بررسی تأثیر عصاره چند گیاه دارویی بر کنترل بیماری بلاست مرکبات

مهسا علیمی*[۱]، سمانه جهان تیغ[۲]

[۱] استادیار، گروه کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران

[۲] کارشناس، گروه کشاورزی دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۰۶/۰۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۱۶

چکیده

یکی از روش‌های مقابله با بیماری بلاست مرکبات، مبارزه شیمیایی می‌باشد که با توجه به هزینه‌های سنگین تهیه سموم و اثرات سوء سموم روی محیط زیست محققان تمایل به یافتن روش‌های کم هزینه‌تر و همچنین فاقد اثرات سوء بر محیط‌زیست دارند، در نتیجه شیوه مبارزه‌ای که امروزه بسیار مورد توجه قرار گرفته است، استفاده از ترکیبات طبیعی باکتری‌کش می‌باشد که برخی از این ترکیبات در عصاره گیاهان دارویی بومی یافت می‌شود. در این تحقیق، چند روش مختلف عصاره‌گیری گیاهان دارویی و کاربرد آن‌ها در ممانعت رشدی باکتری عامل بلاست مرکبات مورد بررسی قرار گرفته است. این گیاهان دارویی شامل ریحان (*Ocimum basilicum*)، پونه (*Mentha pulegiu*)، رزماری (*Rosmarinas officinalis*)، اسطوخودوس (*Lavanduia anyustifolia*)، آویشن (*Thymus persicus*) و گزنه (*Urtica Dioica*) می‌باشد. اثر این عصاره‌ها در میزان وسعت‌هاله بازدارندگی در محیط کشت Nutrient Agar در مقابله با باکتری بیماری‌زا با یکدیگر و در مقابل سم اکسی کلرور مس و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفت. در نهایت بهترین روش جهت بدست آوردن عصاره گیاهی بازدارنده‌تر، ابتدا روش تحلیلی سپس خیساندن و کلونجر و در آخر جوشاندن همراه با هم زدن بود؛ میانگین بالاترین میزان بازداری به ترتیب مربوط به گیاهان پونه، نعناع، آویشن، اسطوخودوس، گزنه، رزماری و در نهایت آنتی‌بیوتیک و سم اکسی‌کلرور مس بود. کاربرد این عصاره‌ها به صورت پاشش در سطح باغ مرکبات نیز اجرا شد و سبب کاهش شدت بیماری شد، اما تفاوت محسوسی بین انواع عصاره‌ها در میزان بازدارندگی در سطح باغی مشاهده نشد.

واژگان کلیدی: آویشن، اسطوخودوس، پونه، رزماری، عصاره‌گیری، کنترل بلاست مرکبات، گزنه، نعناع

مقدمه

بر اساس گزارش سازمان خواربار جهانی در سال ۲۰۰۰ تولید مرکبات در جهان امروز از اهمیت به سزایی برخوردار بوده و با تولیدی در حدود ٦٠ میلیون تن و پوشش سطحی حدود ١/٦ میلیون هکتار در جهان، یکی از منابع بسیار مهم تولید ثروت، مبادلات تجارتی و اشتغال به کار ساکنین حدود ٤٩ کشور مرکبات‌خیز جهان شده است. بر اساس آمارنامه وزارت کشاورزی در ۱۳۸۷، سطح زیر کشت مرکبات در ایران حدود ۱۷٦۰۰۰ هکتار برآورد شده که نزدیک به ۸۳۰۰۰ هکتار آن در مازندران می‌باشد (بی‌نام، ۱۳۸۷).

یکی از بیماری‌های مهم مرکبات که تاکنون تنها از استان مازندران گزارش شده است بلاست مرکبات می‌باشد که اولین بار در سال ١٣٦٥ در مازندران شناسایی و عامل اصلی آن گونه *Pseudomonas*

