Archive of SID

دو فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات حمایت و حفاظت جنگلها و مراتع ایران
جلد ۱۰ شمارهٔ ۲، صفحهٔ ۸۲-۶۹، (۱۳۹۱)

بررسی اثر عصاره‌ی گال‌های بلوط ایرانی بر رشد تعدادی از باکتریهای بیماری‌زای گیاهان در شرایط آزمایشگاهی

شیوا صفرپور کپورچالی[1*]، علی علیزاده علی‌آبادی[2]، ابوالقاسم قاسمی[2] و سید ابراهیم صادقی[3]

۱*- نویسنده مسؤول، دانشجوی کارشناسی‌ارشد بیماری‌شناسی گیاهی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا
پست‌الکترونیک: shiva.safarpour99@gmail.com
۲- استادیار پژوهش، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور
۲- مربی پژوهش، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور
۳- استاد پژوهش، مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور

تاریخ دریافت: ۹۱/۵/۲۱ تاریخ پذیرش:۹۱/۱۱/۱۰

چکیده

در این تحقیق اثر غلظت‌های مختلف عصاره‌های آبی، استونی و متانولی گال‌های زنبور *Aphelonix persica* روی درختان بلوط ایرانی که از جنگل‌های زاگرس جمع‌آوری، خشک و آسیاب شده بودند، بر روی رشد باکتریهای *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* عامل بیماری سوختگی معمولی لوبیا، *Erwinia. amylovora* عامل بیماری آتشک سیب و گلابی، *Agrobacterium tumefaciens* عامل بیماری گال مو و *Psuedomonas syringae* pv. *tabaci* عامل بیماری آتشک توتون مورد بررسی قرار گرفت. خواص ضد باکتریایی عصاره‌ها با اندازه‌گیری قطر هاله‌ی بازدارندگی در غلظت‌های مختلف ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم از عصاره در میلی‌لیتر حلال از دو روش نشت در آگار و دیسک‌های کاغذ صافی مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج نشان‌داد اندازه‌ی قطر هاله‌ی بازدارندگی در بیشتر موارد با میزان غلظت عصاره‌ها نسبت مستقیم دارد. براساس میزان بازدارندگی، باکتریهای *E. amylovora* و *A. tumefaciens* دارای کمترین و باکتریهای *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* و *Psuedomonas syringae* pv. *tabaci* دارای بیشترین بازدارندگی در برابر غلظت‌های مختلف عصاره‌ها اعم از آبی، استونی و متانولی بودند.

واژه‌های کلیدی: گال بلوط، اثر ضد باکتریایی عصاره و کنترل بیولوژیک

مقدمه

گال‌های گیاهی در واقع ناهنجاری یا برجستگی‌هایی هستند که از رشد غیرطبیعی بافت‌های گیاهی در اثر فعالیت پارازیت‌های گیاهی یا جانوری ایجاد می‌شوند. زنبورهای خانواده Cynipidae گروهی از مهمترین حشرات گال‌زا هستند که در جوامع جنگلی بلوط فعالیت می‌کنند. این حشرات روی گونه‌های مختلف بلوط فعالیت و گال‌های متنوع و زیادی روی آن ایجاد می‌کنند. تاکنون ۷۸ نوع گال ناشی از زنبورهای گال‌زای این خانواده از

۱- مقاله‌ی فوق بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد نگارنده اول با عنوان "ارزیابی خواص ضدباکتریایی عصاره‌ی گال‌های تولید شده توسط زنبور *Aphelonix persica* روی بلوط ایرانی *Quercus persica* "در دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

روی گونه‌های مختلف بلوط در ایران جداسازی و شناسایی شده‌است (صادقی و همکاران، ۱۳۸۸). خاصیت آنتی‌بیوتیک عصاره‌ی این گال‌ها که حاوی ترکیباتی مانند تانن، اسید گالیک آزاد و الاگیک اسید و برخی مواد دیگر می‌باشد، ما را بر آن داشت تا تأثیر عصاره‌ی تعدادی از گال‌های درختان بلوط ایرانی *Quercus persica* که طی سال‌های ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ از جنگل‌های زاگرس جمع‌آوری شده‌بودند را روی چند باکتری بیماری‌زای گیاهی در محیط آزمایشگاه مورد بررسی قرار دهیم.

فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ی گال‌های *Q. infectoria* در برابر دامنه‌ی زیادی از باکتریهای بیماری‌زا مانند *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococus aureus* ATCC 25923 و *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ارزیابی‌شد. اثرات ضد میکروبی عصاره‌ی گال *Q. infectoria* به‌وسیله‌ی حلال‌های قطبی مختلف آزمایش و اثرات آن با روش نشت در آگار بررسی گردید. نتایج نشان داد که اثرات ضد باکتریایی عصاره‌ی متانولی نسبت به سایر عصاره‌ها بالاتر بود. همچنین اثرات عصاره‌های آبی و اتانولی در برابر موجودات تست شده نسبت به عصاره‌های هگزان و کلروفورم قویتر بود (Satirapathkul *et al.*, 2011).

در این بررسی اثر این عصاره‌ها بر روی باکتریهای *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* و *Erwinia amylovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Psuedomonas syringae* pv. *tabaci* آزمایش شد. که در زیر به معرفی مختصری از هر یک پرداخته شده‌است.

باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* عامل بیماری سوختگی معمولی لوبیا، یکی از عوامل محدود کننده تولید لوبیا در سراسر جهان است (Gilbertson & Maxwell, 1992). تهیه بذرهای سالم و متحمل به بیماری و شناسایی عوامل بیولوژیک در کنترل بیماری مؤثر می‌باشد (دری و همکاران، ۱۳۸۲).

اولین گزارش بیماری آتشک سیب و گلابی با عامل *Erwinia amylovora*، ۲۰۰ سال پیش از منطقه نیویورک، ایالت متحده آمریکا بوده است؛ در ایران این بیماری اولین بار سال ۱۳٦۸ در منطقه برغان کرج مشاهده شد. بهترین راه برای کنترل بیماری آتشک راهکارهای تلفیقی است که شامل عملیات باغبانی، تلاش برای کاهش میزان اینوکلوم اولیه در باغ و سم‌پاشی در زمان مناسب با باکتری‌کش‌ها برای پیشگیری از بیماری در زمانی که شرایط برای ایجاد بیماری مهیاست (حسن‌زاده، ۱۳۸۱).

باکتری *A. tumefaciens* عامل بیماری باکتریایی گال طوقه (Crown gall) که یک باکتری خاک‌زاد است، می‌باشد. اولین گزارش این بیماری مربوط به سال ۱۸۵۳ از تاکستان‌های فرانسه می‌باشد. البته بتدریج مطالعات در مناطق مختلف روی بیماری بیشتر شد و گونه‌های دیگر بررسی و شناسایی شدند (محمودزاده و همکاران، ۱۳۸۵).

بیماری آتشک توتون *P. s.* pv. *tabaci* اولین بار در سال ۱۹۱۷ از آمریکا گزارش شد و هم اکنون انتشار جهانی دارد، در ایران اولین‌بار در سال ۱۳٤۷ از برگ‌های توتون رضوانشهر گیلان گزارش گردید. این باکتری می‌تواند به گیاهان دیگر نیز حمله کند، اما خسارت آن روی توتون و سویا حائز اهمیت است. عامل بیماری در بقایای گیاه، در خاک، در برگ‌های بیمار، بر روی بذرهای حاصل از کپسول‌های آلوده، روی پوشش سطح خزانه و در ریشه‌های بسیاری از عفونت‌های هرز زمستان‌گذرانی می‌کند. برای بروز آلودگی‌ها و پیدایش اپیدمی‌ها رطوبت بسیار بالا یا لایه‌ای از آب بر روی گیاه ضروریست (الهی‌نیا، ۱۳۸۹).

www.SID.ir

Archive of SID

مواد و روش‌ها

۱- **باکتری‌های مورد بررسی**: مشخصات باکتری‌های مورد بررسی در این تحقیق که از آزمایشگاه مؤسسه تحقیقات گیاهپزشکی کشور دریافت شد در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱- نام علمی باکتری‌های مورد مطالعه، به‌همراه نام بیماری ناشی از آن

نام بیماری	نام علمی باکتری
سوختگی باکتریایی معمولی لوبیا	*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*
آتشک سیب و گلابی	*Erwinia amylovora*
گال مو	*Agrobacterium tumefacience*
آتشک توتون	*Psuedomonas syringae* pv. *Tabaci*

۲- جمع‌آوری گال‌ها

گال‌ها از روی درختان بلوط ایرانی *Quercus persica* طی سالهای ۱۳۸۸ و ۱۳۸۹ از جنگل‌های زاگرس از نواحی یاسوج (سروک)، دنا (سی سخت)، شلالدون (گردنه‌ی شلالدون) و میمند (ده شیخ و دلی بهرام بیگی) جمع‌آوری شدند.

۳- عصاره‌گیری از گال‌ها با استفاده از متانول، استون و آب

ابتدا گال‌های جمع‌آوری شده در آزمایشگاه خشک و بعد آسیاب شدند. آنگاه برای به‌دست آوردن عصاره محلول در استون و الکل گال‌ها، طبق روش (Basri & Fan, 2005)، مقدار ۱۰۰ گرم از گال‌های آسیاب شده به‌مدت ۲٤ ساعت درون ۵۰۰ میلی لیتر استون یا الکل خیسانده و به مدت ۲۰ دقیقه با دستگاه سونیکاتور بهم زده شدند. سپس محلول به‌دست آمده فیلتر شد. عصاره‌های فیلتر شده توسط دستگاه تقطیر تغلیظ و خشک شدند. به‌منظور استخراج عصاره محلول در آب طبق روش (Basri and Fan, 2005)، گال‌های پودر شده و خرد شده به‌مدت ۲٤ ساعت در دمای ٤۵ درجه سانتی‌گراد درون آب مقطر استریل نگه‌داری و بعد در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد با ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس محلول رویی از فیلتر رد و خشک گردید.

٤-اندازه‌گیری قطر هاله‌ی بازدارنده با استفاده از روش نشت در آگار[1]

٤-۱- تهیه‌ی سوسپانسیونی غلیظ از باکتری‌ها

در این روش ابتدا سوسپانسیونی غلیظ (CFU/ml 10^9) از کشت ۲٤ ساعته‌ی هریک از باکتری‌ها تهیه و به‌صورت یکنواخت در سطح محیط کشت آگار غذایی (Nutrient Agar) در داخل تشتک پتری پخش شد و بعد به‌وسیله چوب پنبه سوراخ‌کن حفره‌هایی به قطر ۵ میلی‌متر در محیط کشت آگار غذایی ایجاد شد.

