

بررسی اثر ضد باکتریایی چند اسانس و عصاره گیاهی بر روی باکتری‌های عامل بیماری نواری گندم و جو

*فرید بیکی^۱ و علی علیزاده^۲

^۱عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، آزمایشگاه کنترل بیولوژیک آمل،

^۲عضو هیات علمی مؤسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع بخش آفات و بیماری‌ها، تهران

تاریخ دریافت: ۸۲/۵/۲۵؛ تاریخ پذیرش: ۸۴/۱۲/۲۴

چکیده

بیماری نواری باکتریایی گندم و جو یکی از مهمترین بیماری‌های باکتریایی بذرزاد گندم و جو در نواحی گرم و مرطوب می‌باشد که بوسیله باکتری‌های *X. t. pv. cerealis* و *Xanthomonas translucens pv. Translucens* ایجاد می‌شود. مطالعات جهت کنترل این بیماری با سموم باکتری‌کش با موفقیت توأم نبوده است. در این بررسی اثر ضد باکتریایی چند اسانس و عصاره‌های استخراج شده از گیاه دارویی روی باکتری‌های ذکر شده، مورد مطالعه قرار خواهد گرفت. بدین صورت که اسانس‌ها و عصاره‌ها را در داخل چاهک حفر شده در مرکز تشتک‌های حاوی آگار مغذی ریخته و میزان قطر هاله عدم رشد در اطراف هر چاهک، یادداشت برداری و نتایج آن تجزیه و تحلیل آماری شدند. نتایج نشان داد که اسانس‌ها و عصاره‌های بررسی شده، اثرات ضد باکتریایی تقریباً یکسانی نسبت به باکتری‌های مورد آزمایش، دارا بودند به‌طوری‌که در میان اسانس‌ها، اسانس دو گونه نعناع (*M. spicata, Mentha aquatica*)، علف شیر (*Echinophora sibthorpiana*)، زوفا (*Hyssopus officinalis*) و کاکوتی (*Ziziphora persica*) دارای بیشترین تأثیر و اسانس گونه‌های بومادران (*A. vermiculatus, A. tenuifolia, Achillea millefolium*) و گیاه مریم نخودی (*Teucrium polium*)، دارای کمترین تأثیر بازدارندگی یا بعبارتی کمترین قطر هاله بازدارنده از رشد بوده‌اند. در مورد عصاره‌ها نیز عصاره‌های گیاهان سیر (*Allium sativum*)، اسپند (*Peganum harmala*) و داتوره (*Datura stramonium*) دارای بیشترین تأثیر و عصاره‌های اکلیل کوهی (*Rosmarinus officinalis*) و گندجارو (*Artemisia annua*) فاقد هرگونه اثر ضد باکتریایی روی باکتری‌های فوق بودند.

واژه‌های کلیدی: باکتری نواری، گندم، جو، اسانس، عصاره، ضد باکتریایی

* - مسئول مکاتبه: f.beiki@areo.ir

مقدمه

عامل شانکر باکتریایی مرکبات^۱ (جدایه‌هایی از آسیا، آرژانتین، برزیل و فلوریدا) (سیزینزکی و همکاران، ۱۹۹۳)، اثرات ضد باکتریایی اسانس گل رز (*Rosa damascena*) روی باکتری *X. axonopodis* subsp. *Vesicatoria* (باسیم و باسیم، ۲۰۰۳)، تأثیر عصاره‌های سیر (*Allium* sp.) و میوه اسپند (*Peganum* sp.) روی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* به اندازه مصرف آنتی‌بیوتیک استریتومایسین (احمدی، ۱۳۶۹)، و اثرات ضد قارچی عصاره‌های سیر (*Allium* sp.) (یین و تسائو، ۱۹۹۹)، داتوره (*Datura metel*) (دابور و همکاران، ۲۰۰۴) و گند جارو (*Artemisia sieversiana*) (تان و همکاران، ۱۹۹۸) روی قارچ‌های *Aspergillus fumigatus*، *A. flavus* و *A. niger* و ... را می‌توان نام برد که با تحقیقات گسترده‌تر جزئیات بیشتری از مکانیسم‌های بازدارندگی و همچنین جزء مؤثر در عصاره‌ها و یا اسانس‌ها مشخص شده است. به‌عنوان مثال، در طی تحقیقی مشخص شد که اسانس گیاه آویشن (*Thymus capitatus*) کنیدی‌های قارچ *Penicillium digitatum* را کاملاً از بین برده و قادر است مرفولوژی هیف و کنیدی‌ها را تغییر دهد. البته با تجزیه گروماتوگرافی گازی^۲، ترکیبات مختلفی از اسانس مشخص شد ولی مهمترین ترکیب ضد قارچی، ماده کارواکرول^۳ بوده که حدود ۸۳-۸۱ درصد از کل ترکیب اسانس را به خود اختصاص داده است (آراس و اوسائی، ۲۰۰۱). همچنین عصاره‌های برگ گیاهان عشقه (*Hedera helix*) و گل صد تومانی (*Paeonia suffruticosa*) قادرند در رهاسازی و جوانه زنی زئوسپوره‌های قارچ *Phytophthora infestance* اختلال ایجاد کنند (روهنر و همکاران، ۲۰۰۴). از دیگر اجزاء شناخته شده می‌توان

بیماری باکتریایی نواری گندم و جو توسط پاتووارهای مختلف باکتری *Xanthomonas translucens* ایجاد می‌شود. این بیماری در ایران برای اولین بار در برخی از مزارع کرمان و سپس از اغلب استان‌ها گزارش شد (علیزاده و رحیمیان، ۱۹۸۹). در گذشته برای کنترل این بیماری از ضد عفونی بذور با کلرید جیوه استفاده می‌شد ولی مصرف این سموم در سال ۱۹۷۸ ممنوع اعلام شد (کانفر، ۱۹۸۸). از آنجایی که امروزه کاربرد سموم باکتری‌کش به صورت ضد عفونی بذر یا سمپاشی در مزرعه تأثیری در کنترل این بیماری ندارند، از این رو هیچ ماده شیمیایی مؤثری برای ضد عفونی بذر و یا سمپاشی در مزرعه توصیه نمی‌گردد (تیلمن، ۱۹۹۴). استفاده از گیاهان برای کنترل آفات و امراض گیاهی، انسانی و دامی از قدیم الایام در کشورهای مختلف دنیا متداول بوده است، به طوری که بررسی اثرات ضد میکروبی ترکیبات معطر گیاهی و اسانس‌ها از سال‌ها قبل در سطح وسیعی توسط دانشمندان مختلف شروع شده و امروزه اثرات ضد میکروبی و ضد قارچی گیاهان بیشماری بر روی تعداد زیادی از میکروارگانیسم‌ها و قارچ‌های بیماریزای گیاهی و جانوری مورد مطالعه قرار گرفته است، نظیر: تأثیر خوب اسانس مریم نخودی (*Teucrium leuocladum*) روی باکتری‌های (*Pseudomonas subtilis aeruginosa*) و مخمر *Candida albican* (الشازلی و حسین، ۲۰۰۴)، کاهش رشد قارچ *Rhizoctonia solani* و باکتری *Xanthomonas Oryzae* pv. *Oryzae* توسط عصاره اتانولی برگ داتوره (*Datura metel*) (کاگال و همکاران، ۲۰۰۴)، اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های زرشک و سیر روی فعالیت باکتری‌های *Agrobacterium tumefaciens* و *Erwinia amylovora* (هایز، ۱۹۴۶). تأثیر خوب عصاره گیاه بابونه معطر (*Chamemelum nobile*) روی چهار جدایه از باکتری