*مسئول مکاتبه: mahsa.alimi@gmail.com

Archive of SID

www.SID.ir

viridiflava (Burkholder) dowson تشخیص داده شده است (شمس بخش، ۱۳٦۷). قابل ذکر است که این باکتری‌ها به‌علت واجد هسته یخ بودن سبب شدت بخشیدن بیماری بروی میزبان می‌گردند و این خود از دلایل اهمیت این پروژه می‌باشد. گونه‌های *viridiflava* و *P. syringae* پروتئینی تولید می‌کند که تشکیل کریستال‌های یخ را روی سطوح گیاهان تسهیل می‌کند این پروتئین‌ها هر ساله سبب میلیون‌ها دلار خسارت به گیاهان زراعی می‌شود. به طور کلی در حالت عادی سطح گیاهان چنانچه به‌مدت چند ساعت در معرض برودت دمای ٤°C- تا ٥- قرار گیرند به علت وجود سیستم‌های طبیعی سرما را تحمل کرده و دچار خسارت نمی‌شوند، زیرا در اثر کاهش دما غلظت برخی مواد در شیره گیاه افزایش یافته و مایع درون سلولی برودت حدود ٤°C- را تحمل می‌کند. برخی پاتووارهای *Pss* در غشا خود پروتئین‌هایی دارند که منجر به انجماد آب در درجه حرارت نزدیک به صفر می‌شوند. این ویژگی تولید هسته یخی نقش مهمی در قدرت بیماری‌زایی باکتری دارد. در واقع تشکیل هسته یخ باعث ایجاد زخم در گیاه شده و سبب می‌شود باکتری به داخل بافت‌های گیاه نفوذ کند. پروتئین‌های عامل ایجاد هسته یخ در غشا بیرونی سلول باکتری قرار دارند. این باکتری‌ها با پایین آمدن دمای محیط باعث یخ زدن آب بین بافتی شده در نتیجه اندام‌های حساس مانند جوانه، شکوفه دچار سرمازدگی شده و از بین می‌روند (Schmid et al., 1997). این بیماری در برخی سال‌ها خسارت قابل توجهی به مرکبات شمال کشور وارد می‌آورد. یکی از موثرترین روش‌های مقابله با این بیماری‌ها، مبارزه شیمیایی می‌باشد؛ اما با توجه به اثرات سوء ترکیبات شیمیایی بر محیط زیست، هزینه‌های سنگین تهیه سموم و ایجاد مقاومت برخی عوامل بیماری‌زا به این نوع سموم، استفاده از ترکیبات گیاهی که قابل بازگشت به‌طبیعت بوده و آلودگی ایجاد نمی‌کنند را جایگزین مناسبی می‌توان در نظر گرفت (Pandey and Dubey, 1992; Sharma and Tripathi, 2006). بنابراین شناسایی گیاهانی که دارای این ترکیبات هستند و تعیین نوع ترکیبات متابولیت‌های ثانویه با فعالیت ایستایی یا ضد بیماری‌ها از اهمیت بسیاری برخوردار است (Bittner et al., 2009). در سال‌های اخیر مطالعات متعددی مبنی بر فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی برروی برخی از عوامل بیماری‌زای گیاهی صورت گرفته است. تحقیقات نشان داده است که این گیاهان به دلیل داشتن ترکیبات شیمیایی نظیر فنول‌ها دارای فعالیت آنتاگونیستی بر علیه برخی از عوامل بیماری‌زای گیاهی می‌باشند (Pattnaik et al., 1996; Lee et al., 2007).

Pouvova و همکاران (۲۰۰۸) در تحقیق خود کاربرد عصاره روغنی چندین گیاه مختلف را جهت کنترل بیماری ساق سیاه سیب زمینی (*Sepedonicus clavibacter michiganensis* subsp) و بیماری پژمردگی باکتریایی یونجه (*C. michiganensis* subsp. *Insidiosus*) را مورد بررسی قرار داده‌اند، از جمله گیاه اسطوخودوس که درصد بازدارندگی این گیاه بر سایز کلونی *Sepedonicus clavibacter michiganensis* subsp. برابر با ۹/۳۳ cm و درصد بازدارندگی *C. michiganensis* subsp *insidiosus*، ۸ cm بوده است. در مورد گیاه پونه که بروی هر دو بیماری تأثیر بازدارندگی بیشتری داشته است کاهش سایز کلونی *C. sepedonicus* subsp.، ۱۱ cm و برای *C. insidious* subsp.، ۸/۵۰ cm بوده است، بالاترین میزان بازدارندگی مربوط به گیاه ریحان با بازدارندگی *Cms*، ۱۱/۱۷ cm و *Cmi*، ۱۸cm بدست آمده است. رزماری جهت کنترل این دو بیماری نتیجه چندان مطلوبی نداشته است و تنها سبب ۸/۵ cm کاهش

Archive of SID

www.SID.ir

رشد *Cms* و ۵/۵ cm در مقابل با *Cmi* بوده است (Pouvova et al., 2008). در تحقیق دیگری کاربرد عصاره آبی گیاه زیتون تلخ بروی قارچ *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici* مورد بررسی قرار گرفت که در کنترل عامل بیماری‌زای مذکور بسیار موثر گزارش شد (علیمی وهادیان، ۱۳۸۷).

برخی گیاهان دارویی نیز حاوی ترکیبات غیرفنلی چون Limonen هستند که فعالیت‌های ضدمیکروبی آن‌ها به سبب وجود گروه آلکایل است. به طور مثال گیاه آویشن غنی از تیمول و کارراکرول و گیاه مرزنگوش غنی از ترپن هستند. به‌طور کلی اسانس‌های گیاهان علفی در طول دوره گل و بلافاصله پس از آن دارای بیشترین فعالیت ضدباکتریایی هستند (Brut, 2004). در این تحقیق نیز چند روش مختلف عصاره‌گیری گیاهان دارویی که شامل ریحان، پونه، رزماری، اسطوخودوس، آویشن و گزنه بودند در میزان وسعت‌هاله بازدارندگی در محیط کشت NA در مقابله با باکتری بیماری‌زای بلاست مرکبات با یکدیگر و در مقابل سم اکسی کلرور مس و آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین اندازه‌گیری و مورد مقایسه قرار گرفتند.