٤-۲- تهیه‌ی رقت‌های مختلف از عصاره‌ها و ریختن آنها در چاهک‌ها

ابتدا رقت‌های۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حلال از هر یک از عصاره‌ها تهیه و بعد مقدار۲۰ میکرولیتر از هر یک در چاهک‌های ایجاد شده ریخته شد. آنگاه برای هر رقت ۳ تکرار در نظر گرفته‌شد. از آب مقطر و حلال‌های استون و متانول به‌عنوان شاهد استفاده شد. سپس تشتک‌های پتری به مدت ۲٤ ساعت در انکوباتور نگه‌داری شد و پس از این مدت قطر هاله‌ی بازدارنده‌ی تشکیل‌شده اندازه‌گیری شد.

1. Agar well diffusion assay

www.SID.ir

Archive of SID

۵-اندازه‌گیری قطر هاله‌ی بازدارنده با استفاده از دیسک‌های آغشته به غلظت‌های مختلف عصاره

۵-۱- تهیه‌ی سوسپانسیونی غلیظ از باکتری‌ها و پخش آن بر روی محیط کشت طبق بند ٤-۱.

۵-۲- تهیه‌ی دیسک‌های آغشته به عصاره‌ها و قرار دادن در سطح محیط‌های کشت حاوی باکتری: رقت‌های۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره‌ها تهیه و دیسک‌های کوچک کاغذ صافی استریل به قطر ۰/۵ سانتی‌متر در درون رقت‌های مختلف عصاره گال غوطه‌ور شد و پس از خشک‌شدن در شرایط استریل، به فواصل منظم روی محیط کشتی که سوسپانسیون به صورت یکنواخت روی آن پخش شده بود، قرار داده شد. برای هر رقت ۳ تکرار در نظر گرفته شد. از دیسک‌های غوطه‌ور شده در آب مقطر، استون و متانول به‌عنوان شاهد استفاده‌شد. سپس تشتک‌های پتری به مدت ٢٤ ساعت در انکوباتور نگه‌داری گردید و پس از این مدت قطر هاله‌ی بازدارنده تشکیل شده اندازه‌گیری شد.

٦-اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی عصاره

۷-[۲]در این روش غلظت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ برای عصاره‌ها در نظر گرفته‌شد. در این مرحله از روش رقت سریالی[۳] استفاده‌شد، به این ترتیب که ابتدا سوسپانسیونی به غلظت 10^8 CFU/ml. از کشت ٢٤ ساعته‌ی هر باکتری در لوله‌های آزمایش استریل تهیه‌شد. در مرحله‌ی بعد رقت‌های ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب مقطر استریل از هریک از عصاره‌ها در لوله‌های آزمایش استریل تهیه شد. سپس ۱سی‌سی از سوسپانسیون باکتری و ۱سی‌سی از هر یک از عصاره‌ها درون لوله‌ی دیگری ریخته‌شد، پس از گذشت ۱ ساعت، حجم نهایی محلول به ۱۰ سی‌سی رسانده‌شد. در این مرحله برای هر لوله‌ی حاوی سوسپانسیون باکتری و عصاره، ۵ لوله‌ی دیگر برای تهیه‌ی رقت سریالی در نظر گرفته‌شد؛ به‌این‌صورت که ۱ سی‌سی از هر محلول را برداشته و درون لوله‌ی بعدی ریخته و حجم آن لوله با آب مقطر استریل به ۱۰ سی‌سی رسانده‌شد. یعنی محتویات لوله‌ی اول که شامل سوسپانسیون باکتری و عصاره بود، ۵ مرتبه رقیق شد. شاهد آزمایش که فقط سوسپانسیون باکتری بود نیز ۵ مرتبه رقیق شد. کمترین غلظت عصاره که هیچ‌گونه رشد باکتری در آن دیده نشد به‌عنوان حداقل غلظت بازدارنده (MIC) در نظر گرفته‌شد.

نتایج

نتایج بررسی اثرات عصاره‌ها بر کنترل باکتریهای یادشده با نرم‌افزار آماری SAS تجزیه و تحلیل گردید. که این نتایج در زیر به تفکیک شرح داده‌شده‌است.

جدول‌های تجزیه واریانس و بررسی معنی‌داری در روش نشت در آگار

X. axonopodis pv. *phaseoli*-۱

جدول۲- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف عصاره بر باکتری در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F_s
تیمارها	۱۲	٦۳۲۵	۵۲۷	٤۵٦/۸۵**
خطا	۲٦	۳۰	۱/۱	

** در سطح ۱٪ معنی‌دار است.

2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC)
3 . Serial dilution

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- مقایسهٔ میانگین قدرت بازدارندگی عصاره‌های گال از باکتری *X. axonopodis pv. phaseoli*

تیمار	میانگین	گروه‌بندی
۷	۳۷	A
۱۱	۳۵/۶	A
۱۰	۳۲	B
۶	۳۱/۶	B
۳	۲۶/۳	C
۲	۲۵/۶	C
۹	۲۲/۶	D
۵	۱۹/۶	E
۱	۱۹	E
۱۳	۱۶	F
۴	۰	G
۸	۰	G
۱۲	۰	G

جدول ۵- مقایسهٔ میانگین قدرت بازدارندگی عصاره‌های گال از باکتری *Erwinia amylovora*

تیمار	میانگین	گروه‌بندی
۱۳	۱۴	A
۲	۰	B
۳	۰	B
۴	۰	B
۱	۰	B
۶	۰	B
۷	۰	B
۸	۰	B
۹	۰	B
۱۰	۰	B
۱۱	۰	B
۱۲	۰	B
۵	۰	B

۲-*E. amylovora*

۳-*Agrobacterium tumefacience*

جدول۴- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف عصاره بر باکتری در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F_s
تیمارها	۱۲	۵۴۲/۷	۴۵/۲	ns
خطا	۲۶	۰	۰	

ns اختلاف بین تیمارها معنی‌دار نیست.