1- Citrus Bacterial Canker

2- Gas-chromatographic Analysis

3- Carvacol

۱۹۹۴) و طی تحقیقی در سال ۱۹۹۶، پس از آزمایش چندین عصاره گیاهی بر روی باکتری *Erwinia amylovora* مشخص شد که عصاره دو گیاه دارویش (*Viscum album*) و عشقه (*Hedera helix*)، دارای تأثیر بازدارندگی بسیار خوبی بودند به طوری که در آزمایش های مزرعه ای، با استفاده از عصاره های فوق، ۶۷٪ درصد کنترل به دست آمد با وجود این، با مصرف آنتی بیوتیک استرپتومایسین تنها ۳۸٪ درصد کنترل قابل حصول بود (موج و همکاران، ۱۹۹۶). بدین ترتیب محققین با استفاده از اطلاعات موجود اقدام به تهیه سموم از این گیاهان نموده اند، به طوری که ادامه اینگونه تحقیقات در آینده، امکان تهیه و توسعه فرآورده های حاصل از مواد گیاهی و بالطبع کاهش استفاده از سموم شیمیایی که اثرات بسیار مضر و مخربی برای مردم و طبیعت دارد، فراهم می آورد. از این رو در این تحقیق سعی می شود اثرات ضد باکتریایی تعدادی از گیاهان دارویی موجود در طبیعت ایران، جهت تعیین میزان کارایی آنها روی عوامل بیماری نواری باکتریایی گندم و جو، مورد بررسی قرار گیرد، تا بتوان در صورت امکان جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی تهیه نمود.

مواد و روش ها

تهیه باکتری مورد استفاده: باکتری های مورد استفاده در این بررسی توسط علیزاده (مؤسسه تحقیقات جنگل ها و مراتع کشور- بخش آفات و بیماری ها) دریافت شدند که مشخصات جدایه ها به شرح زیر است:

خصوصیات باکتری شناسی و تاکسونومیک این دو جدایه و نیز بیماری شناسی آنها قبلاً تعیین و گزارش شده بود (علیزاده و رحیمیان، ۱۹۸۹).

به ترکیب ایزوالانتولاکتان^۱ در گیاه گندجارو (*Artemisia sieversiana*) اشاره کرد که این جزء تأثیر بسزایی روی قارچ های *A. Aspergillus flavus*، *Candida*، *Geotrichum candidum niger* و *tropicalis* و *C. albicans* دارد (تان و همکاران، ۱۹۹۸). در گیاه داتوره (*Datura metel*) نیز کیتیناز^۲ موجود در آن سبب اختلال در جوانه زنی اسپورو میسلیم *Phycomyces* و *Trichoderma hamatum* می شود (بروک ارت و همکاران، ۱۹۸۸) و در آویشن (*Themus glandulosus*) و نعناع فلفلی *Mentha puleginum*، ترکیبات تیمول^۳ و کارواکرول^۳، سبب بازدارندگی *Botrytis sp.* از رشد می شود (بوچرا و همکاران، ۲۰۰۳). البته برخی از چنین یافته ها نیز تحت شرایط گلخانه ای و محیطی بررسی شده است و مواردی نیز موفقیت آمیز بوده است. به عنوان مثال، اسانس و عصاره های اتانولی بذور چریش (*Azadirachta indica*) ضمن کاهش رشد قارچ (*Pyricularia oryzae*) در شرایط آزمایشگاهی، میزان سرعت گسترش بیماری بلاست^۴ را در گیاه برنج در شرایط گلخانه ای نیز کاسته، به طوری که در شرایط گلخانه ای میزان کارایی آن در حد مصرف سم کاربندازیم بوده است (آمادیا، ۲۰۰۰). با پاشیدن عصاره داتوره (*Datura metel*) روی گیاه برنج، میزان بیماری بلاست باکتریایی^۵ و شیت بلاست برنج^۶ کاهش یافته است (کاگال و همکاران، ۲۰۰۴). با مصرف اسانس گیاهان *Hyptis suaveolens*، *Murraya koenigii* و *Ocimum canum* در خاک توانستند بیماری مرگ گیاهیچه گوجه فرنگی^۷ ناشی از قارچ های *Pythium aphanidermatum* و *P. debaryanum* را به ترتیب ۸۳، ۶۷ و ۵۰ درصد کاهش دهند (پندی و همکاران،

- 1- Isoalantoctan
- 2- Chitinases
- 3- Tymol
- 4- Blast Disease
- 5- Bacterial Blight
- 6- Sheath Blight
- 7-Damping-off disease of tomato

جدول ۱- مشخصات ایزوله‌های باکتری مورد استفاده.

نام جدایه	میزبان جدا شده	محل جمع آوری	تاریخ جمع آوری
<i>X. t. pv. hordei</i> IBLS* 7	جو	شهرضا	۱۹۹۰
<i>X. t. pv. cerealis</i> IBLS* 43	گندم	درود	۱۹۹۰

* Iranian Bacterial Leaf Streak.

جنس گیاهی، در اندام‌های ترش‌حی مختلفی تولید می‌شوند، از این رو اندام‌ها گیاهی مورد استفاده متفاوت می‌باشند (جدول ۲).

