ml**	**2ml**	**4ml**	**2ml**	**4ml**	**2ml**	**4ml**
۲٤	۸۵	۸۰	۵۵	۵۱	۷۹	۷۵	٦۲	۳۲	۳۹	۲۲	۱۰	۱۵
۲۵	۹۰	۹۰	۷۳	۵۵	۸۵	۷۵	٦۵	۷۰	۳۷	۲۰	۱۳	۱۸
۲٦	۹۰	۹۰	٦٤	۵۷	۷۷	٦۷	۷۲	۵٦	۲٤	۲۹	۲۰	۲۰
شاهد	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۲۳	۲۳

در جدول ۱۴، باستثنای قارچ های *Fusarium solani* و*Macrophomina phaseolina* که عصاره هیچکدام از نمونه های بریوفیت (کد های ۲۴ تا ۲۶) تاثیر بازدارندگی قابل توجهی روی آنها نداشتند، رشد قارچ های *Fusarium oxysporum*، *Pythium* sp.، *Rhizictonia solani* و *Verticillium dahliae* در اثر افزودن عصاره اتانولی تمام نمونه ها به طور قابل ملاحظه کاهش یافت شکل۹). بیشترین تاثیر ضد قارچی را به ترتیب عصاره نمونه های شماره ۲۴ (شکل ۹) و ۲۶ نشان دادند، در حالی که تاثیر عصاره نمونه شماره ۲۵ در حد متوسط بود.



شکل ۹- تاثیر عصاره اتانولی *Plagiomnium rugicum* (تیمار شماره ۲۴) در رشد قارچ *Pythium* sp.

آزمایش شماره ۶:

در آخرین آزمایش انجام شده، عصاره اتانولی پنج گونه دیگر از بریوفیت ها (کد های ۲۷ تا ۳۱) روی تمام قارچ های بیماریزایی که در نظر گرفته شده بود به شرح مندرج در جدول زیر (جدول ۱۵) انجام گرفت.

جدول۱۵- تاثیر ضد قارچی پنج گونه بریوفیت روی شش قارچ بیماریزای گیاهی

	قطر کلنی قارچ ها برحسب میلی متر و درصد کاهش رشد آنها					
کد نمونه	***Fusarium solani***	***Fusarium oxysporum***	***Macrophomina phasiolina***	***Alternaria alternata***	***Rhizoctonia solani***	***Verticillium dahliae***
۲۷	٦٨ (%٢٤/٤)	(%٣١/١) ٦٢	٧٩ (١٢/٢)	٧٠(%٢٢/٢)	(%٢٤/٤) ٦٨	٨٥ (%٥/٥)
۲۸	٦٥ (%٢٧/٨)	(%١٦/٧) ٧٥	٦٢ (٣١/١)	٨٠(%١١/١)	(%٨٨/٩) ١٠	٨٣ (%٧/٨)
۲۹	٧٥ (%١٦/٧)	(%١١/١) ٨٠	٩٠ (%٠)	٩٠(%٠)	٩٠ (%٠)	٨٧ (%٣/٣)
۳۰	٧٣ (%١٨/٩)	(%٢٢/٢) ٧٠	٩٠ (%٠)	٨٠(%١١/١)	(%٣١/١) ٦٢	٨٧ (%٣/٣)
۳۱	٧٥ (%١٦/٧)	٩٠ (%٠)	٩٠ (%٠)	٨٥(%٥/٥)	٩٠(%٠)	٨٦ (%٤/٤)

شاهد	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰	۹۰

همان طور که در جدول ۱۵ مشاهده می شود از بین عصاره های اتانولی استخراج شده از پنج نمونه بریوفیت (کد های ۲۷ تا ۳۱)، عصاره نمونه های ۲۷ و ۲۸ دارای تاثیر ضد قارچی روی تمام شش قارچ مورد آزمایش داشتند، اما بیشترین تاثیر را عصاره نمونه شماره ۲۸ روی *Rhizoctonia solani* نشان داد. ضمنا در جدول مذکور، درصد کاهش رشد هر قارچ توسط گونه های مختلف هر یك از نمونه های بریوفیت در کنار اندازه قطر کلنی مربوطه نیز ارایه گردیده است. در این آزمایش نیز هیچیك از عصاره ها در غلظت آزمایش شده تاثیر کشنده روی قارچ های مورد آزمایش نداشتند و تنها موجب کاهش رشد آنها شدند.