جدول ۶- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف عصاره بر باکتری در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F_s
تیمارها	۱۲	۱۶۹۵	۱۴۱	۷۰/۶**
خطا	۲۶	۵۲	۲	

** در سطح ۱٪ معنی‌دار است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۷- مقایسهٔ میانگین قدرت بازدارندگی عصاره-های گال از باکتری *A. tumefacience*

تیمار	میانگین	گروه‌بندی
۱۳	۱۷	A
۷	۱٤/۳	B
٦	۱۲/۳	BC
۱۱	۱۱/٦	C
۳	۱۱	C
٤	۰	D
۲	۰	D
۸	۰	D
۱	۰	D
۱۰	۰	D
۹	۰	D
۱۲	۰	D
۵	۰	D

جدول ۹- مقایسهٔ میانگین قدرت بازدارندگی عصاره-های گال از باکتری *Pseudomonas syringe* pv. *tabaci*

تیمار	میانگین	گروه‌بندی
۳	۲۵	A
۷	۲٤/۳	A
۱۱	۲۳	AB
۱۰	۲۱	BC
٦	۲۰/٦	BCD
۵	۲۰	CD
۲	۱۸/۳	D
۹	۱۸/۳	D
۱	۱۵	E
۱۳	۸	F
٤	۰	G
۸	۰	G
۱۲	۰	G

٤- *Pseudomonas syringe* pv. *Tabaci*

جدول۸- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف عصاره بر باکتری در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F_s
تیمارها	۱۲	۳۲۷۰	۲۷۲	۱۳٤/۵**
خطا	۲٦	۵۲	۲/۰۲	

** در سطح ۱٪ معنی‌دار است.

www.SID.ir

Archive of SID

اندازه‌ی قطر هاله‌ی بازدارندگی در روش نشت در آگار

تأثیر عصاره‌ها بر باکتری *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* عامل بیماری سوختگی معمولی لوبیا میزان بازدارندگی بالایی را نشان داد و مشخص گردید که در مقایسه با شاهد مثبت (آنتی‌بیوتیک جنتامایسین) اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در باکتری *E. amylovora* عامل بیماری آتشک سیب و گلابی هیچ کدام از عصاره‌ها با غلظت‌های مختلف نتوانستند مانع از رشد باکتری گردند. نتایج برای باکتری *A. tumefacience* عامل بیماری باکتریایی گال طوقه به طور کل نشان داد که غلظت‌های بالای عصاره-ها (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حلال) مؤثرترین غلظت‌های مورد استفاده بودند. در باکتری *Pseudomonas syringe* pv. *tabaci* عامل بیماری آتشک توتون عصاره‌ی آبی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حلال بالاترین قطر هاله‌ی بازدارندگی را ایجاد کرد. (شرح در جدول ۱۰).

شکل ۱- قطر هاله‌ی بازدارنده از رشد باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* در برابر عصاره‌ی متانولی ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حلال (سه چاهک اطراف، سه تکرار از عصاره و چاهک وسط شاهد متانول)

جدول ۱۰- قطر هاله‌ی بازدارندگی در غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در برابر رشد باکتریها در روش چاهک

قطر هاله‌ی بازدارنده در روش نشت در آگار (میلی-متر)	غلظت (میلی-گرم بر میلی-لیتر)	حلال
X. axonopodis* pv. *phaseoli		
۱۹	۱۰	ابی
۲۵/۶۶	۵۰	
۲۶/۳۳	۱۰۰	
۱۹/۶۶	۱۰	استونی
۳۱/۶۶	۵۰	
۳۷	۱۰۰	
۲۲/۶۶	۱۰	متانولی
۳۲	۵۰	
۳۵/۶۶	۱۰۰	
۱۶		جنتامایسین
E. amylovora		
۰	۱۰	ابی
۰	۵۰	
۰	۱۰۰	
۰	۱۰	استونی
۰	۵۰	
۰	۱۰۰	
۰	۱۰	متانولی
۰	۵۰	
۰	۱۰۰	
۱۴		جنتامایسین
A.tumefaciens		
۰	۱۰	ابی
۰	۵۰	
۱۱	۱۰۰	
۰	۱۰	استونی
۱۲/۳۳	۵۰	
۱۴/۳۳	۱۰۰	
۰	۱۰	متانولی
۰	۵۰	
۱۱/۶۶	۱۰۰	
۱۷		جنتامایسین
P. syringae* pv. *Tabaci		
۱۵	۱۰	ابی
۱۸/۳۳	۵۰	
۲۵	۱۰۰	
۲۰	۱۰	استونی
۲۰/۶۶	۵۰	
۲۴/۳۳	۱۰۰	
۱۸/۳۳	۱۰	متانولی
۲۱	۵۰	
۲۳	۱۰۰	
۸		جنتامایسین
۰	کنترل (آب مقطر، استون و متانول)	

www.SID.ir

Archive of SID

جدول‌های تجزیه واریانس و بررسی معنی‌داری در روش دیسک‌های آغشته به عصاره

۱- *X. axonopodis* pv. *phasoli*

جدول۱۱- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف عصاره بر باکتری در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F_s
تیمارها	۱۲	۳٤۱۳	۲۸٤/٤	۳۵۷/۸**
خطا	۲٦	۲۰	۰/۷	