برای استخراج اسانس‌ها از روش تقطیر با آب از دستگاه تقطیر گردشی که توسط کلونجر در سال ۱۹۲۸ ابداع شد، استفاده گردید. حدود ۴۰۰ گرم از اندام پودر شده هر گیاه در داخل بالن دستگاه کلونجر^۱ ریخته و نیمی از حجم بالن با آب پر گردید و پس از آن عمل تبخیر با گرمادهی صورت گرفت. بخارهای تولید شده پس از عبور از لوله‌های سرد کننده، مایع و در ظرف گیرنده، جمع‌آوری شدند. مایع حاصل، حاوی اسانس و عرق بود و از آنجایی که اسانس بدلیل سبک‌تر بودن در سطح آن قرار می‌گیرد، به آسانی قادر به جداسازی می‌باشد. برای جلوگیری از اکسیداسیون، اسانس‌های به‌دست آمده، در یخچال و درون ظرف‌هایی با رنگ تیره، نگهداری شدند.

تجدید کشت باکتری‌ها: باکتری‌های لیوفیلیزه شده^۱ با مقداری آب مقطر سترون، به‌صورت سوسپانسیون درآمده، سپس با کمک لوپ استریل، یک قطره از سوسپانسیون باکتری‌ها بر روی محیط آگار مغذی مخطط گردید و جهت رشد باکتری‌ها، محیط‌های کشت در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. از تک کلونی‌های رشد یافته در این محیط، یک کلونی بر روی محیط فوق کشت مجدد داده شد تا در آزمایش‌ها مورد استفاده قرار گیرد. برای نگهداری طولانی مدت، مقداری از این باکتری در آب مقطر استریل در داخل لوله‌های درب دار استریل و در دمای پنج درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌های گیاهی جهت اسانس‌گیری: نمونه‌های گیاهی از مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان تهران، واقع در خجیر جمع‌آوری شدند، سپس در سایه و در دمای اتاق خشک و توسط آسیاب پودر شدند. از آنجایی که اسانس‌ها بسته به نوع خانواده و

جدول ۲- مشخصات گیاهان مورد استفاده در اسانس‌گیری.

نام فارسی گیاه	نام علمی گیاه	نام خانواده	اندام مصرفی
نعناع	<i>Mentha spicata</i>	Labiatae	شاخ و برگ
نعناع	<i>Mentha piperita</i>	Labiatae	شاخ و برگ
نعناع	<i>Mentha aquatica</i>	Labiatae	شاخ و برگ
بومادران	<i>Achillea millefolium</i>	Compositae	گل
بومادران	<i>Achillea biebresteini</i>	Compositae	گل
بومادران	<i>Achillea vermicultus</i>	Compositae	گل
بومادران	<i>Achillea tenuifolium</i>	Compositae	گل
کک کش	<i>Pulicaria</i> sp.	Compositae	سرشاخه گلدار
مریم نخودی	<i>Teucrium polium</i>	Labiatae	گل
کاکوتی	<i>Ziziphora persica</i>	Labiatae	سرشاخه گلدار
زوفا	<i>Hyssopus officinalis</i>	Labiatae	سرشاخه گلدار
علف شیر	<i>Echinophora sibthorpiana</i>	Umbelifera	سرشاخه گلدار
اسطوخودوس	<i>Lavandula vera</i>	Laminaceae	سرشاخه گلدار

برروی محیط کشت آگار مغذی (NA آگار ۲۳ گرم، گلوکوز ۵ گرم، عصاره مخمر ۵ گرم و آب ۱ لیتر) پخش گردید. مدتی پس از خشک شدن سطح پتری ها، با کمک دستگاه سوراخ کن (با قطر ۳ میلی متر) یک سوراخ در هر تشتک روی محیط کشت حفر و حدود ۱۲ میکرو لیتر از هر یک از اسانس ها، در چاهک ها ریخته شد، همچنین از آب مقطر سترون، به عنوان شاهد استفاده گردید. در مورد عصاره ها نیز، به ازاء هر ۰/۲ گرم از عصاره لیوفیلیز شده^۱، حدود ۵۰ میکرو لیتر آب مقطر سترون، به آن اضافه شد تا به صورت محلول در آید. سپس ۱۲ میکرو لیتر از عصاره گیاهی، درون هر چاهک ریخته و در چاهک شاهد از آب مقطر سترون استفاده شد. پس از مسدود نمودن دور تشتک ها با پارافیلیم، تشتک ها به طور وارونه در انکوباتور با دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، بمدت ۴۸ ساعت قرار داده شدند. سپس هاله بازدارنده رشد در اطراف چاهک اندازه گیری و ثبت شد و داده ها در یک طرح کامل تصادفی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

تهیه و آماده سازی نمونه های گیاهی جهت عصاره گیری: نمونه های گیاهی که مشخصات آن در جدول ۳ آمده است از مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان تهران و نیز از شهرستان بابل جمع آوری شدند. برای تهیه عصاره، ۱۰ گرم اندام گیاهی پس از شستشو قطعه قطعه گردیده و درون ارلن کوچک سترون ریخته شدند. سپس به هر نمونه خرد شده به میزان ۲۰ گرم آب اضافه گردید. نمونه ها به مدت ۴۸ ساعت روی دستگاه تکان دهنده با ۹۰ دور در دقیقه، گذاشته شدند و محلول های حاصل توسط کاغذ صافی سترون، صاف و به مدت ۳۰ دقیقه در ۶۰۰۰ × g، سانتریفیوژ شدند. مایع بالای جدا شده و درون شیشه های تیره در بسته، داخل فریزر نگهداری شد. برای تغلیظ محلول، از روش انجماد در خلاء^۱ استفاده شد.

آزمون اثر ضد باکتریایی اسانس ها و عصاره ها: از سوسپانسیون کشت ۲۴ ساعته باکتری ها (با غلظت حدود ۱۰^۷ - ۱۰^۸ سلول باکتری در میلی لیتر^۲ که با روش اسپکتروفتومتری^۳ اندازه گیری شدند)، ۰/۱ میلی لیتر،

جدول ۳- مشخصات گیاهان مورد استفاده در عصاره گیری.