مواد و روش‌ها

جداسازی و خالص سازی ایزوله‌ها

از ابتدای زمستان سال ۱۳۸۷ تا زمستان ۱۳۸۹، نمونه‌های مرکبات مشکوک به بیماری‌های بلاست باکتریایی از مناطق مختلف شرق استان مازندران و استان گلستان جمع آوری و در آزمایشگاه برگ‌های آلوده زیر شیر آب روان شسته شد و دوباره با آب مقطر استریل آب‌کشی شدند. سپس قطعاتی از حد واسط بافت بیمار و سالم جدا و درون پتری استریل حاوی آب مقطر خرد گردید. بعد از ۱۰ دقیقه یک لوپ از سوسپانسیون حاصله روی محیط کشت NA (نوترینت آگار) مخطط گردید و پتری‌ها در دمای ۲۶°C به مدت ۲ روز نگهداری شدند. تک کلنی‌های خالص روی محیط کینگ- ب (King's B) کشت داده شدند (رحیمیان، ۱۳۷۷).

آزمون‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیک

آزمون‌های بیوشیمیایی و مرفولوژیکی و فیزیولوژیکی طبق روشهای متعارف (Schaad et al. 2001, Fahy & Persley 1983) انجام گردید. پس از جداسازی و خالص سازی، جدایه‌هایی که لوان، اکسیداز و آرژنین دی هیدرولاز منفی بودند اما قادر به هضم ورقه‌های سیب زمینی و ایجاد فوق حساسیت روی توتون بودند به عنوان استرین‌های مشکوک به گونه *P. viridiflava* انتخاب شدند (Brenner et al., 2005).

آزمون بیماری‌زایی

نهال‌های نارنج (*Citrus aurantium*) در آزمون‌های بیماری‌زایی در شرایط گلخانه به کار برده شدند و در فصل پائیز و بهار مایه‌زنی شدند. سوسپانسیونی از کشت ۲۴ ساعته سویه‌ها در آب مقطر استریل تهیه و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری در طول موج ۶۰۰ نانومتر، جذب نوری آن‌ها به میزان OD=۰/۲-۰/۵ تنظیم گردید. مایه زنی نهال‌ها به دو روش انجام گرفت: الف) با سوزن سرنگ شماره ۲۲ سوسپانسیون رقیق باکتری به پشت برگ‌ها تزریق شد، به میزانی که ۱-۰/۵ سانتی‌متر مربع از سطح برگ آبسوخته گردد. ب) ابتدا سوسپانسیون باکتری روی سطح برگ‌ها اسپری و با سوزن‌زنی چند نقطه از برگ توسط سنجاق، سوراخ گردید. پس از مایه زنی، نهال‌های مرکبات، به منظور تامین رطوبت نسبی ۹۰ تا ۱۰۰ درصد به مدت ۳ تا ۵ روز، در کیسه‌های پلاستیکی در دمای ۲۷-۱۷ درجه سلسیوس قرار داده شده و سپس بوته‌ها از زیر کیسه خارج و در شرایط گلخانه نگهداری شدند. در مورد نهال‌های

Archive of SID

www.SID.ir

مرکبات، حدود ۳-۲ هفته از تاریخ مایه‌زنی، علائم بیماری بلاست مشاهده گردید. نمونه‌های شاهد با آب مقطر استریل، مایه زنی شدند آزمون فوق در سه تکرار روی مرکبات انجام گردید و تمامی نمونه‌ها به منظور مشاهده واکنش، مورد ارزیابی روزانه قرار گرفتند (شمس بخش و رحیمیان، ۱۳٦۷).

انواع روش‌های عصاره‌گیری

۱-خیساندن (ماسراسیون): منظور عصاره‌گیری در درجه حرارت طبیعی محیط است (۱۵ تا ۲۰ درجه) در این فرایند گیاه خرد شده داخل یک ظرف دهان گشاد ریخته شده و حلال‌ها روی آن اضافه شد و به طور یکنواخت مخلوط گردید. در ظرف محکم بسته شد و در محلی تاریک قرار داده شد. مدت خیساندن بستگی به خواص خود گیاه دارد. حلال به کار رفته آب بود. خیساندن گیاه در آب نباید برای مدت طولانی انجام شود چرا که در آن صورت امکان تخمیر شدن و یا کپک زدن گیاه وجود دارد. گیاهان دارویی محتوی لعاب چون کتان یا ختمی باید حدود نیم ساعت وگیاهان معطر یا تلخ بین دو تا ۱۲ ساعت خیسانده شدند. برای خیساندن از یک جزء گیاه و بیست جزء آب استفاده شد (خانزاده و حسن‌زاده، ۱۳۸۵).

۲- روش تحلیلی: در این روش از درجه حرارت بالاتری استفاده شد اما با وجود این حرارت از ۵۰ درجه سانتی‌گراد تجاوز نمی‌کند. در اکثر موارد برای عصاره‌گیری از حرارت ۳۵ تا ٤۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. این عمل حداقل به‌مدت نیم ساعت و حداکثر ۲٤ ساعت ضمن تکان دادن ظرف ادامه پیدا کرد. از این روش در رابطه با قسمت‌های سخت گیاه یا گیاهانی که دارای موادی هستند که به سختی حل می‌شوند استفاده گردید (خانزاده و حسن‌زاده، ۱۳۸۵).