** در سطح ۱٪ معنی‌دار است.

جدول ۱۲- مقایسهٔ میانگین قدرت بازدارندگی عصاره‌های گال از باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli*

تیمار	میانگین	گروه‌بندی
۳	۲۵/٦	A
۷	۲٤/٦	AB
۱۱	۲٤/٦	AB
۱۰	۲۳/٦	B
٦	۲۱/٦	C
۲	۲۱	C
۵	۱۸/٦	D
۱	۱۷/٦	DE
۹	۱۷	EF
۱۳	۱٦	F
٤	۰	G
۸	۰	G
۱۲	۰	G

۲- *E. amylovora*

جدول۱۳- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف عصاره بر باکتری در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F_s
تیمارها	۱۲	۵٤۲/۷	٤۵/۲	ns
خطا	۲٦	۰	۰	

ns اختلاف بین تیمارها معنی‌دار نیست.

جدول ۱٤- مقایسهٔ میانگین قدرت بازدارندگی عصاره‌های گال از باکتری *Erwinia amylovora*

تیمار	میانگین	گروه‌بندی
۱۳	۱٤	A
۲	۰	B
۳	۰	B
٤	۰	B
۱	۰	B
٦	۰	B
۷	۰	B
۸	۰	B
۹	۰	B
۱۰	۰	B
۱۱	۰	B
۱۲	۰	B
۵	۰	B

۳- *Agrobacterium tumefacience*

جدول۱۵- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف عصاره بر باکتری در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F_s
تیمارها	۱۲	۱۰۳۳	۸٦/۱	٤۲۰/۰۲**
خطا	۲٦	۵/۳	۰/۲	

** در سطح ۱٪ معنی‌دار است.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱۶- مقایسهٔ میانگین قدرت بازدارندگی عصاره‌های گال از باکتری *Agrobacterium tumefacience*

تیمار	میانگین	گروه‌بندی
۱۳	۱۷	A
۱۱	۸/۶	B
۱۰	۸/۳	B
٤	۰	C
۱	۰	C
٦	۰	C
۷	۰	C
۸	۰	C
۹	۰	C
۲	۰	C
۳	۰	C
۱۲	۰	C
۵	۰	C

٤- *Psudomonas syringae* pv. *Tabaci*

جدول۱۷- تجزیه واریانس تأثیر تیمارهای مختلف عصاره بر باکتری در قالب طرح پایه کاملاً تصادفی

منبع تغییرات	درجهٔ آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F_s
تیمارها	۱۲	۲۱۲٦	۱۷۷	۳۸٤/۰٤**
خطا	۲٦	۱۲	۰/٤	

** در سطح ۱٪ معنی‌دار است.

اندازه‌ی قطر هاله‌ی بازدارندگی با استفاده از دیسک‌های آغشته به عصاره

نتایج برای باکتری *X. axonopodis* pv. *Phasoli* عامل بیماری سوختگی معمولی لوبیا که بیشترین قطر هاله‌ی بازدارندگی آن مربوط به تیمار ۳ (عصاره‌ی آبی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حلال) بود، نشان داد که با افزایش غلظت عصاره‌ها، قطر هاله بازدارندگی از رشد باکتری نیز افزایش یافت. در باکتری *E. amylovora* عامل بیماری آتشک سیب و گلابی هیچ کدام از عصاره‌ها با غلظت‌های مختلف نتوانستند مانع از رشد باکتری گردند. در باکتری *Agrobacterium tumefacience* عامل بیماری باکتریایی گال طوقه، تنها عصاره‌ی متانولی در بالاترین غلظت‌های خود توانست هاله‌ی بازدارندگی از رشد قابل توجهی ایجاد کند. در باکتری *Psudomonas syringae* pv. *tabaci* عامل بیماری آتشک توتون بالاترین غلظت‌ها (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حلال)، مؤثرترین غلظت‌های کنترلی بودند (شرح در جدول ۱۹).

جدول۱۸- مقایسهٔ میانگین قدرت بازدارندگی عصاره‌های گال از باکتری *P. syringae* pv. *tabaci*

تیمار	میانگین	گروه‌بندی
۳	۱۹	A
۷	۱۸	AB
۱۱	۱۷/٦	B
۲	۱۷	BC
۱۰	۱٦	C
۹	۱٤	D
٦	۱۰/۳	E
۱	۱۰/۳	E
۱۳	۸	F
٤	۰	G
۸	۰	G
۱۲	۰	G
۵	۰	G

www.SID.ir

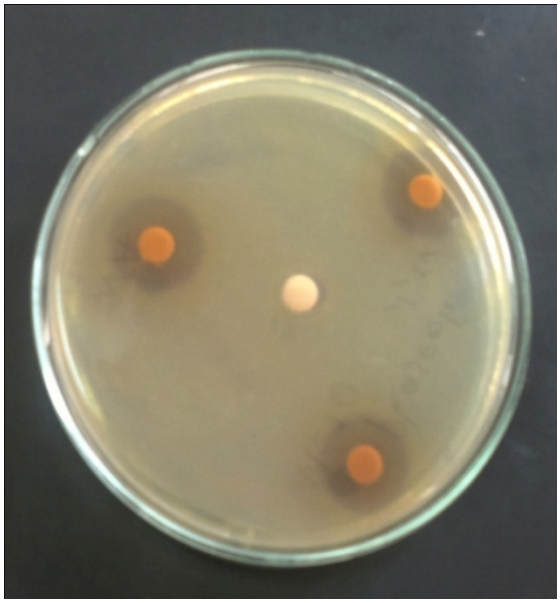
Archive of SID

جدول ۱۹- قطر هاله‌ی بازدارندگی در غلظت‌های مختلف عصاره‌ها در برابر رشد باکتریهای *X. axonopodis* pv. *phaseoli* ، *Agrobacterium tumefacience*, *Psuedomonas syringe* pv. *tabaci* و *E. amylovora* در روش دیسک کاغذ صافی