نام علمی گیاه	نام فارسی گیاه	تیره	تاریخ و محل جمع آوری
<i>Allium sativum</i>	سیر	Liliaceae	شهریور ۱۳۷۹ - خنجیر
<i>Datura stramonium</i>	داتوره	Solanaceae	شهریور ۱۳۷۹ - خنجیر
<i>Salvia officinalis</i>	مریم گلی	Labiatae	شهریور ۱۳۷۹ - خنجیر
<i>Rosemarinus officinalis</i>	اکلیل کوهی	Lamiaceae	شهریور ۱۳۷۹ - خنجیر
<i>Peganum harmala</i>	اسپند	Zygophyllaceae	شهریور ۱۳۷۹ - خنجیر
<i>Mentha piperita</i>	سوسنبر	Lamiaceae	شهریور ۱۳۷۹ - خنجیر
<i>Melissa officinalis</i>	بادرنجبویه	Umbelliferae	شهریور ۱۳۷۹ - خنجیر
<i>Asterodaucus sp.</i>	هویج کوهی	Umbelliferae	شهریور ۱۳۷۹ - خنجیر
<i>Lavandula vera</i>	اسطوخودوس	Lamiaceae	شهریور ۱۳۷۹ - خنجیر
<i>Foeniculum vulgare</i>	رازیانه	Umbelliferae	شهریور ۱۳۷۹ - خنجیر
<i>Sambucus nigra</i>	آفتی	Polygonaceae	خرداد ۱۳۷۹ - بابل
<i>Artemisia annua</i>	گندجارو	Compositae	خرداد ۱۳۷۹ - بابل

4- Lyophilized Extracts

1- Lyophilization
2- Colony Forming Unit
3- Spectrophotometer

نتایج و بحث

برای جداسازی ترکیبات معطره، به‌طور معمول با یکی از روش‌های تقطیر، فشردن و یا عصاره‌گیری انجام می‌گیرد. در این تحقیق از روش تقطیر با آب^۱ با کمک دستگاه تقطیرگردشی برای استخراج اسانس‌ها از بافت گیاهی استفاده شد. این روش نسبت به دو روش دیگر آسانتر و اسانس استخراج شده با این روش نیز از کمیت بیشتر و کیفیت بهتری برخوردار است. از آنجایی که اسانس‌ها در اندام‌های مختلف گیاهان (ریشه، ساقه، برگ‌ها، جوانه‌ها، گل‌ها و میوه‌ها) و در قسمت‌های خاصی از آن اندام‌ها نظیر سلول‌های ترشحي، کیسه‌ها، مجاری ترشحي، کرک‌ها و وجود دارند، از این رو فقط از اندام‌های خاص در گیاهان برای اسانس‌گیری استفاده شد. در خصوص عصاره‌ها نیز در آزمایش‌های اولیه، میزان بازدارندگی از رشد باکتری توسط عصاره‌های تغلیظ شده، بسیار ناچیز و غیر قابل اندازه‌گیری بود، از این رو کلیه نمونه‌ها توسط دستگاه فریز درایر (تبخیر تحت شرایط خلأ) کاملاً خشک شدند تا بتوان از سوسپانسیون غلیظ‌تر و همچنین با نسبت یکسانی، از همه عصاره‌ها استفاده کرد. قابل ذکر است که برخی از محققین قبلی نیز از عصاره‌های لیوفیلز شده در آزمایش‌های خود استفاده کردند. به‌عنوان مثال، استفاده از عصاره لیوفیلز شده سرشاخه‌های نارنج (*Citrus aurantium*) (مهران و

همکاران، ۱۹۹۱) و برگ‌های گیاه امولنه (*Phyllanthus sp.*) (منساه و همکاران، ۱۹۹۰) برای انجام آزمایش‌های ضد باکتریایی را می‌توان نام برد. پس از تهیه اسانس و عصاره‌های گیاهی و انجام آزمایش‌های ضد باکتریایی آنها، میزان قطر هاله بازدارنده از رشد آنها برحسب سانتی‌متر، یادداشت‌برداری شدند. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل این آزمون مشخص شد که برخی از اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهان مورد بررسی، تأثیر نسبتاً خوبی در جلوگیری از رشد جدایه‌های *X. t. pv. cerealis* و *X. t. pv. hordei* را در روی محیط کشت داشته‌اند، به‌طوری‌که جدول‌های تجزیه واریانس آنها (جدول‌های ۴، ۵، ۶ و ۷)، بیانگر معنی‌دار شدن اثرات ضد باکتریایی آنها، در سطح احتمال ۱ درصد می‌باشد.

با توجه به معنی‌دار شدن داده‌ها در سطح احتمال ۱ درصد، می‌توان گفت اسانس و عصاره‌های گیاهی مورد بررسی از نظر توان بازدارندگی از رشد باکتری‌های مورد آزمایش با یکدیگر متفاوتند، از این رو می‌توان اسانس و عصاره‌های مختلف را براساس میزان تأثیر در بازدارندگی از رشد باکتری‌های فوق، گروه‌بندی نمود که شکل‌های ۱، ۲، ۳ و ۴ گروه‌بندی میانگین‌ها را با روش استیودنت نیومن و کیل^۲ در سطح ۱ درصد، نشان می‌دهند.

جدول ۴- تجزیه واریانس میزان هاله بازدارندگی از رشد *X. t. pv. cerealis* توسط اسانس‌های گیاهان مورد بررسی.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مربع میانگین‌ها	ضریب	سطح
تیمار	۱۲	۷۲/۰۸۳	۴۰۳/۹۱۴**	۰/۰۰۰۰۱
خطا	۲۶	۰/۳۸۷		
کل	۳۸	۷۲/۴۷۰		

ضریب تغییرات واریانس: C. V. = ۴/۲۱

** معنی‌دار در سطح ۱ درصد

جدول ۵- تجزیه واریانس میزان هاله بازدارنده رشد *X. t. pv. hordei* توسط اسانس های گیاهان مورد بررسی.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مربع میانگین ها	ضریب	سطح
تیمار	۱۲	۷۴/۶۳۰	۱۲۵/۰۲۴**	۰/۰۰۰۰۱
خطا	۲۶	۱/۲۹۳		
کل	۳۸	۷۵/۹۲۳		

ضریب تغییرات واریانس: C. V. = ٪۷/۶۴

** : معنی دار در سطح ۱ درصد

جدول ۶- تجزیه واریانس میزان هاله بازدارنده رشد *X. t. pv. cerealis* توسط عصاره های گیاهی.