بحث

مطالعه تاثیر ضد قارچی بریوفیت ها و این که این گیاهان تا چه حد قادرند از رشد قارچ ها جلوگیری به عمل آورند، تا کنون در بعضی کشور های جهان انجام گرفته ولی بیشتر آنها در مورد تاثیر این گیاهان روی قارچ های بیماریزای پزشکی بوده است Madsen & Pates 1952, (Walkington 1966, Gunnison & Alexander 1975 and Glime & Saxena Mc Cleary &) 1991 و تحقیقات کمتری درباره نقش بریوفیت ها روی قارچ های بیماریزای گیاهی صورت گرفته است(Pryce 1972, Banerjee & Sen 1979 etc.). در بررسی های انجام شده توسط پرایس (۱۹۷۲) و بانرجی و سن (۱۹۷۹)، برخی قارچ های بیماریزای گیاهی نظیر: *Alternaria, Aspergillus, Botrytis, Curvularia, Helminthosporium, Septoria, Pyricularia* و *Uromyces* جهت انجام این مطالعات در نظر گرفته شد که نتایج آن مورد توجه دانشمندان ذیربط قرار گرفت. در بررسی حاضر، علاوه بر انتخاب یك گونه قارچ بیماریزا از جنس آلترناریا (*A. alternata*)، گونه های دیگری از قارچ های بیماریزای گیاهی و متداول در ایران مانند: *Pythium, Macrophomina, Fusarium* و *Rhizoctonia* در نظر گرفته شد که نتایج به دست آمده جالب و قابل تامل می باشد. بانرجی و سن (۱۹۷۹) در مقاله خود اظهار داشتند که دو گونه جگرواش برگدار (leafy liverworths) به اسامی: *Pellia epiphylla* و *Dumortiera hirsuta* هیچ تاثیری روی قارچ های تحت بررسی‌شان نداشتند. این در حالی است

که دو گونه مذکور پس از جمع‌آوری از ایران و بررسی مجدد توسط نگارندگان، نظر آنها را در مورداین دو گونه یعنی *P. epiphylla* (رجوع شود به اشکال ۳ تا ۴ و جداول ۳ تا ۶، کد ۴) و همین طور *D. hirsuta* (اشکال ۵ تا ۶ و جدول ۱۳، کد ۲۲) تایید نمی نماید. این در حالی است که به ترتیبعصاره های اتانولی (به مقدار دو میلی لیتر) گونه نخست بیشترین تاثیر بازدارندگی را از بین چهار قارچ *A. alternata, F. solani, M. phaseolina, Rh. solani* روی رشد کلنی *R. solani* و گونه دوم(به مقدار دو و چهار میلی لیتر) روی هر دو قارچ *F. solani* و *Pythium* sp. نشان داد. لذا همان طور که ملاحظه می شود، با مقایسه دو بررسی فوق الذکر، نتایج کاملا متفاوتی به دست آمد. بنابراین،می شود نتیجه گیری نمود که نتایج حاصله می تواند به عواملی نظیر محل جمع‌آوری نمونه های بریوفیت(در ارتباط با ترکیبات بیوشیمیایی و آلی جذب شده از محل رویش یعنی خاك، آب و هوا)، از گونه‌ایبه گونه دیگر و حتی به فاکتور هایی همچون نوع قارچ مورد آزمایش (اعم از گیاهی یا غیر گیاهی بودن و یا گونه در نظر گرفته شده)، غلظت عصاره، نوع حلال و غیره مربوط باشد، چرا که آزمایش ها نشان دادند همواره با افزایش مقدار عصاره، میزان تاثیرپذیری نیز افزایش می یافت (جدول ۱۳). ولترز (Wolters 1964) نیز دو گونه از جگرواش های برگدار را به اسامی: *Pellia epiphylla* و *Diplophyllum albicans* مورد آزمایش قرار داد که نتایج به دست آوده در مورد گونه اول با نتایج بررسی ما همسو بود.

همان طور که در جدول ۱۵ ملاحظه می شود، در آخرین آزمایش انجام شده (آزمایش شماره ۶)، درکنار اندازه قطر کلنی تمام شش گونه قارچ در نظر گرفته شده، مقدار درصد کاهش رشد هر یك از قارچ ها نیز نشان داده شده است. از بین عصاره های اتانولی استخراج شده از پنج گونه بریوفیت (کد های ۲۷ تا ۳۱)، عصاره نمونه های ۲۷ و ۲۸ دارای تاثیر ضد قارچی روی تمام قارچ های مورد آزمایش بودند در حالی که بیشترین تاثیر را عصاره نمونه شماره ۲۸ (*Drepanocladus aduncus*) روی *R. solani* نشان داد. لذا همان طور که اشاره گردید، این قارچ نیز مانند *A. alternata* توسط گونه های بریوفیتی که قبلا ذکر گردید قابل کنترل بودند.