حلال	غلظت (میلی‌گرم بر میلی-لیتر)	قطر هاله‌ی بازدارنده در روش نشت در آگار (میلی‌متر)
	X. axonopodis* pv. *phaseoli	
آبی	۱۰	۱۷/۶۶
	۵۰	۲۱
	۱۰۰	۲۵/۶۶
استونی	۱۰	۱۸/۶۶
	۵۰	۲۱/۶۶
	۱۰۰	۲۴/۶۶
متانولی	۱۰	۱۷
	۵۰	۲۳/۶۶
	۱۰۰	۲۴/۶۶
جنتامایسین		۱۶
	E. amylovora	
آبی	۱۰	۰
	۵۰	۰
	۱۰۰	۰
استونی	۱۰	۰
	۵۰	۰
	۱۰۰	۰
متانولی	۱۰	۰
	۵۰	۰
	۱۰۰	۰
جنتامایسین		۱۴
	Agrobacterium tumefacience	
آبی	۱۰	۰
	۵۰	۰
	۱۰۰	۰
استونی	۱۰	۰
	۵۰	۰
	۱۰۰	۰
متانولی	۱۰	۰
	۵۰	۸/۳۳
	۱۰۰	۸/۶۶
جنتامایسین		۱۷
	Psuedomonas syringe* pv. *Tabaci	
آبی	۱۰	۱۰/۳۳
	۵۰	۱۷
	۱۰۰	۱۹
استونی	۱۰	۰
	۵۰	۱۰/۳۳
	۱۰۰	۱۸
متانولی	۱۰	۱۴
	۵۰	۱۶
	۱۰۰	۱۷/۶۶
جنتامایسین		۸
کنترل (آب مقطر، استون و متانول)		۰

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- قطر هاله‌ی بازدارنده از رشد باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* در برابر عصاره‌ی متانولی ۱۰ (سه دیسک اطراف، سه تکرار از عصاره و دیسک وسط شاهد متانول)

نتایج آزمون MIC

در باکتریهای *X. axonopodis* pv. *phaseoli* و *A. tumefaciense* عصاره‌ی آبی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر، عصاره‌های استونی و متانولی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر، حداقل غلظت‌های بازدارنده از رشد بودند. در باکتری *P. s.* pv. *tabaci* عصاره‌های آبی و استونی با غلظت ۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر و عصاره‌ی متانولی با غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر، حداقل غلظت‌های بازدارنده از رشد باکتری بودند و در باکتری *E. amylovora* در هر سه عصاره بالاترین غلظت (۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب مقطر)، حداقل غلظت بازدارنده از رشد بود (جدول ۲۰).

جدول ۲۰- اندازه‌گیری حداقل غلظت بازدارندگی عصاره‌ها از رشد باکتریهای آزمایش شده

باکتری	حلال	غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)		
		10	50	100
X. axonopodis* pv. *phaseoli	آبی	+	+	-
	استونی	-	-	-
	متانولی	-	-	-
E. amylovora	آبی	+	+	-
	استونی	+	+	-
	متانولی	+	+	-
A. tumefaciens	آبی	+	+	-
	استونی	-	-	-
	متانولی	-	-	-
P. s.* pv. *tabaci	آبی	+	-	-
	استونی	+	-	-
	متانولی	-	-	-
کنترل	آبی	+	+	+

+ : رشد باکتری ، - : عدم رشد باکتری

بحث

اهمیت استفاده از گیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها و ممانعت از رشد باکتریهای بیماری‌زا به‌خوبی شناخته‌شده و امروزه نیز اثرات ضد قارچی و ضد باکتریایی بسیاری از ترکیبات گیاهی به اثبات رسیده است. اسانس مریم نخودی روی باکتریهای *Pseudomonas aeruginosa*، *Bacillus subtilis* و مخمر *Candida albicans* (Elshazly & Hussein, 2004) عصاره اتانولی برگ تاتوره روی باکتری

www.SID.ir

Archive of SID

Xanthomonas oryze pv. *oryze* عامل بیماری لکه برگی برنج موجب کاهش رشد شده است. اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های زرشک و سیر روی *Agrobacterium tumefaciens*، عامل بیماری سرطان طوقه انگور و *Erwinia amylovora*عامل بیماری آتشک سیب و گلابی تأیید شده است (Hayes, 1946). اثر ضد باکتریایی عصاره گیاه بابونه رومی و بابونه مجارستانی روی چهار تیپ مختلف باکتری عامل شانکر مرکبات، (Csizinszky, *et al.*, 1993)، اسانس گل رز روی باکتری *X. axonopodis* subsp. *Vesicatoria* و عصاره‌ی سیر و میوه اسپند روی باکتری *P. syringae* و همچنین توان بازدارندگی از رشد قارچ *Altarnaria alternata* اثبات گردیده است (Feng *et al.*, 2007).