۳- جوشانده‌ها: در این روش برای بدست آوردن عصاره گیاه آن را برای مدتی با آب جوشانده شد. قسمت‌های مختلف گیاه (شاخه، ریشه، برگ، گل) که به طرز صحیحی قطعه قطعه شده‌اند در آب مقطر خیس شده و به مدت ۱۵ دقیقه جوشانده شدند، سپس جوشانده را با یک توری کاملاً صاف نموده و با کمک لوله آزمایش مدرج به مایع بدست آمده آب اضافه شد. معمولاً برای جوشاندن نسبت گیاه به آب یک به ده است. جوشانده‌ها را نمی‌توان برای طولانی مدت نگهداری نمود و بایستی به‌صورت تازه در هنگام نیاز به مصرف رساند، حداکثر ۱۵۰ تا ۲۰۰ گرم آن برای مصرف دو تا سه روز تهیه شد (خانزاده و حسن‌زاده، ۱۳۸۵).

٤- روش کلونجر: برای تهیه عصاره گیاهی از روش کلونجر نیز استفاده شد. بدین صورت که مقدار ٦۰ گرم از پودر خشک گیاه را در ۱/۵ لیتر آب مقطر در داخل بالن دستگاه ریخته و روی هیتر به‌مدت ٤-۳ ساعت جوشانده شد. پس از اینکه دمای آب به نقطه جوش رسید، تبخیر شده و در داخل ستون دو جداره دستگاه بالا رفته و بعد از تماس با سرمای آب داخل جداره بیرونی سرد شده و میعان کرده و در داخل محفظه دستگاه جمع شد. عرق در قسمت پایین محفظه قرار گرفته و اسانس‌ها چون روغنی هستند در قسمت بالا قرار گرفته لذا آن‌ها را می‌توان توسط یک شیر تخلیه که در پایین محفظه قرار دارد از هم جداکرد. اما پس از جداسازی عصاره و عرق توسط شیر تخلیه به همراه اسانس جدا سازی شد. بدین ترتیب می‌توان اسانس را که در قسمت بالا قرار گرفته توسط میکروپیپت جدا نمود (خانزاده و حسن‌زاده، ۱۳۸۵).

عصاره‌های مورد آزمایش

مرحله بعدی مطالعه تأثیر عصاره‌های گیاهانی چون نعناع، ریحان، میخک، اسطوخودوس، رزماری، آویشن و بعضی سموم رایج در کنترل و مدیریت عامل بیماری که در استان هم بسیار پرکاربرد است

Archive of SID

www.SID.ir

چون محلول بردو بوده که تأثیر این گیاهان با یکدیگر و در مقابله با محلول بردو مقایسه شدند. بدین‌منظور عصاره گیاهی تهیه شده در سطح پتری‌دیش روی محیط کشت آگار غذایی مورد ارزیابی قرار گرفت. نحوه ارزیابی و انتخاب عصاره‌های مؤثر به این شرح بود: ابتدا پتری‌دیش‌های حاوی ۲۰ ml محیط کشت نوترینت آگار را تهیه کرده و در وسط هر پتری‌دیش، توسط بخش توخالی پیپت پاستور یک چاهک به قطر ٦ mm ایجاد شد. پس از حفر چاهک، داخل هر چاهک مقدار ۵۰ µl (عصاره خالص ۱۰۰درصد بدون رقیق سازی) گیاهان مختلف باضافه گردید. عصاره‌ها نباید از لبه چاهک‌ها به سطح محیط کشت سرازیر شوند. پس از مدت یک یا دو ساعت انکوباسیون و جذب کامل عصاره‌ها توسط محیط کشت سوسپانسیون کدر باکتری در غلظت حدود ۱۰ سلول در هر میل در زیر هود روی محیط کشت بطور یکنواخت پخش شد. پس از پایان کار دور پتری‌ها را با پارافیلم پوشانیده و پتری‌ها نگهداری شدند (اشرفی و همکاران، ۱۳۸٤). در طی مدت ۷۲-۲٤ ساعت پتری‌ها مورد بازبینی گرفتند و میزان وسعت‌هاله بازدارندگی که بر اثر بازدارندگی عصاره روی باکتری بود اندازه‌گیری شد که هر چه حساسیت باکتری نسبت به عصاره بیشترهاله بزرگتر و هر چه حساسیت کمترهاله‌ها کوچکتر بودند چرا که مانع از رشد و تکثیر باکتری‌ها شده بودند. جهت مقایسه تأثیر سموم شیمیایی کاربردی علیه این بیماری با عصاره‌های گیاهی مطابق روش ذکر شده از آنتی‌بیوتیک استفاده شد در تمامی موارد (بررسی اثر عصاره‌های گیاهی و سموم) در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گردید و نتایج حاصله مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی اثر عصاره‌ها در سطح باغات آلوده

آزمایشات مزرعه‌ای این پژوهش در سطح باغات آلوده که در مرحله اول طرح شناسایی و باکتری بیماری‌زا از آن باغات جداسازی شده صورت گرفت؛ به عبارتی نمونه‌برداری‌های اولیه نیز از همین باغات صورت گرفته بود. دوزهای مناسب بدست آمده از مرحله آزمایشگاهی در اوایل پاییز و قبل از شروع بیماری به صورتی که هر باغ بر اساس اندازه به بخش‌های مساوی با خوط فرضی تقسیم شده و در هر قسمت از این بخش‌های مساوی اثر یک عصاره و نیز در بخشی هم پاشش سموم مسی مانند محلول بردو صورت گرفته و اثر کاهش میزان شدت بیماری در بخش‌های مختلف باغ در بهار آینده مورد بررسی قرار گرفت؛ جهت تیمار شاهد از آب مقطر سترون جهت پاشش بر روی بخشی از درختان باغ استفاده شد.