میرزایی (۱۳۷۸) در تحقیقات مقدماتی که طی رساله دکتری خود انجام داد، تاثیرات ضد میکروبی برخی خزه ها را روی گونه هایی از قارچ ها و باکتری ها مورد بررسی قرار داد. وی تاثیر خزه هایی را که قائم (acrocarps) و خزنده یا خوابیده (pleurocarps) بودند و همین طور بخش های گامتوفیتی و اسپوروفیتی هر یك را به طور جداگانه مورد پژوهش قرار داد و از هر کدام نتایج متفاوتی به دست آورد.به اعتقاد او، ساختار مرفولوژیکی خزه ها در مقدار مؤثر بودن یا نبودنشان دخالت مستقیم دارد. وی همچنین ابراز نموده است که این گیاهان قدرت عمل را در مرحله اسپوروفیتی به طور شدیدتری نشان داده و علت آنرا هم به خاطر حضور پلیمر های متصل به دیواره سلولی دانسته است.

اما در مورد استفاده و تهیه عصاره های مختلف بریوفیت ها، بحث های مختلفی مطرح است. پودر خشك و استریل بریوفیت ها به عنوان ماده ضد قارچی مؤثر نبوده و احتمال می رود که مواد ویژه‌ای به صورت ترکیب و پیوند با مواد دیگر در حالت خشك قدرت لازم را جهت نفوذ و انتشار در محیط کشت و اثر بر قارچ ها نداشته باشد. لذا باید از روش هایی مثل دیسك گذاری استفاده نمود. بنابراین، باید عصاره های مختلفی از این گیاهان تهیه شود. در آزمایش های اولیه انجام شده در این طرح، عصاره های مختلف از حلال هایی نظیر آنچه بانرجی و سن (Banerjee & Sen 1979) توصیه نموده‌اند از قبیل: آب (خام و جوشانده)، متانول، اتانول، استون، اتر نفت و یا حتی کلروفرم (خام و جوشانده) استفاده گردید، لیکن در مجموع بهترین نتیجه از عصاره های اتانولی به دست آمد. عصاره آبی خام اثرات ضد قارچی مطلوبی را از خود نشان نداد، حال آن که با جوشاندن عصاره های آبی (به مدت سه ساعت)، آثار بازدارندگی آشکار می شد. این تاثیرات احتمالا به حضور لیگنان ها در این گیاهان بر می گردد که پلیمر هایی کوتاه و قابل استخراج با آب هستند. عملکرد لیگنان ها در بریوفیت ها مشابه گیاهان عالی از نوع انتی اکسیدان قارچ کش، باکتری کش و ضد ویروس است (Lewis & Dawin 1994). اتر نفت نیز به نظر نمی رسد که حلال مناسبی جهت استخراج مواد ضد قارچی باشد. با وجودی که این حلال به طور صنعتی در مقادیر زیاد مصرف می شود، احتمالا عدم خلوص آن عاملی برای حلالیت نامناسبش به شمار می رود. عصاره متانولی به دلیل

قطبی بودنش که پرداختن به جزییات آن در حیطه این بحث نمی باشد نیز نمی تواند مواد مؤثره را در بریوفیت ها جدا سازد، لذا از به کار بردن این حلال نیز بعدا اجتناب شد. بنابراین، به نظر می رسد که حلال های غیر قطبی اثرات بهتری داشته باشند. عصاره های استونی و کلروفرمی (خام و جوشانده) توسط مدسن و پتس (Madsen & Pates 1952) و مك‌کلری و واکینگتون (Mc Cleary & Walkington 1966) آزمایش شد که تا حدودی از موفقیت بیشتری برخوردار بود ولی طی بررسی هایی که توسط آنها صورت گرفت، علیرغم تاثیر عصاره خام کلروفرمی بر قارچ *F. solani*، عصاره جوشانده آن قابلیت بازدارندگی رشد بر قارچ یاد شده را از دست داد. همسو با پژوهش های انجام شده توسط بانرجی و سن (۱۹۷۹)، در بعضی مواقع عصاره های حلال های آلی (بسته به pH حلال)، نتایج بهتری را نسبت بهعصاره های آبی نشان می دهند. از بین مواد مؤثره‌ای که به سختی در آب حل شده ولی در حلال های آلی قابل حل می باشند و احتمالا قادرند اثرات زیستی داشته باشند، می توان رنگدانه ها را نام برد چون بیشتر آنها به دیواره های سلولی متصل بوده و به سختی در آب حل می شوند. این در حالی است که به اعتقاد موس (Mues 1988)، استون و کلرفرم حلال هایی مناسب برای رنگدانه ها می باشند. مطالعات مرفولوژیکی می تواند حضور مواد رنگی را در بخش های تار و هاگدان در اسپوروفیت بریوفیت ها به روشنی آشکار و اثبات نماید.