منبع تغییرات	درجه آزادی	مربع میانگین ها	ضریب	سطح
تیمار	۱۱	۹۹/۴۲۷	۴۱۷/۱۷۸**	۰/۰۰۰۰۱
خطا	۲۴	۰/۵۲۰		
کل	۳۵	۹۹/۹۴۷		

ضریب تغییرات واریانس: C. V. = ٪۶/۴۲

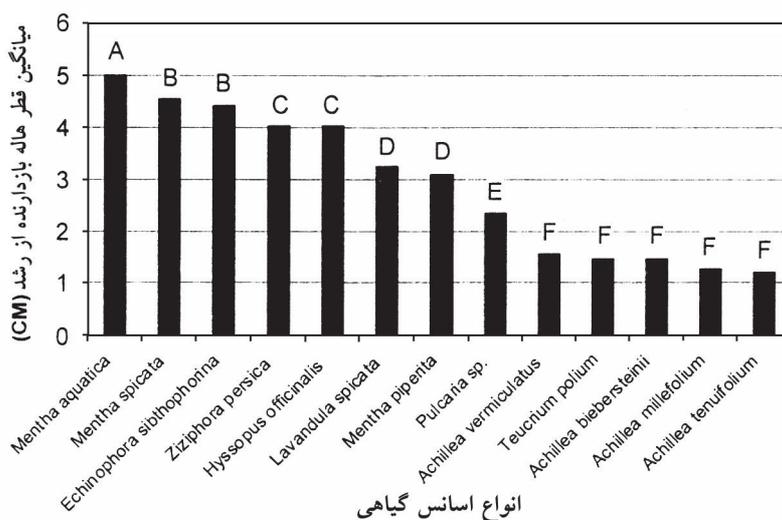
** : معنی دار در سطح ۱ درصد

جدول ۷- تجزیه واریانس میزان هاله بازدارنده رشد *X. t. pv. hordei* توسط عصاره های گیاهی.

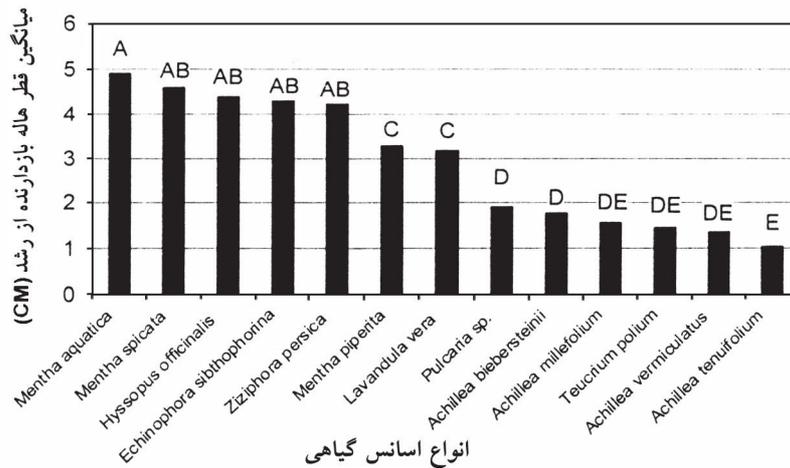
منبع تغییرات	درجه آزادی	مربع میانگین ها	ضریب	سطح
تیمار	۱۱	۸۹/۲۲۹	۲۷۲/۹۱۸**	۰/۰۰۰۰۱
خطا	۲۴	۰/۷۱۳		
کل	۳۵	۸۹/۹۴۲		

ضریب تغییرات واریانس: C. V. = ٪۸/۱۲

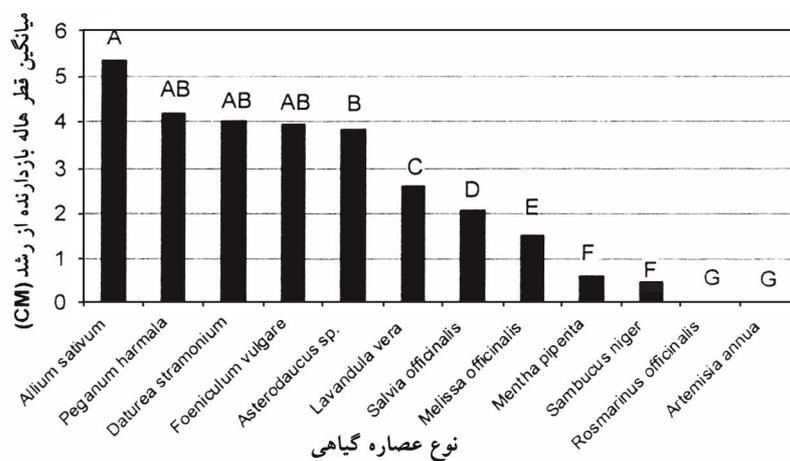
** : معنی دار در سطح ۱ درصد



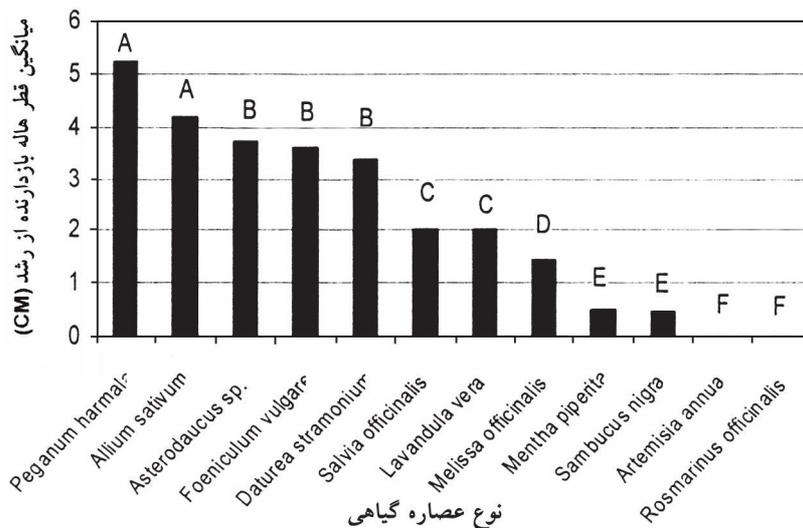
شکل ۱- میزان بازدارندگی از رشد باکتری *X. t. pv. cerealis* توسط اسانس های گیاهی.



شکل ۲ - میزان بازاریابی از رشد باکتری *X. t. pv. hordei* توسط اسانس‌های گیاهی.



شکل ۳ - مقایسه میزان بازاریابی از رشد *X. t. pv. cerealis* توسط عصاره‌های گیاهی.



شکل ۴ - مقایسه میزان بازاریابی از رشد *X. t. pv. hordei* توسط عصاره‌های گیاهی.