نتایج

نمونه برداری و جداسازی

در این بررسی مجموعاً ۱۸۵ جدایه از نمونه‌های آلوده شاخه، برگ، شکوفه و میوه درختان مرکبات از دو استان گلستان (۸۷ جدایه) و شرق مازندران (۹۸ جدایه) روی محیط آگار مغذی جداسازی شد. اغلب جدایه‌ها روی محیط‌های NA (آگار غذایی) و Nutrient Agar Sucrose (آگار غذایی حاوی سوکروز) دارای کلنی‌های روشن و گاهی به رنگ سبز کمرنگ مدور کروی، کمی برجسته و گنبدی شکل، لعابی با حاشیه صاف بوده و بعد از چهار روز رشد در دمای ۲۵-۲۸°C، قطر کلنی‌ها ٤-۳ میلی‌متر بود. کلونی‌های مسن (بیش از دو هفته) اغلب حالت چسبنده روی محیط داشتند.

خصوصیات فنوتیپی و بیوشیمیایی جدایه‌ها

واکنش گرم در اغلب جدایه‌های مذکور منفی بود. جدایه‌های این گروه قادر به رشد بی‌هوازی نبودند. واکنش اکسیداز بین جدایه‌ها متغییر بود به طوری که حدود ۲۰ درصد اکسیداز مثبت و بقیه اکسیداز منفی

Archive of SID

www.SID.ir

بودند. جدایه‌هایی که فلورسنت و اکسیداز مثبت بودند پس از عدم ایجاد واکنش فوق حساسیت روی توتون جزء جدایه‌های ساپروفیت بررسی شدند و در بخش جدایه‌های ساپروفیت همراه با عوامل ایجاد بلاست مرکبات به آن‌ها پرداخته شد. جدایه‌های فلورسنت تیپ اول به عنوان جنس *Pseudomonas* تشخیص داده و آزمون‌های تکمیلی به منظور تشخیص گونه انجام گردید. در بین جدایه‌های اکسیداز منفی اکثر جدایه‌ها توانایی لهانیدن ورقه‌های سیب‌زمینی را نداشته و واکنش لوان در بین این جدایه‌ها مثبت بود و باقی جدایه‌های اکسیداز منفی جداشده از مازندران قادر به لهانیدن ورقه‌های سیب زمینی بودند و اکثراً لوان آن‌ها منفی بود از بین ۹۱ جدایه فلورسنت اکسیداز منفی ۷۸ جدایه که واکنش فوق حساسیت بیشتری را بعد از ٢٤ ساعت روی شمعدانی بروز دادند انتخاب شدند، با توجه به اینکه همیشه بین فوق حساسیت و بیماری‌زایی ممکن است همبستگی وجود نداشته باشد بعد از تشخیص گونه‌ها آزمون‌های بیماری‌زایی روی میزبان انجام گرفت، از این رو این ۷۸ جدایه یاد شده به عنوان عوامل بیماری‌زا مورد شناسایی قرار گرفتند. بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون‌های سری لوپات (لوان مثبت یا منفی، اکسیداز منفی، لهانیدن سیب زمینی منفی یا مثبت، آرژنین دی هیدرولاز منفی و فوق حساسیت روی شمعدانی مثبت)، رنگ این جدایه‌ها کمی متمایل به زرد و قابلیت لهیدگی سیب زمینی آن‌ها نیز کمتر بود و در آزمون بیماری‌زایی نیز شدت کمتری از علائم کلروز و نکروز را ایجاد کردند. جدایه‌ها در آزمون‌های رشد در ٤١°C، احیا نیترات، اوره از، اکسیداز، منفی بوده و شیر لیتموس را قلیایی نمودند. با توجه به خصوصیات فوق، این جدایه‌ها شباهت بالایی با گونه *P. viridiflava* (Burkholder) Dowson داشتند تمامی این جدایه‌ها تولید هسته یخ کرده و روی شمعدانی واکنش فوق حساسیت نشان دادند اما شدت واکنش فوق حساسیت آن‌ها متغییر بود (Schaad et al., 2001).

آزمون بیماری‌زایی

همه گیاهان تلقیح شده با *P. viridiflava* بعد از ۷ روز علایم نکروز روی شاخه مشاهده گردید که پس از مدتی به سمت پایین گسترش یافت. طول ناحیه نکروز بین جدایه‌ها از ۰/٦ تا ٤/۹ سانتی‌متر متغییر بود. باکتری‌های جداسازی شده از این نواحی با جدایه‌های اولیه کاملاً مشابه بودند. در تیمارهای شاهد هیچ‌گونه نکروز مشاهده نشد. لکه‌های آبسوخته پس از ٤ تا ٥ روز روی برگ‌های تلقیح شده مشاهده گردید. لکه‌ها به تدریج از قسمت مرکزی نکروز شده و در برخی نمونه‌ها بعد از چند روز از بافت برگ جدا شدند (شکل ۱). از کشت لکه‌های نکروزه باکتری اولیه بر اساس انجام سری آزمون LOPAT مجددا شناسایی شدند.