طبق نتایج به دست آمده، غلظت مؤثر در گونه هایی که در این تحقیق از آنها استفاده شد برای قارچ های مورد مطالعه در خصوص عصاره های مختلف، کم و بیش یکسان بود، اما تعیین غلظت کاربردی و مقایسه آنها با قدرت انتی بیوتیك ها و یا قارچ کش های متداول نیاز به بررسی های بیشتر دارد. از سوی دیگر، تحقیقات کاربردی که بتواند مشخص کند قابلیت انحلال مواد مؤثره توسط این گیاهان در محیط به صورت اسپری و یا قرص هایی مانند کپسول های کود شیمیایی که در پای ریشه گیاهان با آب آبیاری به زمین برده شده و به علاوه توان جذب ریشه در جهت ارتقاء میزان مواد مؤثره، هنوز جای بحث و تحقیق دارد. در این راستا، سؤالاتی نیز به شرح زیر ممکن است مطرح شود: آیا با تغییر شرایط طبیعی رشد بریوفیت ها و کمبود رطوبت، این گیاهان می توانند ترکیباتی تولید کنند که باعث افزایش خواص ضد میکروبیشان

شود و آیا کشت این گیاهان و یا با دستکاری ژنتیکی به خاطر رسیدن به نمونه های مقاوم به خشکی جهت کمك به پوشش درختانی که در مناطق خشك می رویند امکان پذیر است؟ از آنجا که تنه درختان بویژه در جنگل های مناطق شمالی ایران اغلب از خزه ها پوشیده شده، آیا این گیاهان در جذب رطوبت محیط و کمك به درختان تنومند جنگل نقش دارند؟ چراکه مشاهدهمی شود درختانی که از خزه پوشیده شده‌اند، کمتر مورد حمله قارچ ها قرار می گیرند. طرح این قبیل سؤالات و پاسخ به آنها، قاعدتا تحقیقات بوم شناختی وسیعی را می طلبد و می تواند در حل مشکل خطر نابودی درختان جنگلی نیز مؤثر باشد. در مورد گیاهان آپارتمانی نیز این سؤال ممکن است مطرح شود که آیا خزه هایی که در گلدان های آپارتمانی جهت جذب آب و یا مرطوب نگاه داشتن دایمی خاك از آنها استفاده می شود در حفظ گیاه از حملات احتمالی میکروارگانیسم ها دخالت دارد یا خیر؟ و بالاخره آیا حضور این خزه ها و جذب آب و املاحشان از محیط اطراف بر رشد آن گیاهان مؤثر نمی باشد؟ شاید این تاثیرات از طریق ایجاد گروه های فعال در بنیان های شیمیایی بر ساختار غشایی میکروارگانیسم ها اثر گذارد.

در پایان، ذکر این نکته نیز لازم به توضیح است که چون پژوهش انجام شده در این طرح جهت

پی بردن به فعالیت های ضد قارچی بریوفیت ها صرفا به صورت یك بررسی مقدماتی بوده است، لذا در این مقطع امکان تجزیه و تحلیل دقیق داده ها جهت محاسبات آماری وجود نداشت. چنانچه بررسی های بیشتر با اجرای این قبیل طرح ها پس از دستیابی به اطلاعات تکمیلی روی گونه های متنوع تر از این گیاهان و تاثیر یکایك آنها روی دیگر قارچ های بیماریزای گیاهی (که در این طرح امکان انجام تمام آنها مقدور نبود) میسر گردد، می توان با شناخت بهتری نتایج را به کمك روش های مختلف آماری محاسبه و ارایه نمود.