توسط اسانس گیاه علف شیر در منابع گزارشی وجود ندارد، اما در مورد اسانس گیاه مریم نخودی، طی آزمایشی، مشخص شد که آن دارای اثر ضد باکتریایی بر روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus* (ATCC 27853) و *Bacillus subtilis* دارای اثرات ضدباکتریایی بودند (اسوی و سور، ۲۰۰۰). اسانس گیاه کاکوتی از جمله دیگر اسانس‌هایی است که دارای اثرات ضد باکتریایی خوبی می‌باشد، به طوری که بر روی هر دو پاتووار باکتری مورد آزمایش، در این تحقیق میانگین قطر هاله بازدارندگی از رشد باکتری توسط آن در حدود ۴ سانتی‌متر بوده است. در منابع نیز اثرات ضد باکتریایی آن گزارش شده است از جمله تأثیر دو گونه از کاکوتی بنام‌های *Ziziphora taurica subsp. Cleonioides* و *Z. t. subsp. taurica* روی باکتری‌های *Stenotrophomonas maltophilia*، *Escherichia coli* و *Klebsiella pneumoniae* و *Staphylococcus aureus* (تامن و آیهان، ۱۹۹۲). از دیگر اسانس‌هایی که دارای اثر ضد باکتریایی بالایی بودند، می‌توان به اسانس گیاه زوفا اشاره کرد. همان طوری که در شکل‌های ۱ و ۲ نیز مشخص است، میانگین قطر هاله بازدارندگی از رشد آن، در حدود ۴ سانتی‌متر بوده است. هر چند گیاه زوفا نسبت به گونه *M. aquatica*، هاله بازدارندگی کمتری ایجاد کرد، ولی می‌توان گفت که اثر ضد باکتریایی آن تقریباً در حد اسانس‌های علف شیر، کاکوتی و سایر گونه‌های نعناع می‌باشد. در منابع نیز به خاصیت ضد باکتریایی آن اشاره شده است. به عنوان مثال، در آزمایشی اسانس‌های گیاهان شوید (*Anethum graveolens*)، زیره سیاه (*Carum carvi*)، گشنیز (*Coriandrum sativum*)، ریحان (*Ocimum basilicum*)، آویشن (*Thymus vulgaris*)، بادیان‌رومی (*Pimpinella anisum*)، مرزه (*Satureja hortensis*)، نعناع (*Mentha spp.*) و زوفا (*Hyssopus spp.*)، بر روی ۹ باکتری آزمایش شد

همان طوری که از شکل‌های ۱ و ۲ نیز مشخص است، می‌توان گفت که کلیه اسانس‌های گیاهی، بر روی باکتری‌های ذکر شده، دارای اثر ضد باکتریایی می‌باشند. در میان کلیه اسانس‌های آزمایش شده، اسانس خانواده نعناع دارای اثر ضد باکتریایی بسیار بالایی بودند، به طوری که هاله بازدارنده رشد بر روی هر دو باکتری نامبرده توسط این اسانس، دارای میانگین قطری در حدود ۵ سانتی‌متر بود. نکته‌ای که در خصوص اسانس گیاهان جنس نعناع بسیار حائز اهمیت می‌باشد این است که این جنس دارای دو خصوصیت بسیار مهمی است، یکی اینکه میزان استحصال اسانس نسبت به سایر گیاهان مورد استفاده در این بررسی، به مراتب بیشتر می‌باشد، دیگر اینکه میزان اثر ضدباکتریایی آن در مقابل سایر گیاهان مورد استفاده، بسیار بیشتر می‌باشد. در مورد اثر ضد باکتریای اسانس نعناع تحقیقات و گزارش‌های متنوعی وجود دارد، از جمله اثر ضد باکتریایی بالای اسانس نعناع (*Mentha sp.*)، بر روی باکتری‌های *Agrobacterium tumefaciens* و *Pectobacterium carotovora* (حسنین و همکاران، ۱۹۹۷) و نیز اثرات ضد باکتریایی دو گونه نعناع به نام‌های *M. spicata* و *M. pulegium* بر روی تعدادی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی (سیورپلو و همکاران، ۱۹۹۵). اثرات ضد باکتریایی اسانس گونه‌های *M. arvensis* و *M. piperita sylvestris* بر روی *Bacillus subtilis* و اسانس گونه‌های *M. piperita*، *M. arvensis* و *Escherichia coli* بر روی *Serratia marcescens* و *Micrococcus luteus* را می‌توان نام برد (کوالیتو و همکاران، ۱۹۴۵). اسانس گیاه علف شیر نیز از خاصیت ضدباکتریایی بالایی برخوردار بود. همان طوری که در شکل‌های ۱ و ۲ نیز مشخص است، اسانس علف شیر در مقایسه با اسانس مریم نخودی دارای قطر هاله بازدارندگی بیشتری می‌باشد (میانگین قطر هاله بازدارندگی به ترتیب برای آنها حدود ۴/۵ و ۱/۵ سانتی‌متر است)، هر چند در مورد اثر بازدارندگی از رشد

باکتری‌های *Staphylococcus sp.*، *Proteus sp.*، *Escherichia sp.* و *Pseudomonas sp.* (سینگ و شوکلا، ۱۹۸۴)، *X. campestris pv. vesicatoria*، (مانگاما و اسررامولو، ۱۹۹۱) و *P. syringae pv. syringae* (احمدی، ۱۳۶۹). عصاره آبی میوه اسپند، نیز در حد عصاره سیر، دارای اثر ضد باکتریایی بود به نحوی که میانگین قطر هاله بازدارندگی از رشد توسط عصاره میوه اسپند را می‌توان در حد سیر دانست. در تحقیقی نیز گزارش شده که عصاره میوه اسپند بر روی باکتری *P. s. syringae pv. syringae* مؤثر بوده و این عصاره حاوی برخی از ترکیبات آلكالوئیدی است که آن به به اندازه آنتی‌بیوتیک استرپتومایسین از خاصیت ضد باکتریایی قوی برخوردار می‌باشد (احمدی، ۱۳۹۳). از دیگر گیاهانی که عصاره آنها دارای اثر ضد باکتریایی بالا، ولی در حد کمتری نسبت به عصاره‌های سیر و اسپند است عصاره گیاه داتوره می‌باشد که میانگین قطر هاله بازدارندگی از رشد در حدود ۴ و ۳/۳۶ سانتی‌متر، به ترتیب بر روی باکتری نواری گندم و جو است. در منابع نیز از اثر ضد میکروبی گیاه داتوره (*Datura ianosa*) بر روی باکتری‌های *Escherichia coli* (گوتیرز و همکاران، ۱۹۹۶؛ افتخار و همکاران، ۲۰۰۵)، *Bacillus Staphylococcus aureus*، *albicans* (گوتیرز و همکاران، ۱۹۹۶)، *malvacearum* (بامباول و پونیت، ۱۹۹۵)، *X. oryzae pv. Oryzae* (کاگال و همکاران، ۲۰۰۴)، و نیز بر روی قارچ‌های *Aspergillus fumigatus*، *A. flavus* و *A. niger* (دابور و همکاران، ۲۰۰۴) اشاره شده است. هر چند ایشیکی و همکاران (ایشیکی و همکاران، ۱۹۹۳) گزارش کرده‌اند که عصاره گندجاری (*Artemisia capillaries*) دارای اثر ضدقارچی بر روی *Fusarium graminearum*، *Aspergillus niger*، *Aspergillus flavus* و *Saccharomyces cereviciae* می‌باشد، و یا طبق گزارش دیگری ثابت شد که ترکیبات ایزوالانتولاکتان در