(الف)

(ب)

شکل ۱. علائم ایجاد شده توسط جدایه های مختلف سودوموناس

الف) علائم ایجاد شده بر روی شاخه

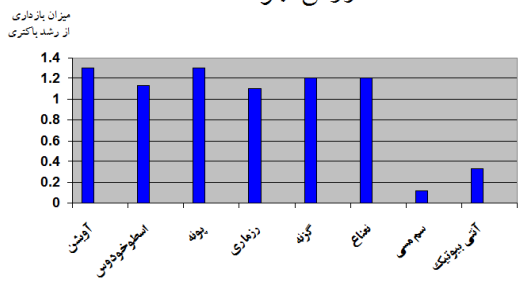
ب) علائم ایجاد شده روی برگ جوان

www.SID.ir

نتایج کاربرد عصاره گیاه دارویی بر بیماری‌های گیاهی

در مرحله دوم تعدادی از گیاهان با خاصیت دارویی که بر اساس بررسی منابع صورت گرفته جزء بالاترین درصد کنترل بیماری‌های گیاهی بودند انتخاب و جمع آوری شدند. این گیاهان شامل نعناع *Mentha Piperita*، پونه *Mentha pulegiu*، رزماری *Rosmarinas officinalis*، اسطوخودوس *lavanduia anyustifolia*، آویشن *Thymus persicus* و گیاه گزنه *Urtica Dioica*. بود. چندین روش عصاره‌گیری جهت بررسی کاراترین روش جهت کنترل باکتری بیماریزا در عصاره گیری مورد بررسی قرار گرفت. این روش‌ها شامل ماسراسیون، خیساندن، جوشانده‌ها، عصاره آبی، عرق‌گیری و اسانس گیری به روش تقطیر با آب توسط دستگاه تقطیر بودند. مرحله آخر تأثیر ممانعت گیاهان ذکر شده در مقابل باکتری عامل بلاست مرکبات بود و اثرات آنها در مقابله با عامل بیماریزا در سه تکرار بررسی و با یکدیگر مقایسه شدند. بهترین روش جوشاندن همراه با هم زدن و بالاترین میزان بازداری به ترتیب مربوط به گیاهان پونه، آویشن، اسطوخودوس، گزنه، نعناع، رزمازی بود که با سم مسی اکسی کلرور مس و آنتی بیوتیک تتراسایکلین مورد مقایسه قرار گرفت و نتایج آن در قالب جداول و نمودارهای زیر آمده است.

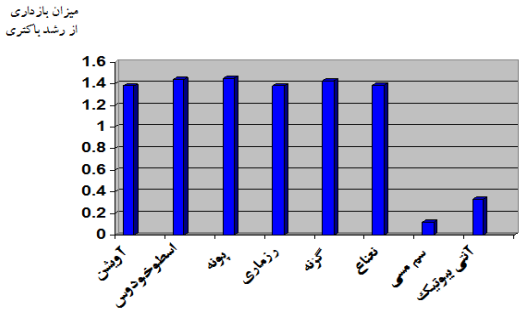
روش جوشاندن



شکل ۲. میزان بازداری از رشد باکتری عامل بلاست مرکبات در اثر کاربرد جند عصاره گیاهی تهیه شده به روش جوشاندن

در روش جوشاندن بهترین عصاره که بالاترین میزان بازدارندگی را در مقابل باکتری مورد آزمایش نشان داد پونه و آویشن و کمترین بازدارندگی بین گیاهان مورد آزمایش مربوط به اسطوخودوس و رزماری بود همچنین کمترین میزان بازدارندگی بین همه تیمارها مربوط به سم مسی و آنتی‌بیوتیک بود.

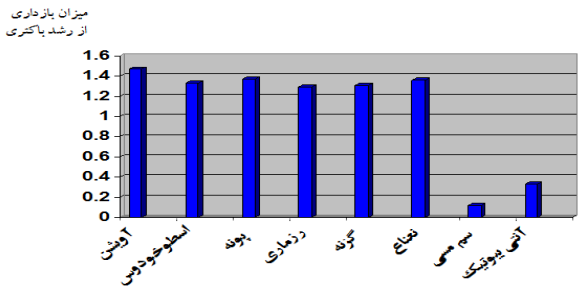
روش تحلیلی



شکل ۳. میزان بازداری از رشد باکتری عامل بلاست مرکبات در اثر کاربرد جند عصاره گیاهی تهیه شده به روش تحلیلی

در روش تحلیلی بهترین عصاره که بالاترین میزان بازدارندگی را در مقابل باکتری مورد آزمایش نشان داد پونه، اسطوخودوس و گزنه و کمترین بازدارندگی بین گیاهان مورد آزمایش مربوط به آویشن بود همچنین کمترین میزان بازدارندگی بین همه تیمارها مربوط به سم مسی و آنتی‌بیوتیک بود.