پیشنهادات

۱- در مراحل اولیه اجرای این طرح، آزمایش هایی روی چندین حلال متفاوت (رجوع شود به مواد و روش ها- بند ۳) صورت گرفت که در مراحل بعد با در نظر گرفتن فاکتور های مختلف به طور کلی، برخی از این حلال ها نتیجه مطلوب را نشان ندادند. بنابراین، در آزمایش های بعدی فقط از عصاره اتانولی بریوفیت ها استفاده گردید که با این کار، کنترل قارچ ها به طرز چشمگیری افزایش یافت. لذا توصیه می شود، جهت عصاره گیری ها با درنظر گرفتن تجاربی که از اجرای این طرح به دست آمد و نیز مقرون به صرفه بودن آن نسبت به بعضی از حلال ها، سعی شود از عصاره های اتانولی بیشتر از سایر حلال ها استفاده شود.

۲- این طرح که اطلاعات مقدماتی مفیدی را از گونه های مختلف بریوفیت ها در ارتباط با اثرات بازدارندگی هر یك از گونه های مورد نظر که در اینجا به اثبات رسید در اختیار علاقه مندان قرارمی دهد، با این هدف انجام گردید تا با ادامه و انجام طرح هایی در این زمینه بتوان به مواد مؤثره موجود در گونه های خاصی از این گیاهان که قادرند رشد قارچ های بیماریزای گیاهی را کنترل نمایند پی برد. لذا پیشنهاد می شود تا در آینده، ادامه این تحقیقات توسط گونه های متنوعی از این گیاهان و روی تعداد دیگری از قارچ های بیماریزای گیاهی انجام گردد.

۳- از آنجا که طرح حاضر موفق به شناسایی و معرفی تعدادی از گونه های بریوفیت که توانستند رشدقارچ ها را کنترل نمایند گردید، لذا توصیه می گردد که گونه های معرفی شده در این طرح به تولید انبوه برسد تا با انجام این کار بتوان به اهداف کاربردی و اقتصادی این گیاهان نایل آمد. خوشبختانه تولید انبوه بریوفیت ها چه در طبیعت و چه در یك سایت محدود با رعایت خواهش های اکولوژیك با صرف هزینه‌ای کم امکان پذیر و قابل توجیه خواهد بود.

۴- پودر استریل (سترون) نشده بریوفیت ها سبب بروز انواع آلودگی ها در محیط کشت می گردد. لذا توصیه می شود، شرایط استریل بودن تمام مواد و وسایلی که در طول آزمایش ها از آنها استفاده می شود رعایت شده و انجام همه آزمایش ها زیر هود صورت پذیرد. در این حال، استفاده از حرارت های بالا نیز احتمال تجزیه و بی‌اثر شدن عصاره ها را به دنبال دارد که باید از بروز این مسئله نیز با ظرافت خاصی جلوگیری به عمل آید.

فهرست منابع

فارسی:

۱- میرزایی، م. ۱۳۷۸. بررسی ویژگی های ریخت شناسی، ساختاری و تکوینی برخی خزه های ایران و اثرات ضد میکروبی آنها. رساله دوره دکترای زیست شناسی گیاهی. دانشکده علوم دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات. تهران: ۱۹۰ صفحه.

غیر فارسی:

2. Banerjee, R.D. and P. Sen. 1979. Antibiotic activity of bryophytes. The Bryologist 82 (2): 141-153.

3. Borel, C.; D.H. Welti; I. Fernandez, and M. Colmenares. 1993. Dicranin, an antimicrobial and 15-Lipoxygenase inhibitor from the moss *Dicranum scoparium*. J. Nat. Pr. 56 (7): 1071-1077.

4. Crum H.A. and L.E. Anderson. 1981. Mosses of eastern- north America. 1328 pp. (2 vols.) Colombia Univ. Press, New York.

5. Frahm, J.P. 2004. Recent development of commercial products from bryophytes. The Bryologist 107 (3): 277-283.

6. Glime, J.M. and D. Saxena. 1991. Uses of bryophytes, today and tomorrows. New Delhi.

7. Gunnison, D. and M. Alexander. 1975. Resistance and susceptibility to decomposition by natural microbial communities. Limnology and Oceanography 20: 64-70.

8. Herout, V. 1975. Recent results in the study of the chemistry of terpenoides. Herba Hung 14: 108-122.

9. Huneck, S. 1969. Constituents of mosses, a review. J. Hattori Bot. Lab. 32: 1-15 (in German).

10. Huneck, S. and K. Schreiber. 1975. Contents of mosses XVII. On the contents of additional hepatics. J. Hattori Bot. Lab. 39: 215-234.