در اواسط قرن نوزدهم میلادی در انگلستان از برخی گال‌های بلوط که حاوی مقادیر زیادی از تانن بودند به‌عنوان دارو نیز استفاده می‌شده است؛ بنابراین می‌توان گفت، دیرزمانی است که خواص درمانی بلوط و گال‌های ایجاد شده بر روی آن آشکار شده (Muhamad & Mustafa, 1994; Kottakkal, 1995; Bhattacharjee, 2001) و نشان داده شده است که عصاره‌ی به‌دست آمده از گال‌های بلوط دارای خواص ضد باکتریایی (Hussein, *et al.*, 2000) می‌باشد. بررسی‌ها نشان می‌دهد که عمده‌ترین ماده‌ی موجود در عصاره‌ی اغلب گال‌های بلوط، تانن (به میزان ۵۰ تا ۷۰ درصد) و بعد اسید گالیک می‌باشد (Ikram & Nowshad, 1977; Evans, 1996; Wiart & Kumar, 2001). البته ایجاد مقاومت در آفات و عوامل بیماری‌زای گیاهی (ازجمله باکتری‌ها) نسبت به سموم شیمیایی و آثار سوء و زیانبار آنها در محیط زیست و بهداشت انسانی، انگیزه‌ای بسیار قوی برای روی آوردن به این گونه ترکیبات ضد میکروبی طبیعی را ایجاد نموده است.

بررسی اثر عصاره‌ی استونی استخراج شده از گال بلوط *Q. infectoria* روی تعدادی از باکتری‌ها مانند *Escherichia coli*، *Salmonella typhimurium*، *Pseudomonas aeruginosa*، *Staphylococcus aureus*، *Staphylococcus epidermidis* و *Bacillus subtilis* نشان داد که عصاره‌استونی و آبدوست به‌دست آمده از گال بلوط، مشابه تحقیق حاضر، اثر ضد باکتریایی خوبی روی باکتریهای مذکور داشته و به‌عنوان منابع مناسبی برای تهیه ترکیبات آنتی‌باکتریال مطرح هستند (Basri and Fan, 2005). در بررسی دیگری، بر خصوصیات ضدباکتریایی گال *Q. infectoria* مطالعاتی انجام‌شد که این تحقیقات نشان دادند که این گال منبع قوی از اجزای فعال زیستی مانند تانن، ویتامین A، C، کلسیم، آهن، فیبر، پروتئین و کربوهیدرات می‌باشد و دارای خواص ضدمیکروبی، ضدباکتریایی و ضدقارچی است.

در این تحقیق تأثیر عصاره‌های آبی، استونی و متانولی گال‌های *Quercus persica* با غلظت‌های مختلف ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم از عصاره در میلی‌لیتر حلال بر تعدادی از مهمترین باکتریهای بیماری‌زای گیاهی مانند *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, *E. amylovora*, *A. tumefaciens*, *P. s.* pv. *tabaci* بررسی شد. نتایج نشان داد، عصاره‌ی آبی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره در میلی‌لیتر حلال، مؤثرترین غلظت در جلوگیری از رشد بیشتر باکتریهای مورد آزمایش بوده و عصاره‌ی استونی با غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم عصاره در میلی‌لیتر حلال تنها علیه باکتری *X. axonopodis* pv. *phaseoli* در روش نشت در آگار مؤثر بوده‌است.

www.SID.ir

Archive of SID

باکتری *E. amylovora* در بین باکتریهای تست شده، مقاوم‌ترین باکتری به هر سه عصاره‌ی آبی، استونی و متانولی بود. به‌این ترتیب که هیچ‌یک از عصاره‌های فوق با غلظت‌های مختلف ۱۰، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم از عصاره در میلی‌لیتر حلال، نتوانستند مانع از رشد این باکتری شوند.

در تحقیقی فعالیت ضد باکتریایی عصاره‌های مختلف (پترولیوم اتر، کلروفورم، متانول و آب) از گال‌های *Q. infectoria* در برابر پاتوژن‌های دهانی مانند *Streptococcus mutans*، *Streptococcus salivarius*، *Streptococus sanguis*، *Lactobacillus acidophilus* و *Staphylococcus aureus*, را گزارش کردند. نتایج نشان داد که عصاره‌ی متانولی بیشترین فعالیت ضد باکتریایی را در برابر باکتریهای فوق نشان داد. حساس‌ترین باکتری *S. sanguis* و به‌دنبال آن *L. Acidophilus*، *S. salivarius*، *S. mutans*، و *S. aureus* بود (Vermani *et al.*, 2009). همچنین اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های آبی و متانولی این گال‌ها در برابر باکتری *Cellulosimicrobium cellulans* آزمایش‌شد و نتایج آن ایجاد هاله‌ی بازدارندگی قابل‌توجهی را توسط هر دو عصاره در برابر *C. cellulans* نشان‌داد. و مشخص‌گردید که فعالیت ضدباکتریایی عصاره‌ی متانولی تعامل مهم و قابل‌توجهی با درجه‌ی حرارت بر ایجاد هاله‌ی بازدارندگی دارد که بهترین دما برای بروز این خواص ضد میکروبی دمای حدود ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد می‌باشد (Muskhazli *et al.*, 2008).

نتایج تحقیقات فوق نشان داد که عصاره‌ی متانولی مؤثرترین عصاره در کنترل باکتریهای ذکر شده است، با این تفاوت که در تحقیق حاضر، عصاره‌ی استونی مؤثرترین عصاره‌ی کنترلی بوده‌است.