روش خیساندن

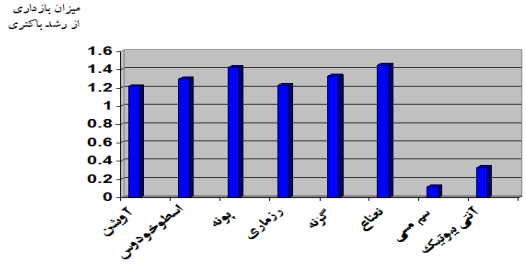


شکل ٤. میزان بازداری از رشد باکتری عامل بلاست مرکبات در اثر کاربرد جند عصاره گیاهی تهیه شده به روش خیساندن

Archive of SID
www.SID.ir

در روش خیساندن بهترین عصاره که بالاترین میزان بازدارندگی را در مقابل باکتری مورد آزمایش نشان داد آویشن، پونه و نعناع و کمترین بازدارندگی بین گیاهان مورد آزمایش مربوط به رزماری بود همچنینی کمترین میزان بازدارندگی بین همه تیمارها مربوط به سم مسی و آنتی‌بیوتیک بود.

روش کلونجر



شکل ۵. میزان بازداری از رشد باکتری عامل بلاست مرکبات در اثر کاربرد جند عصاره گیاهی تهیه شده به روش کلونجر

در روش کلونجر بهترین عصاره که بالاترین میزان بازدارندگی را در مقابل باکتری مورد آزمایش نشان داد نعناع و پونه و کمترین بازدارندگی بین گیاهان مورد آزمایش مربوط به آویشن و رزماری بود همچنینی کمترین میزان بازدارندگی بین همه تیمارها مربوط به سم مسی و آنتی‌بیوتیک بود. در بررسی اثر عصاره‌ها در سطح باغات آلوده تفاوت معنی‌داری بین کاربرد آنتی‌بیوتیک و سم اکسی کلرور مس در مقایسه با عصاره‌های گیاهی مشاهده نشد.

بحث

در سال ۱۹۱۷ لی باکتری *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* VanHall را از مرکبات کالیفرنیا جداسازی نمود، که اولین گزارش رسمی از وجود این باکتری روی مرکبات بود (Lee et al., 1977)؛ اما در شرق مازندران برای اولین بار گونه *Pseudomonas viridiflava* به‌عنوان عامل بلاست مرکبات گزارش شده است (شمس بخش و رحیمیان، ۱۳۶۸). در استان گلستان نیز همانند گزارش عامل بیماری از شرق مازندران گونه *P. viridiflava* به‌عنوان عامل بیماری جداسازی و شناسایی شد.

در بررسی اثر عصاره‌های گیاهی در مقایسه با سموم معمول در کنترل باکتری *Rhizobium radiobacter* مرزه در رقت 10^{1} و 10^{2} و اسطوخودوس در غلظت خالص به میزان ۱۰۰٪ موجب بازدارندگی از رشد *R. radiobacter* شدند، در حالی که اکسی کلرور مس ۳ در هزار با ۳۳/۳۳ درصد کمترین میزان بازدارندگی را داشت. اسطوخودوس با ۱۰۰ درصد بازدارندگی بیشترین و مرزه و رزماری با ۹۹/٦ درصد و ۹۹/۵ درصد در مقام‌های بعدی قرار گرفتند و اکسی کلرور مس کمتر از ۵۰ درصد و به‌میزان ۳۸/٤٤ و ٤٦ درصد، که می‌توان نتیجه‌گیری کرد که عصاره‌ها حدودا دو برابر نسبت به سموم معمول اثر بازدارندگی روی باکتری مذکور داشتند (اشرفی و همکاران، ۱۳۸٤) که این نتایج با یافته‌های حاصل از این پژوهش مطابقت داشته است. در این بررسی نیز عصاره‌های گیاهی در کنترل باکتری بیماری‌زا بسیار موفق‌تر بودند و چندین برابر اکسی کلرور مس و آنتی بیوتیک تتراسایکلین سبب بازداری از رشد عامل بیماری شدند. طی تحقیقات گسترده ای که توسط حسن زاده (۱۳۸٤) در مرکز تحقیقات صنعتی آفت‌کش‌ها و کود صورت گرفت، پس از سه سال تحقیق و بررسی کارایی بیش از ۲۷۰ اسانس گیاهی، اولین سم با نام آتشک‌بس علیه بیماری آتشک در ایران به ثبت رسید. ماده موثره سم مذکور اسانس گیاه آویشن است که چون سایر گیاهان خانواده‌های نعنائیان دارای بیشترین تاثیر و بازدارندگی می‌باشد (حسن زاده، ۱۳۸٤). در این بررسی نیز عصاره آویشن

Archive of SID
www.SID.ir

جزء عصاره‌هایی بود که بالاترین میزان بازدارندگی از رشد را در مقابل باکتری بیماری‌زا مورد آزمایش نشان داد.

با توجه به اینکه این ترکیبات خاصیت گیاه‌سوزی نداشته و از خاصیت قارچ‌کشی و باکتری‌کشی بالایی برخوردار می‌باشند و نیز منابع آن‌ها به آسانی در دسترس می‌باشد، امید است که جایگزین مناسبی برای سموم شیمیایی گردد، هر چند برای توسعه عصاره‌های گیاهی به عنوان یک روش جایگزین مناسب با پتانسیل بالا، نیاز به مطالعه بیشتری در زمینه ماندگاری اثر آنها، و همچنین اثر مطلوب‌تر آن‌ها در شرایط مزرعه و باغی در مقایسه با شرایط آزمایشگاه می‌باشد.