و نتیجه بیانگر این نکته بود که اسانس گیاه زوفا (*H. seravchanicus*) دارای بیشترین اثر ضد باکتریایی بوده است (هووادیک و چلادک، ۱۹۷۴). هر چند در خصوص اسانس بومادران (*Achillea ageratum*) در منابع ذکر شده است که اثر ضد باکتریایی بالایی بر روی *Bacillus coli* (پرتا و همکاران، ۱۹۹۶)، ولی در این تحقیق، اسانس گونه‌های بومادران با میانگین قطر هاله بازدارندگی حدود ۱/۳ سانتی‌متر، کمترین اثر ضد باکتریایی را در بین کلیه اسانس‌های آزمایش شده داشتند.

بر اساس نتایج تشریح شده در مورد اثرات ضد باکتریایی عصاره‌های گیاهی نسبت به باکتری‌های عامل نواری گندم و جو با توجه به جدول‌های ۶ و ۷، می‌توان بیان داشت که عصاره‌های مختلف بر روی پاتووارهای *X. t. pv. hordei* و *X. t. pv. cerealis* اثرات متفاوتی دارند به طوری که در شکل‌های ۳ و ۴ هم مشخص است، عصاره‌های سیر، اسپند، داتوره، رازیانه و هویج کوهی دارای اثرات بازدارندگی بالا، عصاره گیاهان اسطوخودوس، مریم گلی و بادرنجبویه دارای تأثیری متوسط و عصاره گیاهان نعناع و آقطی دارای تأثیر کمتری نسبت به دو گروه فوق بوده و در بین عصاره‌های مورد بررسی، عصاره‌های گندجارو و رزمارینوس، فاقد هرگونه اثرات ضدباکتریایی می‌باشند. همچنین باتوجه به نتایج فوق مشخص می‌گردد که اثرات ضد باکتریایی کلیه عصاره‌های مورد آزمایش بر روی دو پاتووار مورد مطالعه، تقریباً به طور یکسان می‌باشد (شکل‌های ۳ و ۴). در بین عصاره‌های مورد آزمایش، عصاره آبی سیر دارای تأثیر ضد باکتریایی بسیار بالایی بر روی پاتووارهای *X. t. pv. cerealis* و *X. t. pv. hordei* بود، به طوری که میانگین قطر هاله بازدارندگی از رشد در باکتری *X. t. pv. cerealis* در حدود ۴/۳ سانتی‌متر و در *X. t. pv. hordei* در حدود ۴/۱ سانتی‌متر بوده است. در مورد اثرات ضد باکتریایی سیر گزارش‌های زیادی وجود دارد. نظیر اثرات ضد باکتریایی عصاره سیر روی فعالیت

عصاره‌ها و اسانس‌های مورد استفاده، روی پاتووارهای *X. t. pv. hordei* و *t. pv. cerealis* ارائه نشده است.

سپاسگزاری

از آقای دکتر حشمت‌اله رحیمیان بخاطر راهنمایی‌های ارزنده و از ریاست محترم مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان تهران (آقای مهندس بیگدلی) بخاطر در اختیار گذاشتن برخی از امکانات لازم، تقدیر و تشکر می‌گردد.

گیاه گندجارو تأثیر بسزایی روی قارچ‌های *Aspergillus*، *Geotrichum candidum*، *A. niger*، *flavus*، *Candida tropicalis* و *C. albicans* دارد (تان و همکاران، ۱۹۹۸)، اما با این وصف، در آزمایش اثر ضدباکتریایی عصاره آبی این گیاه بر روی پاتووارهای باکتری نواری گندم و جو، هیچ گونه اثر ضد باکتریایی مشاهده نشد. در مورد اثر ضد باکتریایی عصاره‌های مریم‌گلی، رازیانه، بادرنجبویه، نعناع، رزمارینوس، هویج‌کوهی و اسطوخودوس که میزان تأثیر ضد باکتریایی آنها بر روی باکتری‌های نواری گندم و جو ذکر شد، در منابع گزارشی از آنها مشاهده نشده است. در ضمن قابل ذکر است قبلاً گزارشی از ایران در مورد اثر ضدباکتریایی

منابع

۱. احمدی، ع. ۱۳۶۹. بررسی اثرات ضد باکتریایی چند عصاره گیاهی و خواص آنتاگونیستی چند باکتری اپی‌فیت بر علیه باکتری عامل شانکر درختان هسته دار، پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه تربیت مدرس، ۹۱ ص.
2. Alizadeh, A., and Rahimian, H. 1989. Bacterial leaf streak of Gramineae in Iran. Bulletin OEPP. 19: 113-117.
3. Amadioha, A. 2000. Controlling rice blast in vitro and with extracts of *Azadirachta indica*. Crop Protection. 19:287-290.
4. Arras, G., and Usai, M. 2001. Fungitoxic activity of 12 essential oils agents four postharvest citrus pathogens: Chemical analysis of thymus capitatus oil and its effect in subatmospheric pressure conditions. Journal Food Protection. 64: 1025-1029.
5. Bambawale, O., and Punit, M. 1995. Efficacy of some medicinal plants against cotton pathogens. Advances in Plant Sciences. 8: 224-229.
6. Basim, E., and Basim, H. 2003. Antibacterial activity of *Rosa damascena* essential oil. Fitoterapia. 74:394-396.
7. Bouchra, C., Achouri, M., Hassani, L., and Hmamouchi, M. 2003. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. Journal of Ethnopharmacology. 89: 165-169.
8. Broekaert, W., Van Parijs, J., Allen, A., and Peumans, W. 1988. Comparison of some molecular, enzymatic and antifungal properties of chitinases from thorn-apple, tobacco and wheat. Physiological and Molecular Plant Pathology. 33: 319-331.
9. Cavallito, C.J., Bailey, J.H., and Buck, J.S. 1945. Antimicrobial principle of *Allium sativum*, Its precursor and essential oil of garlic. Journal of American Chemistry Society. 67: 1032-1033.
10. Csizinszky, A., Civerolo, E., and Jones, J. 1993. Inactivation of *Xanthomonas campestris* Pvs. In vitro with plant extracts. Acta-Horticulture. 331: 301-305.
11. Cunfer, B.M. 1988. Bacterial disease of wheat and their potential importance in tropical reigons. In: Klatt, A. (ed) wheat production constraints in tropical enviroments, Cimmyt, Mexico. 263-273.
12. Dabur, R., Singh, H., Chhillar, A., Ali, M., and Sharma, G. 2004. Antifungal potential of Indian medicinal plants. Fitoterapia. 75: 389-391.
13. Eftekhar, F., Yousefzadi, M., and Tafakori, V. 2005. Antimicrobial activity of *Datura innoxia* and *Datura stramonium*. 76: 118-120.
14. El-Shazly, A., and Hussein, K. 2004. Chemical analysis and biological activities of the essential oil of *Teucrium leuocladum* Boiss. (Lamiaceae). Biochemical Systematics and Ecology. 32:665-674.