ضمنا آزمون حداقل غلظت بازدارنده نیز برای تمامی باکتری‌ها و با استفاده از کلیه‌ی عصاره‌ها انجام‌شد که نتایج حاصل حکایت از قدرت بالای بازدارندگی عصاره-های استونی و متانولی (در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر حلال) نسبت به حلال آبی (در غلظت ۱۰ میلی‌گرم در میلی لیتر) دارد، به‌عنوان مثال برخی از باکتری‌ها مانند *X. axonopodis* pv. *phaseoli* و *Agrobacterium tumefaciens* در غلظت ۱۰ میلی‌گرم عصاره استونی و متانولی در میلی لیتر آب مقطر قادر به رشد نبودند، درصورتی‌که حداقل غلظت عصاره‌ی آبی برای جلوگیری از رشد این باکتری‌ها ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بود.

منابع مورد استفاده

- الهی‌نیا، س. ع.، ۱۳۸۹. بیماری‌های گیاهان زراعی و روش‌های مبارزه با آن‌ها. انتشارات دانشگاه گیلان، ۳۸۳- ۳۸۵.
- حسن‌زاده، ن.، ۱۳۸۱. بیماری‌های آتشک درختان میوه دانه‌دار، زمینه‌های شناخت و کنترل بیماری. انتشارات سنا به سفارش امور باغبانی وزرات جهاد کشاورزی، ۱۰۸-۱۰۹.
- دری، ح. ر.، لک، م. ر.، بنی‌جمالی، س. م.، دادیور، م.، قنبری، ع. الف.، خودشناس، م. ع. و اسدی، ب. ۱۳۸۲. لوبیا: از کاشت تا داشت. نشریه ترویجی سازمان کشاورزی استان مرکزی. ۷۶ ص.
- صادقی، س. ا.، عصاره، م. ح. و توکلی، م.، ۱۳۸۸. زنبورهای گالزای بلوط ایران. انتشارات موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور. ۲۸۶ ص.
- محمودزاده، ح.، داودی، ع. و ستوده، ر.، ۱۳۸۵. بررسی اثرات تیمارهای حرارتی و شیمیایی بر باکتری‌زدایی عامل بیماری سرطان طوقه و ریشه و چند صفت باغی قلمه‌های دو رقم انگور تجاری. مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان قزوین.
- Bhattacharjee, S. K., 2001. Handbook of Medicinal Plants. India: Pointer Publishers.
- Basri D. F. and Fan, S. H., 2005. The potential of aqueous and acetone extracts of galls of *Quercus infectoria* as antibacterial agents. Indian Journal of Pharmacology, 37 (1): 26-29.

www.SID.ir

Archive of SID

- Csizinszky, A. A., Civerolo, E. I. and Jones, j. B., 1993. Inactivation of *Xanthomonas campestris* pvs. in vitro with plant extracts. Acta Horticulture, 331: 301- 305.
- Elshazly, A. & Hussein, K., 2004. Chemical analysis and biological activities of essential oil of *Teucrium leococladom* (Lamiaceae). Bio. Sys. and Eco., 32: 665 – 674.
- Evans, W. C., 1996. Pharmacopoeial and Related Drugs of Biological origin. In: Trease and Evan's phamacognosy. London: WB Saunders co. Ltd.
- Feng, W., Zheng, S. and Xiaodong, E., 2007. Essential oils to control *Alternaria altarnata* in vitro and in vivo. Food. Cont, 18: 1126 - 30.
- Gilbertson, R. L., Maxwell, D. P., 1992. Common bacterial blight of bean: 18-39 in: Chaube. H. C., Kumar, J. and Singh, U. S. (Eds.). Plant Diseases of International Importance Prentice. Hall, New Jersey.
- Hayes, L. E., 1946. Survey of higher plants for presence of 82ntibacterial substances. Bot. Gas., 108: 408.
- Hussein, G., Miyashiro, H., Nakamura, N., Hattori, M., Kakiuchi, N. and Shimotohno, K., 2000. Inhibitory effects of Sudanese medicinal plant extracts on hepatitis C virus protease. Phytother Res., 14:510-416.
- Ikram, M., Nowshad, F., 1977. Constituents of *Quercus infectoria*. Planta Med., 31: 286-287.
- Kottakkal, A. V. S., 1995. Indian Medicinal Plants. Vol 4. Orient Longman Ltd.
- Muhamad, Z. and Mustafa, A. M., 1994. Traditional Malay Medicinal Plants. Kuala Lumpur. Penerbit Fajar Bakti Sdn Bhd.
- Muskhazli, M., Nurhafiza, Y., Nor Azwady, A. A. and Nor Dalilah, E., 2008 Comparative Study on the in vitro Antibacterial Efficacy of Aqueous and Methanolic Extracts of *Quercus infectoria* Gall`s Against *Cellulosimicrobium cellulans*. Journal of Biological Sciences, 8(3): 634-638.
- Satirapathkul, C. and Leela, T., 2011. Growth inhibition of pathogenic bacteria by extract of *Q. infecroria* galls. International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics, 1 (1): 6 pages.
- Vermani, A., Navneet, P., 2009. Screening of *Quercus infectoria* galls extracts as antibacretial agants against dental pathogens. Indian J. Dent. Res., 20: 337- 339.
- Weller, D.M., & Saettler, A.W., 1980. Evaluation of seed borne *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* as primary inocula in bean blight. Phytopathology, 70:148-152.
- Wiart C., and Kumar, A., 2001. Practical Handbook of Pharmacognosy. Malaysia: Pearson Education Malaysia Sdn. Bhd.

www.SID.ir