نتیجه‌گیری نهایی

براساس نتایج بدست آمده از این بررسی تمامی عصاره‌های گیاهی مورد بررسی اثر آنتی‌باکتریالی قوی‌تری را نسبت به سم مسی و حتی آنتی‌بیوتیک از خود نشان دادند و به میزان بیشتری مانع از گسترش باکتری عامل بلاست مرکبات در شرایط آزمایشگاهی شدند، اما در شرایط باغی تفاوت معنی‌داری بین تیمارهای عصاره‌های گیاهی و سم مسی و آنتی بیوتیک مشاهده نشد که بررسی علل این مورد نیاز به بررسی بیشتر دارد، ولی با توجه به اینکه حتی در شرایط باغی عصاره‌های این گیاهان معادل مبارزه شیمیایی قادر به کنترل بیماری بودند می‌توان نتیجه گرفت کاربرد عصاره گیاهان دارویی می‌تواند یک روش جایگزین مناسب با پتانسیل بالا جهت کنترل بیماری بلاست مرکبات و حتی سایر بیماری‌های باکتریایی گیاهی در نظر گرفته شود.

منابع

اشرفی، ج.، حسن زاده، ن. و قطب شریف، ج. (۱۳۸٤). بررسی عصاره‌های گیاهی در مقایسه با سموم معمول در کنترل باکتری *Rhizobium radiobacter*. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران. صفحه ۷۷.

بی نام، (۱۳۸۷). آمارنامه کشاورزی، صفحه ۱۷۸.

رحیمیان، ح. (۱۳۷۷). پروکاریوت‌های بیماری‌زای گیاهی. جزوه درسی دانشکده کشاورزی دانشگاه مازندران. صفحه ۳٦۱.

رحیمیان، ح. و شمس بخش، م. (۱۳٦۸). شناسایی عامل بلاست مرکبات در مازندران. خلاصه مقالات نهمین کنگره گیاه پزشکی ایران، دانشگاه فردوسی مشهد، صفحه ۱۵۰.

شمس بخش، م. (۱۳٦۷). مقایسه عوامل مولد بلاست مرکبات و شانکر باکتریایی درختان میوه هسته دار در استان مازندران. پایان نامه دوره کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس، ۱۱٤ صفحه.

حسن زاده، ن. (۱۳۸٤). فن آوری استفاده از مواد طبیعی گیاهی با تاکید بر مدیریت بیماری آتشک، ویژه نامه مجله علمی-پژوهشی علوم کشاورزی. سال ۱۱، شماره ۱، صفحه ٦۷-۵۳.

خانزاده، ح. و حسن‌زاده، ن. (۱۳۸۵). پراکنش، شناسایی و مدیریت شانکر باکتریایی گوجه فرنگی در استان آذربایجان غربی. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم تحقیقات تهران. ۷٤ صفحه.

علیمی، م. وهادیان، ش. (۱۳۸۷). بررسی اثر بازدارندگی عصاره گیاه زیتون تلخ در مقایسه با چند باکتری آنتاگونیست در کنترل قارچ *Fusarium oxysporum* fsp. *lycopersici*، هجدهمین کنگره گیاهپزشکی ایران. همدان

Bittner, M., Aguilera, M.A., Hernandez, V., Arbert, C. and Casanueva, M.E. (2009).

Archive of SID

www.SID.ir

Fungistatic activity of essential oils extracted from *Peumus boldus*., *Laureliopsis philippiana* and *Laurelia sempervirens* (Chilean Monimiaceae). Chilean Journal of Agricultural Research, 69(1): 30-37.

Brenner, D.J., Krieg, N.R. and Staley, J.T. (2005). Bergy 's manual of systematic bacteriology. Springer. 967p.

Brut, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in food- a review. International Journal of Food microbiology, 94: 223-253.

Fahy, P.C. and Cross, J.E. (1983). The growth of *Pseudomonas phaseolicola* and related plant pathogens *in vivo*. Journal Microbiology. 45: 429-439.

Lee, S.O., Choi, G.J., Jang, K.S. and Kim, J.C. (2007). Antifungal Activity of Five Plant Essential Oils as Fumigant against Postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. Plant Pathology Journal, 23(2): 97-102.

Pandey, V.N. and Dubey, N.K. (1992). Effect of essential oils from some higher plants against fungi causing damping of disease. Biologia Plantarum, 34(1-2): 143-147.

Pattnaik, S., Subramanyam, V.R. and Kole, C. (1996). Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils *in vitro*. Microbios Journal, 86:237-246.

Pouvova, D., Kokoskova B., Pavela R. and Pavel R. (2008). Efficiency of plant essential oils against *Clavibacter michiganensis, in vitro*. Zemdirbyste-Agriculture, 95 (3): 440–446.

Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. (2001). Laboratory id for identification of plant pathogenic bacteria. American Phytopathological Society, St. Paul. Minnesota. USA. 373P.

Schmid, D., Pridmore, D., Capitani, G., Battistutta, R., Neeser, J.R. and Jann, A. (1997). Molecular organization of the ice nucleation protein *InaV* from *Pseudomonas syringa*e. FEBS. Letters. 414: 590-594.

Sharma, N. and Tripathi, A. (2006). Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 22: 587- 593.

Archive of SID

www.SID.ir