15. Esswi, T., and Sour, M. 2000. Screening of some Palestian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 70: 343-349.
16. Gutierrez, L.M., Barrientos, B.T., Luna, B., and Ramirez, G.R. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extract from mexician medicinal plants. *Phytomedicine*. 2: 341-347.
17. Hassanein, F.M., and Eldoksch, H.A. 1997. Antibacterial action of carvone and some plant extracts on certain phytopathogenic bacteria and pathogenicity of *Agrobacterium tumefaciens*. *Alexandria Journal of Agricultural Research*. 42: 127-136.
18. Hayes, L.E. 1946. Survey of higher plants for presence of antibacteria substances. *Bot. Gas*. 108: 408.
19. Hovadik, A., and Chladek, M. 1974. The antimicrobial activity of the essential oils of some aromatic plants. *Bulletin Vyzkumny Ustav Zelinarsky Olomouc*. 18: 61-71.
20. Isshiki, K., Nishinomiya, T., nezaka, N., and Tekueka, K. 1993. Growth inhibition of microorganisms by plant extracts. *Journal of the Japan Society for Food Science and Technology*. 40: 525-527.
21. Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakumar, R., and Samiyappan, R. 2004. Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 65:91-100 .
22. Mahran, G.H., El-Fishawy, A.M., Hosny, A.M.S., and Hilal, A.M. 1991. Phytochemical and antimicrobial study of *Jacaranda mimosaeifolia* D.Don. grown in Egypt. *Herba-Hungarica*. 30:98-108.
23. Mangamma, P., and Sreeramulu, A. 1991. Garlic extract inhibitory to growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. *Indian Phytopathology*. 44: 372-374.
24. Mensah, J.L., Lagarde, I., Ceschin, C., Michel, G., Gleye, J., and Fouraste, I. 1990. Antibacterial activity of the leaves of *Phyllanthus discoideus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 28: 129-133.
25. Mosch, J., Zeller, W., Rieck, M., Ullrich, W., and Bonn, W.G. 1996. Further studies on plant extracts with a resistance induction effect against *Erwinia amylovora*. *International workshop on fire blight, St. Catherines, Ontario, Canada, 7-10 August 1995. Acta-Horticulturae*. 411: 361-366.
26. Pandey, V. and Dubey, N. 1994. Antifungal potential of leaves and essential oils from higher plants against soil phytopathogens. *Soil Biology and Biochemistry*. 26: 1417-1421.
27. Puerta, R., Saenz, M.T., and Garcia, M.D. 1996. Antibacterial activity and composition of the volatile oil from *Achillea ageratum* L. 1996. *Physiology Research*. 10: 248-250.
28. Rohner, V., Carabet, A., and Buchenauer, H. 2003. Effectiveness of plant extracts of *Paeonia suffruticosa* and *Hedera helix* against disease caused by *Phytophthora infestans* in tomato and *Pseudoperonospora cubensis* in cucumber. *Journal of plant disease and protection*. 111:83-95.
29. Singh, K., and Shukla, N. 1984. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. *Fitoterapia*. 55: 313-315.
30. Sivropoulou, A., Kokkini, S., Lanaras, T., and Arsenakis, M. 1995. Antimicrobial activity of mint essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 43: 2384-2388.
31. Tan, R., Tang, H., Hu, J., and Shuai, B. 1998. Lignans and Sesquiterpene Lactones from *Artemisia Sieversiana* and *Inula Racemosa*. *Phytochemistry*. 49: 157-161.
32. Tillman, B.L. 1994. Breeding wheat for resistance to bacterial streak caused by *Xanthomonas campestris* pv. *translucens*. Ph. D. thesis. Louisiana state university. Baton Rouge. 150pp.
33. Tumen, G., and Ayhan, Z. 1992. Antimicrobial activity of essential oils of two *Ziziphora* species growing in Turkey. *Fitoterapia*. 63: 264-265.
34. Yin, M., and Tsao, S. 1999. Inhibitory effect of seven *Allium* plants upon three *Aspergillus* species. *International Journal of Food Microbiology*. 49: 49-56.

Antibacterial effects of some herbal essential oils and plant extracts on the causal agent of bacterial leaf streak in wheat and barley

F. Beiki¹ and A. Alizadeh²

¹Academic member of Plant pest and Disease Research Institute, Biological Control Laboratory, Amol,

²Forest pest and Disease Research Institute, Tehran

Abstract

Bacterial leaf streak (BLS) is one of the most important bacterial seed born disease of wheat and barley in warm and humid climates that caused by *Xanthomonas translucens* PV. *Translucens* and *X. t.* pv. *Cerealis*. Attempts to control of this disease with bactericides have been unsuccessful. In this research, the antibacterial activity of some plant extracts and essential oils distilled from medicinal plants were studied. The assay was carried out in petri dishes containing Yeast Extract Glucose Nutrient Agar, in which there was a well in the center of each petri dish. After 48h inoculation of bacterial suspension on the surface of medium, the diameter of growth inhibition zone around the wells containing 12 µl of plant extract and essential oil was measured, and analyzed. The results of the in vitro trials showed that all of essential oils had antibacterial activities on these pathogens. In this regard, the essential oils of *Mentha aquatica*, *M. spicata*, *Echinophora sibthorpiana*, *Hyssopus officinalis* and *Ziziphora persica* showed the highest and the essential oils of *Achillea biebersteinii*, *A. millefolium*, *A. vermiculatus*, *A. tenuifolium* and *Teucrium polium* showed the lowest antibacterial activity. Also, the plant extracts of *Allium sativum* and *Peganum harmala* showed the highest and plant extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Artemisia annua* did not have any antibacterial activity.

Keywords: *Xanthomonas translucens*; Essential oil; Plant extract; Antibacterial