11. Lewis, N.G. and L.B. Dawin. 1994. Evolution of lignan and neolignan biochemical pathways. Am. Chem. Soc. Symp., series 562: 202-246.

12. Lorimer, S.D. and N.B. Perry. 1994. Antifungal hydroxyacetophenones from the New Zealand Liverwort, *Plagiochila fasciculata*, Planta Medica 60 (4): 386-387.

13. Lorimer, S.D.; N.B. Perry and R.S. Tangney. 1993. An antifungal bibenzyl from the New Zealand liverwort, *Plagiochila stephensoniana*. Bioactivity directed-isolation, synthesis and analysis. J. Nat. Prod. 56: 1444-1450.
14. Madsen, G.C. and A.L. Pates. 1952. Occurrence of antimicrobial substances in chlorophyllose plants growing in Florida. Bot. Gaz. 113: 293-300.
15. Mc Cleary, J.A. and D.L. Walkington. 1966. Mosses and antibiosis. Rev. Bryol. et Lichénol 24: 309-314.
16. Mc Cleary, J.A.; P.S. Sypherd and D.L. Walkington. 1960. Mosses as possible sources of antibiotics. Science 131: 108.
17. Mc Clure, W. and H.A. Miller. 1967. Moss chemotaxonomy: A survey for flavonoids and the taxonomic implications. Nova Hedwigia 14: 111-125.
18. Mekuria, T.; P. Blaeser; U. Steiner and J.P. Frahm. 1998. Effect of moss extracts against phytopathogenic fungi. *In*: W. Laux (ed.), 51. Deutsche Pflanzenschutz Tagung, 5-8, Oktober 1998. Halle/Saale, Mitt. BBA 356: 167-168.
19. Mues, R. 1988. Thin-layer chromatography (T.L.C.) of flavonoid compound from bryophytes. *In*: Methods in Bryology, 147-156.
20. Pryce, R.J. 1972. Phytochemistry 10: 267, 11: 872, 1355, 1759.
21. Smith, A.J.E. 1978a. Cytogenetics, biosystematics and evolution in the bryophyta. Advances in Botanical Research 6: 195-276.
22. Smith, A.J.E. 1978b. The moss flora of Britain and Ireland. Cambridge. 706 pp. Cambridge Univ. Press. London, New York & Melborne.
23. Tadesse, M. 2002. Characterisation and mode of action of natural plant products against leaf fungal pathogens. Shaker, Aachen.
24. Tutscheck, R. and H. Rudolph. 1971. Isolation of crystalline phenols from the cell wall of *Sphagnum magellanicum*. Ber. Deut. Bot. Ges. 84: 309-311 (in German).
25. Wolters, B. 1964. Die Verbreitung antifungaler eigenschaften bei moosen. Planta 62: 88-96.

****

STUDY OF ANTIFUNGAL ACTIVITIES OF BRYOPHYTES (MOSSES & LIVERWORTS)

S. SHIRZADIAN and H. AFSHARI AZAD
Departments of Botany and Plant Diseases Research, Plant Pests & Diseases Research Institute, Tehran, Iran

Abstract

Based on the results of studies made so far on the antimicrobial substances present in the bryophytes, it is proved that, these plants can control some plant diseases caused by fungi and bacteria. Since these natural substances often do not show any adverse effect on both human and animals, therefore, they may be considered as substitutes for the common synthetic plant pesticides. In order to evaluate the antifungal activities of these plants, 23 bryophyte taxa (21 mosses and two leafy liverworts) were collected, washed, dry-powdered and then extracted in different solvents such as water, methanol, ethanol, acetone and petroleum ether. These extracts were mixed with Czapek-Dox (CzA) medium at the ratio of 1:10, and seven different pathogenic fungal species, namely, *Alternaria alternata*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Macrophomina phaseolina, Rhizoctonia solani, Verticillium dahliae* and *Pythium* sp. were then grown on these mixtures. Controls were kept free of the plant extracts. Among the collected and studied bryophytes, the broadest spectrum of antifungal activity were shown by the ethanolic extracts of six moss species, namely, *Philonotis marchica, Grimmia pulvinata, Plagiomnium rugicum, Haplocladium* sp.*, Bryum pallens* and *Drepanocladus aduncus* followed by a leafy liverwort (hepatic) called *Pellia epiphylla*. It was also concluded that, ethanol was the most efficient among other experimental solvents.